

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

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

**Rolle der Succinatdehydrogenase im
Hypoxie-induzierten Anstieg der
Tyrosinhydroxylase- und
Adrenomedullin-mRNA
sowie in der
Hypoxie-induzierten mitochondrialen
ROS-Bildung in PC 12-Zellen**

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

Eingereicht von
Kathrin Täpper
Gießen 2005

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-42-1

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

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

Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

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

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

**Rolle der Succinatdehydrogenase im Hypoxie-induzierten Anstieg der
Tyrosinhydroxylase- und Adrenomedullin-mRNA sowie in der Hypoxie-induzierten
mitochondrialen ROS-Bildung in PC12-Zellen**

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

Eingereicht von
Kathrin Tapper
Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

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

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

*Für meine Eltern
und meinen Mann*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	5
2.1 Hypoxie-gesteuerte Transkriptionsantwort (HIF/Prolylhydroxylasen).....	5
2.1.1 HIF-1-Familie	5
2.1.2 HIF-1 α -Aktivierung.....	6
2.1.3 HIF-1 α -Abbau.....	7
2.1.4 HIF-1 α transkriptionale Aktivierung	7
2.2 Sauerstoffsensormodelle.....	9
2.2.1 Prolylhydroxylasen-Hypothese.....	9
2.2.2 Ionenkanal-Hypothese.....	10
2.2.3 Hämprotein-Hypothese.....	11
2.2.4 NADPH-Oxidase-Hypothese.....	13
2.2.5 Mitochondrien-Hypothese.....	15
2.3 Mitochondrium	17
2.3.1 Aufbau und Funktion des Mitochondriums.....	17
2.3.2 Mitochondriale Atmungskette.....	18
2.3.2.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I).....	18
2.3.2.2 Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II)	19
2.3.2.2.1 Tumoren des Glomus caroticum.....	23
2.3.2.3 Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III).....	25
2.3.2.4 Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)	26
2.4 Hypoxieantwort von Paraganglien/PC12-Zellen (TH, ADM, ROS).....	27
3 Material und Methoden	32
3.1 Zellkultur.....	32
3.1.1 Zelllinie.....	32
3.1.2 Kulturbedingungen.....	32
3.1.3 Splitting.....	32
3.1.4 Mykoplasmentest mit 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI).....	32
3.1.5 Kryokonservierung.....	33
3.1.6 Auftauen.....	33
3.1.7 Vitalfärbung der PC12-Zellen mit Trypanblau.....	33
3.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	34
3.2.1 Aussaat der Zellen.....	34

3.2.2 Reagenzien.....	34
3.2.3 Inkubation der Zellen.....	34
3.2.4 RNA-Isolierung.....	35
3.2.5 DNase-Verdau und cDNA-Synthese.....	35
3.2.6 QIAquick Gel Extraction Kit Protocol.....	36
3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
3.2.8 Gelelektrophorese.....	38
3.2.9 Quantitative PCR	39
3.2.10 Berechnung der relativen Expression.....	42
3.2.11 Statistische Auswertung.....	43
3.3 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikator.....	44
3.3.1 Aussaat der Zellen.....	44
3.3.2 Reagenzien.....	44
3.3.3 Inkubation der Zellen.....	45
3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	45
3.3.5 Messreihenfolge.....	46
3.3.6 Messvorgang.....	46
3.3.7 Statistische Auswertung.....	46
3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen.....	47
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Vitalfärbung mit Trypanblau zur Toxizitätsbestimmung von 3-NPA.....	49
4.2 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren.....	50
4.2.1 Hypoxie-bedingter ROS-Anstieg in PC12-Zellen.....	50
4.2.2 Inkubation von PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren	52
4.2.2.1 DPI.....	52
4.2.2.2 3-NPA.....	54
4.2.2.3 TTFA.....	57
4.2.2.4 Succinat.....	58
4.2.2.5 NBT.....	60
4.3 PCR.....	62
4.4 Quantitative RT-PCR.....	63
4.4.1 Messung der relativen TH-Expression.....	63
4.4.1.1 Hypoxie-bedingter Anstieg der relativen TH-Expression.....	63
4.4.1.1.1 DPI.....	64
4.4.1.1.2 TTFA.....	65

Inhaltsverzeichnis	III
4.4.1.1.3 3-NPA.....	66
4.4.1.1.4 Succinat.....	67
4.4.2 Messung der relativen ADM-Expression.....	70
4.4.2.1 Hypoxie-bedingter Anstieg der relativen ADM-Expression.....	70
4.4.2.1.1 DPI.....	71
4.4.2.1.2 TTFA.....	72
4.4.2.1.3 3-NPA.....	73
4.4.2.1.4 Succinat.....	74
5 Diskussion.....	77
5.1 Messung der intrazellulären ROS-Bildung mittels des Fluoreszenzindikators DCF-DA.....	77
5.2 ROS-Bildung in PC12-Zellen unter Hypoxie.....	80
5.3 Die ROS-Produktion einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette.....	81
5.4 Die Rolle von Komplex II in der mitochondrialen ROS-Produktion von PC12-Zellen.....	83
5.5 Die Hypoxie-induzierte Gentranskription der TH und des ADM in PC12-Zellen und die Rolle von Komplex II.....	85
5.6 Die unterschiedliche Regulation der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion und der Hypoxie-bedingten Zunahme der TH- sowie ADM-mRNA-Menge.....	88
6 Zusammenfassung.....	90
7 Summary.....	92
8 Literaturverzeichnis.....	94
9 Danksagung.....	136

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Adrenomedullin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ARNT	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
bzw.	beziehungsweise
CoCl ₂	Kobaltchlorid
CoQ	Coenzym Q
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
DCFH-DA	2'7'-Dichlorofluorescin-Diazetat
DCFH	2'7'-Dichlorofluorescin
DCF	2'7'-Dichlorofluorescein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
EGL-9	Egg Laying Abnormal-9
EPAS1	Endotheliales PAS Protein 1
EPO	Erythropoetin
Erk	Extrazelluläre signal-regulierte Proteinkinase
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fe-S	Eisenschwefelzentrum
FIH	Factor-inhibiting HIF1
FMN	Flavinmononukleotid
Fp	Flavoprotein
GOI	Gene of Interest
IH	Intermittierende Hypoxie
HKG	Housekeeping Gene
HIF	Hypoxia Inducible Factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ R	Dihydrorhodamin 123
HBS	HIF-1-Bindungsstelle
HRE	Hypoxia Response Element
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
Ip	Eisenschwefelproteinuntereinheit von Komplex II
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

NBT	Nitrobluetetrazolium
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOX	NADPH-Oxidase
3-NPA	3'-Nitropropionsäure
$O_2^{\cdot-}$	Superoxidanion
ODD	Sauerstoffabhängige Degradationsdomäne
OH^{\cdot}	Hydroxylradikal
PGL	Paragangliom
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PC12-Zellen	Phäochromozytomzellen der Ratte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGL	Paragangliom
PHD	Prolylhydroxylase
pVHL	Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein
Q	Ubiquinon
QH_2	Ubiquinol
QFR	Quinolfumaratreduktase
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDH	Succinatdehydrogenase
SQR	Succinatquinonoxidoreduktase
T-PC12-Zellen	Thiamphenicol-behandelte PC12-Zellen
TH	Tyrosinhydroxylase
TTFA	2'-Thenoyltrifluoroazeton
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

Ein adäquates Angebot an Sauerstoff (O_2) ist lebensnotwendig für alle Säugetierzellen (Lopez-Barneo et al., 1997). O_2 -Mangel (Hypoxie) führt zu einer Reihe von adaptiven Reaktionen auf zellulärer und molekularer Ebene (Lopez-Barneo et al., 1997; Chandel & Schumacker, 2000), um eine Schädigung des Organismus durch Sauerstoffmangel zu verhindern. Ein O_2 -sensitives Regulationssystem, das über spezielle chemosensitive Zellen verfügt, hält den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im Blut und Gewebe konstant (Lopez-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999). Zu diesen chemosensitiven Zellen gehören auch die paraganglionären Zellen. Paraganglien fungieren als Warn- und Abwehrsystem gegen Sauerstoffmangel (Kummer, 1996; Kummer et al., 2000; Prabhakar, 2001). Sie messen kontinuierlich den pO_2 und initiieren bei Hypoxie adaptive Reaktionen des Körpers, wie die reflektorische Hyperventilation und Katecholaminfreisetzung (Czyzyk-Krzeska, 1997; Höhler et al., 1999). Es werden die retroperitonealen Paraganglien, zu denen als Sonderform das Nebennierenmark gehört, und die Glomera unterschieden (Kummer, 1996). Während der fetalen Entwicklung und während des hypoxischen Stresses zum Zeitpunkt des Geburtsvorgangs ist die Ausschüttung von kreislaufaktivierenden Katecholaminen aus dem Nebennierenmark für den Fetus lebenswichtig (Lagercrantz, 1996). Paraganglien sind durch das Vorkommen zweier Zelltypen charakterisiert. Die Hauptzellen, auch als Typ I-Zellen bezeichnet, speichern in ihren sekretorischen Vesikeln Katecholamine und Serotonin sowie weitere Inhaltsstoffe, die unter Hypoxie freigesetzt werden. Diese Typ I-Zellen werden von den Ausläufern der Hüllzellen (Typ II-Zellen) bedeckt (Kummer, 1996).

Die von Greene und Tischler (1976) aus dem Nebennierenmark der Ratte isolierte Tumorzelllinie (PC12-Zellen) weist eine hohe Sensitivität gegenüber O_2 -Schwankungen auf und stellt daher ein Modellsystem für O_2 -chemosensitive Zellen (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a) dar, das die Forschung der Hypoxieantwort auf molekularer und zellulärer Basis (Czyzyk-Krzeska, 1997) ermöglicht. Sie entsprechen den O_2 -sensitiven Typ I-Zellen morphologisch. In beiden Zelltypen führen hypoxische Bedingungen zu einer Hemmung von K^+ -Kanälen (Buckler et al., 1999; Conforti & Millhorn, 2000), die eine Membrandepolarisation und einen Ca^{2+} -Einstrom induzieren (Lopez-Barneo, 1988; Lopez-Barneo, 1996). Es kommt zu einer verstärkten Tyrosinhydroxylase-Genexpression (Czyzyk-Krzeska et al., 1992; Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Spicer & Millhorn, 2003) und zur Dopaminausschüttung (Czyzyk-Krzeska et al., 1992). Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist

das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminbiosynthese (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a). In PC12-Zellen führt Hypoxie ebenso zu einer Zunahme der Expression von Adrenomedullin (ADM) (Martinez et al., 2003). Das ursprünglich aus menschlichen Phäochromozytomen isolierte ADM (Kitamura et al., 1993) agiert als multifunktionelles regulatorisches Peptid. Es besitzt vielfältige Funktionen als Vasodilatator (Nuki et al., 1993), Bronchodilatator (Kanazawa et al., 1994), Wachstumsfaktor (Miller et al., 1996), Regulator der Hormonsekretion (Martinez et al., 1996), Neurotransmitter (Allen & Ferguson, 1996) und antimikrobielles Agens (Allaker et al., 1999) und fungiert als regulatorisches Peptid in der Elektrolythomöostase der Niere (Jougasaki & Burnett, 2000). Es wird in vielen Zellarten einschließlich Typ I-Glomuszellen exprimiert (Martinez et al., 2003).

Bei Sauerstoffmangel kommt es zu adaptiven Reaktionen des Körpers. Dazu gehören die reflektorische Hyperventilation und Katecholaminfreisetzung (Czyzyk-Krzeska, 1997; Lopez-Barneo et al., 1997). Trotz zunehmender Erkenntnisse über die Hypoxie-induzierten zellulären Reaktionen ist die molekulare Identität des Sauerstoffsensors bislang noch nicht erforscht, es gibt jedoch eine Reihe vorgeschlagener Kandidaten als mögliche Sauerstoffsensoren (Chandel & Schumacker, 2000; Acker & Acker, 2000; Kummer & Yamamoto, 2002).

Es gibt verschiedene Erkenntnisse, die für eine Beteiligung der ein Hämprotein und drei Eisenschwefelcluster enthaltenden Succinatdehydrogenase (SDH), die gleichzeitig Komplex II der mitochondrialen Atmungskette darstellt, im Sauerstoffsensormechanismus sprechen. In Typ I-Zellen des Glomus caroticum sind Mutationen der Komplex II-Proteine Ursache für familiäre Tumoren, die das Hypoxie-induzierte Wachstum des Glomusorgans nachahmen (Baysal et al., 2000; Niemann et al., 2003). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass Komplex II eine entscheidende Rolle im Sauerstoffsensormechanismus zukommen könnte (Baysal et al., 2000; Giomez-Roqueplo et al., 2001a+b; Baysal et al., 2003).

Mitochondrien sind für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg in PC12-Zellen verantwortlich. Dies konnte in einer vorangegangenen Studie anhand von Thiamphenicol-behandelten PC12-Zellen (T-PC12-Zellen) gezeigt werden (Sell, 2001). Thiamphenicol hemmt speziell die mitochondriale Proteinbiosynthese (Kuzela et al., 1988). Die T-PC12-Zellen zeigten keine vermehrte ROS-Produktion unter Hypoxie. In Experimenten von Kummer und Mitarbeitern (2003) konnte der Hypoxie-bedingte TH-mRNA-Anstieg nicht durch Radikalfänger unterbunden werden. Thiamphenicol-behandelte PC12-Zellen, die

keine Hypoxie-induzierte ROS-Bildung zeigen, antworteten weiterhin mit einer Zunahme der TH-mRNA unter Hypoxie (Kummer et al., 2001). Komplex II wird als Einziger der vier Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette allein vom Kerngenom kodiert (Lombardo et al., 1990; Oostveen et al., 1995), d.h. er bleibt in T-PC12-Zellen intakt. Da die T-PC12-Zellen weiterhin mit einer Zunahme der TH-mRNA unter Hypoxie reagierten, ist eine Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-induzierten Transkription der TH-mRNA denkbar.

In PC12-Zellen konnte eine Hypoxie-induzierte Zunahme der TH- (Czyzyk-Krzeska et al., 1992; Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Spicer & Millhorn, 2003) und ADM-Genexpression gezeigt werden (Martinez et al., 2003). Höhler und Mitarbeiter (1999; 2000) beobachteten in PC12-Zellen einen Hypoxie-bedingten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), der mit der Zunahme der TH-Expression korreliert, jedoch nicht durch diese induziert wird. Eine Hypoxie-bedingte ROS-Zunahme konnten auch Duranteau et al. (1998) und Chandel et al. (1998) in der Hepatomzelllinie Hep3B nachweisen. Einige Wissenschaftler stellten einen Zusammenhang zwischen ROS und der Stabilisation des Transkriptionsfaktors HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) fest (Salceda & Caro, 1997; Wiesener et al., 1998; Wartenberg et al., 2003). ROS sind hiernach als second messenger an der Stimulation der Gentranskription durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF beteiligt (Chandel et al., 2000). Diese Annahme ist aber nicht unumstritten, so gehen beispielsweise Huang und Mitarbeiter (1996) davon aus, dass die HIF-1 α -Stabilisierung durch ROS unterdrückt wird.

Experimente verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Bildung von ROS an Komplex I (Batandier et al., 2004) und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (Chandel et al., 2000b; Chen et al., 2003). Paddenberg und Mitarbeiter (2003) konnten Komplex II in glatten Muskelzellen von Lungengefäßen als Quelle der hypoxisch-induzierten ROS-Produktion demonstrieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob Komplex II in PC12-Zellen eine Rolle in der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion und im Anstieg der TH- und ADM-mRNA spielt. Die vermehrte Transkription der TH- und ADM-mRNA wurde anhand der quantitativen RT-PCR gemessen. Die ROS-Produktion wurde nach Zugabe des Fluoreszenzindikators 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF-DA) am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die PC12-Zellen wurden vor Durchführung der quantitativen PCR mit verschiedenen Komplex II-Inhibitoren sechs Stunden unter Normoxie und Hypoxie inkubiert.

Es wurden folgende Inhibitoren eingesetzt: Diphenyleneiodonium (DPI), 2'-Thenoyltrifluoroazeton (TTFA) und 3'-Nitropropionsäure (3-NPA). DPI bindet irreversibel an die Flavoprotein-Komponente von Flavoenzymen, die Bestandteil von Komplex I und II sind, und inhibiert dort den Elektronentransfer (Tew, 1993). Der genaue Mechanismus des Komplex II-Inhibitors TTFA ist noch nicht erforscht. Es wird angenommen, dass TTFA den Elektronentransfer vom Eisenschwefelzentrum S-3 zum Quinonakzeptor blockiert (Yang et al., 1998). 3-NPA wird durch die SDH oxidiert, dieses Oxidationsprodukt führt zur irreversiblen Hemmung der Untereinheit A des Komplexes II (Lopez et al., 1997; Andreassen et al., 2000). Zudem wurde eine Inkubation mit dem Substrat Succinat im Überschuss durchgeführt, um eine mögliche Umkehrreaktion der SDH zur Fumaratreduktase unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Succinat stellt unter Normoxie das Substrat der SDH dar (Hägerhall & Hederstedt, 1996). Nach der Hypothese einer Hypoxie-induzierten Umkehrreaktion der SDH zur Fumaratreduktase würde Succinat das Endprodukt darstellen und daher bei einer Zugabe im Überschuss zu einer Hemmung der Fumaratreduktase führen. Dieser vermutete „Switch“ in der katalytischen Aktivität des mitochondrialen Komplexes II von der Succinatdehydrogenase zur Fumaratreduktase wurde von Paddenberg und Mitarbeitern (2003a) an Lungengefäßen und kürzlich von Henrich et al. (2004) in sensorischen Neuronen der Ratte gezeigt.

Zur Untersuchung der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion in PC12-Zellen sowie einer möglichen Beteiligung von Komplex II bei der intrazellulären ROS-Bildung, wurden die PC12-Zellen nach Zugabe des Fluoreszenzindikators DCF-DA und unter Einsatz verschiedener Komplex II-Inhibitoren (DPI, TTFA, 3-NPA) sowie mit dem Substrat Succinat und dem Radikalfänger Nitrobluetetrazolium (NBT) eine Stunde unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Anschliessend wurde die intrazelluläre ROS-Bildung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2 Literaturübersicht

2.1 Hypoxie-gesteuerte Transkriptionsantwort (HIF/Prolylhydroxylasen)

2.1.1 HIF-1-Familie

Ein großer Schritt bei der Erforschung O₂-sensitiver Regulationsmechanismen war die Identifizierung von HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1) als Hauptregulator der O₂-abhängigen Genexpression (Wang & Semenza, 1995; Semenza, 1999; Semenza 2000a). Als spezifische Antwort auf Hypoxie erfolgt eine Hochregulierung spezifischer Gene, die notwendig sind, um die O₂-Homöostase aufrecht zu erhalten. HIF-1 fungiert beim Zusammenspiel der O₂-abhängigen Faktoren als Dirigent.

Die beiden Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α – letzterer auch als EPAS 1 (endotheliales PAS Protein 1, Tian et al., 1997), MOP2 („members of the PAS superfamily“, Hogenesch et al., 1997) oder HLF („HIF-1 α like factor, Ema et al., 1997) bezeichnet - gehören zur Unterfamilie der basic-helix-loop-helix (bHLH) Proteine, die eine bestimmte charakteristische Sequenz - PAS (Per, ARNT, Sim) - Domäne genannt - besitzen (Semenza, 1999; Wenger, 2002).

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein Heterodimer (Wang & Semenza, 1995) und besteht aus zwei Untereinheiten, einer 120 kDa HIF-1 α - bzw. HIF-2 α - und einer 91-94 kDa HIF-1 β -Untereinheit (Wang & Semenza, 1995), wobei HIF-1 β identisch mit dem sogenannten Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) ist (Wood et al., 1996).

Die PAS-Domäne ermöglicht die Heterodimerisation von HIF-1 α /2 α mit ARNT (Semenza 2001; Wenger 2002; Makino et al., 2001).

HIF-1 α verfügt über zwei Hypoxie-sensitive transkriptionale Aktivierungsdomänen: Die COOH-terminale Transaktivierungsdomäne (CAD) und die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODD) (Huang et al., 1998; Bruick & McKnight, 2001; Lando et al., 2002). HIF-2 α ist zu 48 % identisch mit HIF-1 α und kann ebenfalls mit ARNT heterodimerisieren und die Transkription von vergleichbaren DNA-Erkennungsstellen aktivieren. Für HIF-2 α wurde eine der HIF-1 α entsprechende ODD beschrieben (O'Rourke et al., 1999). Die TH-Genexpression in PC12-Zellen wird primär durch HIF-2 α reguliert (Favier et al., 1999; Spicer & Millhorn, 2003).

Es wurde neben HIF-1 α und HIF-2 α eine weitere Isoform der α -Untereinheit identifiziert, die ebenfalls mit ARNT dimerisieren kann: HIF-3 α (Gu et al., 2000; Hara et al., 2001). HIF-2 α und HIF-3 α zeichnen sich gegenüber dem ubiquitär vorkommenden HIF-1 α durch eine restriktivere Gewebsexpression aus (Wenger, 2002). Maynard et al. (2003) konnten auch für HIF-3 α eine Interaktion mit dem von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) nachweisen.

2.1.2 HIF-1 α -Aktivierung

HIF-1 α wird unter hypoxischen Bedingungen nicht auf Transkriptionsebene, sondern über Proteinstabilisierung reguliert (Wenger & Gassmann, 1997).

Hypoxie bewirkt die intrazelluläre Stabilisierung von HIF-1 α bzw. HIF-2 α , welches anschließend in den Zellkern transportiert wird (Kallio et al., 1999). Dies geschieht unabhängig von HIF-1 β , welches konstitutiv im Zellkern vorkommt. Im Zellkern angekommen, heterodimerisiert HIF-1 α (HIF-2 α) mit HIF-1 β und der daraus resultierende HIF-1-Komplex bindet an spezifische Basensequenzen der HIF-1-Bindungsstelle (HBS), von O₂-regulierten Genen. Diese Basensequenz lautet für HIF-1 α : 5'-RCGTG-3' (Wenger & Gassmann, 1997; Camenisch et al., 2001).

Die HBS stellt die Kernsequenz des Hypoxieantwortelements (HRE) dar. Das HRE steuert die Feinregulierung der HIF-1-abhängigen Zielgene. Für eine erhöhte Transkriptionsrate der HIF-1 Zielgene ist die Phosphorylierung von HIF-1 α bzw. HIF-2 α essenziell (Richard et al., 1999).

Zur Zeit sind 25 Zielgene für HIF-1 α bekannt (Semenza, 2000a; Hofer et al., 2002). Für HIF-2 α konnte kürzlich Erythropoietin als Zielgen in Hep3B-Zellen identifiziert werden (Warnecke et al., 2004), ebenso konnte eine Korrelation zwischen HIF-2 α und dem endothelialen Gefäßwachstumsfaktor (VEGF) sowie seinem angiogenetischen Rezeptor (VEGFR-2) nachgewiesen werden (Bangoura et al., 2004; Tuomisto et al., 2004). Darüber hinaus sind bisher keine Zielgene für HIF-2 α bekannt (Fedele et al., 2002), es werden aber ähnliche Zielgene wie für HIF-1 α vermutet.

2.1.3 HIF-1 α -Abbau

Das HIF-1 α Protein wird konstitutiv synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen über die Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade gleich wieder abgebaut (Salceda & Caro 1997; Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Ein O₂-abhängiger proteosomaler Abbau unter Beteiligung des pVHL wurde auch für HIF-2 α beschrieben (Takahashi et al., 2004).

Spezifische Prolylhydroxylasen sind an der Regulation der Stabilisierung von HIF-1 α maßgeblich beteiligt. Sie benötigen Eisen als Kofaktor und Sauerstoff sowie 2-Ketoglutarat als Kosubstrat (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

Unter Normoxie werden zwei spezifische Prolinreste (Pro-402 und Pro-564) kontinuierlich durch diese Prolylhydroxylasen in der O₂-abhängigen Degradationsdomäne (ODD) hydrolysiert (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001; Masson et al., 2001; Yu et al., 2001; Lando et al., 2002; Lando et al., 2003). Analoge Prolylreste sind für HIF-2 α (p531) und HIF-3 α bekannt.

Durch diese normoxische Prolylhydroxylierung wird die Assoziation des pVHL und HIF-1 α bzw. HIF-2 α innerhalb der ODD ermöglicht. Das pVHL beinhaltet eine Ubiquitinligase, welche HIF-1 α bzw. HIF-2 α ubiquitiniert. Die so markierten HIF-1 α - oder HIF-2 α - Moleküle werden durch Proteasomen abgebaut (Salceda & Caro, 1997; Kallio et al., 1999; Maxwell et al., 1999; Cockmann et al., 2000; Tanimoto et al., 2000).

Es wird angenommen, dass bei Hypoxie der Prolylhydroxylase ausreichend O₂ fehlt, so dass keine Ubiquitinierung erfolgen kann. HIF-1 α (HIF-2 α) wird nicht abgebaut und wandert in den Kern. Hier aktiviert es nach Heterodimerisierung mit HIF-1 β die entsprechenden Zielgene (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

2.1.4 HIF-1 α transkriptionale Aktivierung

Voraussetzung für die hypoxische Induktion der HIF-1 α - und HIF-2 α -Funktion sind zwei Schritte: 1) Die Inhibition der sauerstoffabhängigen Prolyl-4-Hydroxylierung in der ODD, um die Assoziation mit dem pVHL-Ubiquitin-Ligase-Komplex zu unterbinden und damit den folgenden Abbau der HIF- α -Moleküle durch die Ubiquitin-Proteasom-Kaskade zu verhindern. 2) Die Inhibition der sauerstoffabhängigen Asparaginyhydroxylierung in der ODD, um die Interaktion mit dem Kofaktor CBP/p300 zu ermöglichen (Ema et al., 1999; Fedele et al., 2002). Die Inhibition der sauerstoffabhängigen Hydroxylierung des Asparagins (Asn) N803 von HIF-1 α (bzw. N851 von HIF-2 α) in der CAD-Region unter Hypoxie unterstützt die Interaktion mit dem Koaktivator p300/CBP (Arany et al., 1996;

Kallio et al., 1998) und induziert die Transkription (Lando et al., 2002). Diese Hydroxylierung stellt einen immens wichtigen Schritt im Regulationsmechanismus der intrazellulären Sauerstoffmessung da und wurde von Lando und Mitarbeitern (2002) als „hypoxic switch“ bezeichnet. Die diese Reaktion katalysierende Asparaginyhydroxylase, auch als „Factor-inhibiting HIF1“ (FIH) bezeichnet (Hewitson et al., 2002), gehört zur Familie der Fe (II)-und 2-Ketoglutarat-abhängigen Familie der Dioxygenasen (Lando et al., 2002).

Darüber hinaus ist die Beteiligung eines Redoxfaktors (Ref-1) bei der Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 bekannt. Ref-1 reagiert mit einem Cysteinrest in der CAD von HIF-1 α (Semenza, 2001).

Neben den postulierten Prolylhydroxylasen und Asparaginyhydroxylasen als mögliche Sauerstoffsensoren und Mediatoren wird auch eine Beteiligung anderer Komponenten für die HIF-1 α und HIF-2 α -Regulation vermutet. So wurde z.B. eine Beteiligung von Zytokinen über den Phosphatidylinositol-3'-Kinase-Weg gezeigt (Semenza, 2002). Ebenso wird eine Involvierung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Aktivierung von HIF-1 α diskutiert, wobei umstritten ist, ob sie die HIF-1 α -Stabilisierung induzieren (Chandel et al., 2000) oder unterdrücken (Huang et al., 1996).

HIF-1 α und HIF-2 α sind essenziell in der embryonalen Entwicklung. HIF-1 α defiziente Mäuseföten (Gassmann et al., 1998) sterben intrauterin (Iyer et al., 1998). Sie besitzen ein unzureichend ausgebildetes Blutgefäßsystem und zeigen multiple Defekte in der kardiovaskulären Entwicklung, wodurch es zu einer globalen Hypoxie kommt (Ryan et al., 1998).

HIF-2 α wird im Zuckerandlorgan, dem größten retroperitonealen Paraganglion, exprimiert. Dieses Organ ist die erste Quelle der embryonalen Katecholaminproduktion. Embryos des ersten berichteten HIF-2 α -defizienten Stammes sterben intrauterin. Sie verfügen über ein normal ausgebildetes Gefäßsystem, zeigen aber eine ungenügende Lungenreifung sowie eine sehr niedrige Herzfrequenz infolge einer zu geringen Produktion an Katecholaminen (Tian et al., 1998). Die ubiquitäre HIF-1 α -Expression kann einen HIF-2 α -Defizit in der embryonalen Entwicklung nicht kompensieren. Es gibt einen weiteren HIF-2 α defizienten Stamm, der die Fetalperiode überlebt. Diese Mäuse sterben erst nach der Geburt am neonatalen Atemnotsyndrom, das auf eine verminderte VEGF-Produktion im Alveolarepithel zurückzuführen ist und so zu einer unzureichenden Surfactantbildung führt (Compernelle et al., 2002).

Neben der embryonalen Entwicklung spielen HIF-1 α und HIF-2 α eine wichtige Rolle in der Tumorphathogenese. So wird eine erhöhte Bildung des HIF-1 α -Proteins in malignen Tumoren und Tumormetastasen gefunden (Blancher et al., 2000; Beasley et al., 2002). Die

von Hippel-Lindau-Erkrankung wird durch Mutationen im VHL-Gen verursacht. Es handelt sich dabei um ein familiäres Krebsyndrom, das durch multiple Tumoren (Blutgefäßsystem, Retina, zentrales Nervensystem, Leber, Niere, Pankreas) charakterisiert ist (Iliopoulos et al., 1995).

2.2 Sauerstoffsensormodelle

2.2.1 Prolylhydroxylasen-Hypothese

Der in der Hypoxieantwort eine große Rolle spielende Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Semenza, 1999) wird konstitutiv synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen über die Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade direkt wieder abgebaut (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999; Salceda & Caro 1997). Untersuchungen über den Mechanismus des Abbaus der HIF-1 α -Untereinheit identifizierten HIF-Prolylhydroxylasen. Sie benötigen Eisen als Kofaktor und Sauerstoff sowie 2-Ketoglutarat als Kosubstrat (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001). Unter Normoxie hydroxylieren diese Prolylhydroxylasen zwei spezifische Prolinreste in der sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (ODD) von HIF-1 α bzw. HIF-2 α und ermöglichen so die spezifische Interaktion des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Proteins (pVHL) mit HIF-1 α bzw. HIF-2 α . Einige Wissenschaftler postulieren ein sauerstoffabhängig arbeitendes Prolylhydroxylasensystem als Sauerstoffsensorkandidat. Die im pVHL enthaltene Ubiquitinligase markiert HIF-1 α /HIF-2 α durch das Anhängen von Ubiquitin, so dass ein Abbau durch Proteasomen erfolgt (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Es wird angenommen, dass unter hypoxischen Bedingungen der Prolylhydroxylase eine ausreichende Menge an Sauerstoff fehlt, so dass keine Ubiquitinierung erfolgt und es nicht zur Aktivierung der Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade kommt (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

Ein homologes HIF-VHL-Prolylhydroxylasensystem existiert in *Caenorhabditis elegans*. In diesem Nematoden wurde die Prolylhydroxylase EGL-9 (Egg Laying Abnormal-9) identifiziert (Epstein et al., 2001). In der Ratte ist die Prolylhydroxylase SM-20 bekannt (Wax et al., 1994; Darby et al., 1999). Das menschliche Genom enthält EGL-9 Homologe, die drei Prolylhydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 (Epstein et al., 2001; Bruick & McKnight, 2001; Ivan et al., 2002; Hirsilä et al., 2003). Neben den Prolylhydroxylasen ist eine Asparaginylhydroxylase (FIH, Factor inhibiting HIF1) in den HIF-Mechanismus involviert. Diese Asparaginylhydroxylase hydrolysiert unter Normoxie sauerstoffabhängig spezifische Asparaginreste von HIF-1 α bzw. HIF-2 α (Lando et al., 2002). Unter Hypoxie wird diese Reaktion gehemmt und nach Interaktion mit dem Koaktivator p300/CBP (Arany et al.,

1996; Kallio et al., 1998) die Transkription induziert. PHD1 kommt ausschliesslich im Nukleus vor, PHD2 und FIH-1 sind im Zytoplasma und PHD3 im Zytoplasma und im Kern lokalisiert. Prolylhydroxylasen und FIH-1 bilden daher vermutlich eine Sauerstoffsensorkaskade unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation (Metzen et al., 2003). Die Sauerstoffabhängigkeit der Hydroxylaseaktivität führte zu der Annahme, dass diese Proteine möglicherweise als primäre Sauerstoffsensoren fungieren könnten (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

2.2.2 Ionenkanal-Hypothese

Lopez-Barneo und Mitarbeiter (1988) fanden heraus, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen durch Hypoxie verringert werden kann. Es wurde in verschiedenen Zelltypen eine ganze Reihe von O_2 -sensitiven K^+ -Kanälen nachgewiesen (Buckler, 1997, Lopez-Barneo et al., 1997), die auch innerhalb verschiedener Spezies variieren (Lopez-Barneo et al., 1996). Es ist unumstritten, dass die Ionenströme in verschiedenen Zelltypen durch die Sauerstoffkonzentration zu beeinflussen sind. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die Ionenkanäle selbst als direkter O_2 -Sensor fungieren, oder ob die Veränderung der Ionenströme als Reaktion auf einen ausserhalb der Ionenkanäle liegenden O_2 -Sensor entsteht. Die Annahme eines nahegelegenen O_2 -Sensor wird durch Experimente unterstützt, die zeigen, dass O_2 -sensitive Ionenkanäle durch Oxidations- und Reduktionsmittel beeinflusst werden können (Fearon et al., 1999).

Es gibt auch Hinweise, die für die Beteiligung eines membranassoziierten Prozesses bei der Messung der O_2 -Konzentration durch Ionenkanäle sprechen. So reagieren Ionenkanäle, die durch die Patch-clamp-Methode in isolierten Membranabschnitten ohne anhängende Zellen untersucht wurden, immer noch sensibel auf Veränderungen in der O_2 -Konzentration (Perez-Garcia et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe von Rustenbeck et al. (1999) lieferte eine alternative Interpretation zu dieser Thematik. Sie konnte in Experimenten an Typ B-Zellen des Pankreas nachweisen, dass bei der Patch-clamp-Methode auch Mitochondrien am isolierten Membranstück haften bleiben können. Da die Öffnungswahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen Kaliumkanälen durch mitochondriale Hemmstoffe beeinflusst werden kann, weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass Mitochondrien am O_2 -Sensormechanismus beteiligt sind und mit Ionenkanälen eine funktionelle Einheit bilden.

Das wissenschaftliche Interesse gilt derzeit den „Zwei-Poren-Domänen-K⁺-Kanälen“ (Patel & Honore, 2001). Zu ihrer Familie gehören u.a. TASK1, 2, 3, und TWIK-1. Diese Kanäle verfügen über vier transmembrane Segmente und zwei Porendomänen (Buckler et al., 2000) und bestimmen das Ruhepotenzial von Zellen. Die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle wird durch verschiedene physikalische und chemische Stimuli, u.a. auch durch O₂ und den pH-Wert, beeinflusst (Patel & Honore, 2001), was für ihre Beteiligung im Sauerstoffsensormechanismus spricht.

Buckler und Mitarbeiter (2000) identifizierten im Glomus caroticum der Ratte TASK-ähnliche K⁺-Kanäle. Auch in Typ II-Zellen des Glomus caroticum der Ratte und in Nervenfasern konnten TASK1 nachgewiesen werden (Kummer & Yamamoto, 2002).

2.2.3 Hämprotein-Hypothese

Diese Hypothese schlägt ein Hämprotein als primären O₂-Sensor vor und geht davon aus, dass das Hämprotein direkt O₂ binden und eine O₂-abhängige Konformationsänderung durchführen kann. In der Anwesenheit von Sauerstoff liegt das Hämprotein in oxidiertem Zustand vor und ist inaktiv. Unter Hypoxie wird das Hämprotein deoxidiert und in seine aktive Form überführt, so dass es das Signal „Hypoxie“ weiterleiten kann (Semenza, 1999).

Ihren Ursprung findet diese Hypothese in Untersuchungen, die an Bakterien und Hefen durchgeführt wurden. Proteine, die ein Eisenzentrum tragen, unterliegen sauerstoffabhängigen Konformationsänderungen, die ihre Aktivität regeln. Im Bakterium *Rhizobium meliloti* wurde das Häm-tragende FixL/FixJ System als Sauerstoffsensoren identifiziert (Monson et al., 1992; Gilles-Gonzales et al., 1995).

Es werden in der Hämprotein-Hypothese eine mitochondriale Komponente der Atmungskette oder ein nichtmitochondriales Protein wie die NADPH-Oxidase diskutiert (Acker & Acker, 2004).

In dieser Hypothese werden unter anderem mitochondriale Cytochrome als mögliche Sauerstoffsensorkandidaten vorgeschlagen. Mitochondrien von Glomuszellen reagieren empfindlicher auf Änderungen im Sauerstoffangebot als Mitochondrien in Neuronen der Spinalganglien (Biscoe et al., 1989). Hypoxie führt zu mitochondrialer Depolarisation in Glomuszellen. Spezifische Inhibitoren (Antimycin A) der Atmungskette unterbinden die sensorische Antwort auf Hypoxie, jedoch nicht auf CO₂ (Mulligan & Lahiri, 1982). Auch Kohlenmonoxid (CO) hat einen stimulatorischen Effekt (Lahiri et al., 1999). Diese Studien

unterstützen die mitochondriale Rolle in der Transduktion. Es bleibt jedoch unklar, wie der Wechsel des Oxidationszustandes im mitochondrialen Cytochrom mit dem Aktivitätsanstieg afferenter Nerven verbunden ist (Prabhakar, 2000).

Hohe Konzentrationen an CO hemmen auch die Aktivität anderer Häm-tragender Enzyme, v.a. der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) (Prabhakar, 1999). Stickstoffmonoxid (NO) wird endogen von Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) gebildet. Die Bildung erfolgt sauerstoffabhängig und bedarf der Bindung an Hämliganden. NOS1 und NOS3 werden in afferenten Nervenfasern und in Blutgefäßen des Glomus caroticum exprimiert (Prabhakar, 1999). NO-Donoren bewirken einen Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und blockieren Ca^{2+} -Kanäle (v.a. L-Typ Ca^{2+} -Kanäle) in Glomuszellen (Prabhakar, 1999; Summers et al., 1999). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass ein Hämprotein als Sauerstoffsensorkandidat in Frage kommt.

Ein weiterer Hinweis für die Hämproteinhypothese basierte auf Beobachtungen von Reaktionen auf Kobaltchloridinjektionen (CoCl_2) bei Ratten. Diese induzierten die Erythropoetinsekretion (EPO) und führten zur Polyzythämie (Goldwasser et al., 1958). EPO wird unter Hypoxie in Leber und Niere synthetisiert und stimuliert die Bildung der roten Blutkörperchen.

In Hepatomzelllinien führte die Behandlung mit CoCl_2 zu einem dosisabhängigen Anstieg der Erythropoetin-mRNA unter normoxischen Bedingungen. Eine Begasung mit Kohlenmonoxid (10%) unter Hypoxie verhinderte die Induktion von EPO.

CO ist ein physiologisch stabiles Molekül, welches mit Hämgruppen interagieren kann. Goldberg und Mitarbeiter (1988) gehen von der Annahme aus, dass Co^{2+} anstelle von Fe^{2+} in ein Hämprotein eingebaut wird. Das Hämprotein wird durch den Einbau von Co^{2+} bzw. die Interaktion mit CO in einen deoxygenierten Zustand überführt und fungiert so als O_2 -Sensor, der das Hypoxiesignal weiterleitet. Co^{2+} ahmt nach dieser These den Hypoxieeffekt nach. CO und Co^{2+} führen durch eine Konformationsänderungen des Hämproteins zu einer Stimulation der EPO-Produktion. Experimente von Srinivas und Mitarbeitern (1998) stellen die Annahme in Frage, dass Hämproteine am O_2 -Sensormechanismus beteiligt sind. Chandel & Schumacker (2000) schließen auf Grund von Srinivas' Experimenten ein Hämprotein als möglichen O_2 -Sensor nicht aus, bezweifeln aber, dass Co^{2+} die Situation unter Hypoxie nachahmt.

2.2.4 NADPH-Oxidase-Hypothese

Die NADPH-Oxidase-Hypothese stellt eine Erweiterung der Hämprotein-Hypothese da. Das NADPH-Oxidasesystem der Phagozyten besteht aus einem membrangebundenen Flavoprotein Cytochrom b558, das den katalytischen Komplex bildet. Dieser besteht aus einer gp91phox und der p22phox Untereinheit. Die zytosolische regulatorische Komponente beinhaltet die Faktoren p47phox und p67phox. Neben dem katalytischen Komplex und der zytosolischen Komponente besitzt die NADPH-Oxidase andere regulatorische Untereinheiten, wie die GTPase Proteine Rac-1 oder Rac-2 (Babior, 1999; Chandel & Schumacker, 2000; Acker & Acker, 2004). Die NADPH-Oxidase (NOX2) der neutrophilen Granulozyten reduziert molekularen Sauerstoff in das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$, das zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Die gebildeten ROS werden zur Abwehr pathogener Mikroorganismen eingesetzt (Karnovsky, 1994; Babior, 1999). 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).

Immunhistochemisch wurden beide b558 Cytochrom-Untereinheiten sowie die zytosolischen Komponenten (gp47phox, p67phox) des überwiegend intrazellulär lokalisierten NADPH-Oxidase Komplexes in Glomuszellen von Ratte, Mensch und Meerschweinchen identifiziert (Kummer & Acker, 1995). Das Vorkommen der NADPH-Oxidasen ist nicht auf Phagozyten und Glomuszellen beschränkt (Kummer & Acker, 1995). Verschiedene Proteinkomponenten der NADPH-Oxidase konnten in pulmonalen glatten Muskelzellen, in Endothelzellen (Görlach, 2000) sowie in sensiblen Neuronen der Ratte nachgewiesen werden (Dvorakova et al., 1999). In PC12-Zellen wurden mittels der RT-PCR Transkripte der beiden Untereinheiten gp91phox und gp22phox des Cytochroms b558 nachgewiesen (Kummer & Yamamoto, 2002).

Acker & Xue (1995) vermuteten, dass es sich bei dem zunächst nur im Glomus caroticum photometrisch postulierten Cytochrom b (Acker et al., 1989) um ein plasmalemmales Hämprotein handelt, welches Ähnlichkeit mit dem Cytochrom b558 der NADPH-Oxidase von Neutrophilen und Makrophagen aufweist. Sie postulierten, dass diese das Cytochrom b558 enthaltende NADPH-Oxidase sauerstoffabhängig H_2O_2 produzieren kann, das die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und die Expression bestimmter Gene, wie z.B. EPO, reguliert (Acker 1994; Acker & Xue, 1995).

Auch in Neuroepithelkörperchen der Lunge konnte ein Cytochrom b nachgewiesen werden (Youngson et al., 1993), das als Bestandteil der NADPH-Oxidase vermutet wurde.

Wang und Mitarbeiter (1996) griffen diese Hypothese auf und erweiterten diese durch weitere Experimente. Sie vermuteten, dass es sich bei den Neuroepithelkörperchen der Lunge um chemosensitive Zellen handelt, die über eine sauerstoffsensitive NADPH-Oxidase verfügen, die in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H_2O_2 bildet und an der Regulierung H_2O_2 -abhängiger Kaliumkanäle beteiligt ist.

Verschiedene Arbeitsgruppen zweifelten an der Funktion der NADPH-Oxidase-Hypothese als O_2 -Sensor chemosensitiver Zellen. So konnten Wenger und Mitarbeiter (1996) bei an chronischer Granulomatose erkrankten Patienten nachweisen, dass die phagozytäre NOX2 nicht mit einer Hypoxie-bedingten EPO- oder VEGF-Produktion in Zusammenhang steht. Die chronische Granulomatose wird durch einen genetischen Defekt der NADPH-Oxidase verursacht, der durch die fehlende O_2^- - und H_2O_2 -Bildung zu einer Störung der intrazellulären Keimabtötung in den Granulozyten führt. Eine B-Zelllinie von Patienten mit chronischer Granulomatose war immer noch in der Lage, adäquat auf Hypoxie mit einer Transkriptionssteigerung zu reagieren. EPO- und VEGF-mRNA wurde in normalen Mengen gebildet (Wenger et al., 1996).

Studien an gp91phox-defizienten Mäusen führten zu der Annahme, dass die phagozytäre NADPH-Oxidase für die Sauerstoffmessung im Glomus caroticum und in Lungengefäßen nicht relevant ist (Roy et al., 2000; He et al., 2002). Experimente von Sanders und Mitarbeitern (2002) an gp91phox- und gp47phox-defizienten Mäusen zeigten, dass weder die gp91phox- noch die p47phox-Komponente der phagozytären Oxidase relevant sind für die EPO-Expression unter Hypoxie. Im Gegensatz dazu lässt ein Verlust der Hypoxiesensitivität von Kaliumkanälen und DPI-Ansprechbarkeit in Zellen des Neuroepithelkörperchens von gp91phox-Nullmutanten vermuten, dass die NADPH-Oxidase und ROS am Sauerstoffsensormechanismus über die Regulation des Membranpotenzials beteiligt sind (Fu et al., 2000).

In Neuronen des Ganglion petrosum, aber auch in allen anderen sensorischen Ganglien der Ratte, konnte ein weitverbreitetes Vorkommen des Cytochroms b558 nachgewiesen werden (Dvorakova et al., 1999), wodurch eher auf eine allgemeine Funktion des Cytochroms b558 im Metabolismus von sensiblen Neuronen zu schliessen ist, als auf eine Funktion als O_2 -Sensor in chemorezeptiven Neuronen.

Acker und Xu (1995) gingen in ihrer NADPH-Oxidase-Theorie von einem plasmamembrangebunden Enzym aus. Untersuchungen von Youngson und Mitarbeitern (1997) an kultivierten Zellen des Glomus caroticum ergaben eine Lokalisation des Cytochroms b558 in der Plasmamembran oder im Zytoplasma der Zellen. In der Membran sekretorischer

Vesikel von Nebennierenmarkszellen konnte eine Untereinheit des Cytochroms b558 nachgewiesen werden (Kummer et al., 1999). Das subzelluläre Vorkommen des Cytochroms b558 in Vesikeln von Nebennierenmarkszellen stellt die Funktion der NADPH-Oxidase als O₂-Sensor in Frage.

Dvorakova et al. (2000) konnten in den Bindegewebssepten des Glomus caroticum Makrophagen nachweisen, welche die phagozytäre NADPH-Oxidase besitzen. Diese stellen die Hautquelle des Cytochroms b558 im Glomus caroticum der Ratte dar und erklären das von Cross et al. (1990) und Acker et al. (1992) gefundene spektrophotometrische Absorptionsmaximum von 558 nm im Glomus caroticum der Ratte. Somit ist die Hypothese, die auf Grund des Absorptionsmaximums im Glomus caroticum auf ein dort lokalisiertes als Sauerstoffsensor fungierendes Cytochrom b558 schließt, (Cross et al., 1990; Acker et al., 1992) in dieser Form nicht haltbar.

2.2.5 Mitochondrien-Hypothese

Verschiedene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen den von den Mitochondrien gebildeten ROS und dem O₂-Sensormechanismus (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998), wobei ROS primär unter chronischer Hypoxie eine Bedeutung als second messenger zukommt (Duranteau et al., 1998). Ihre Rolle wird jedoch kontrovers diskutiert. Forschungen an Kardiomyozyten mit dem spezifischen Fluoreszenzindikator 2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat (DCFH-DA) zeigten, dass die ROS-Konzentration in Kardiomyozyten unter Hypoxie zunimmt (Duranteau et al., 1998). Chandel und Mitarbeiter (1998) forschten zur gleichen Zeit an Hep3B-Zellen und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Hypoxie die Transkription von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen über eine Erhöhung mitochondrialer ROS aktiviert (Chandel et al., 1998). Andere Wissenschaftler beobachteten hingegen einen ROS-Abfall unter Hypoxie (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). In sensiblen Neuronen der Ratte konnte keine steigende ROS-Produktion unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (Henrich et al., 2001). Experimente verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Bildung von ROS an Komplex I (Batandier et al., 2004) und Komplex III (Chandel et al., 2000b; 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 als mitochondriale

Quelle der ROS-Produktion unter Hypoxie angenommen (Sell, 2001).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen ROS und dem Transkriptionsfaktor HIF zeigen (Salceda & Caro, 1997; Wiesener et al., 1998; Wartenberg et al., 2003). Es wird angenommen, dass ROS hier eine Rolle als second messenger in der Stimulation der Gentranskription durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF spielen (Chandel et al., 2000). Yuang et al. (2004) beobachteten in ihren Experimenten an PC12-Zellen unter intermittierender Hypoxie (IH) ebenfalls eine Zunahme der ROS-Bildung, v.a. von O_2^- , das eine wichtige Rolle bei der c-fos-Aktivierung spielt. Sie sehen in der Inhibition von Komplex I eine Quelle für die O_2^- -Bildung unter IH.

Yuang et al. (2004) gehen von einer Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies unter IH bei der c-fos-Aktivierung und der nachgeschalteten Genregulation aus. Höhler und Mitarbeiter (1999) stellen die Wichtigkeit von ROS in der Genaktivierung unter Hypoxie in Frage. Sie wiesen eine Hypoxie-bedingte ROS-Bildung in PC12-Zellen nach. Radikalfänger konnten die Hochregulierung der TH-mRNA jedoch nicht verhindern, so dass die TH-Gentranskription nicht durch ROS induziert wird. Die Ergebnisse von Yuang et al. (2004) und Höhler et al. (1999) führen zu der Annahme, dass unter chronischer Hypoxie möglicherweise andere Mechanismen als ROS an der Genregulation beteiligt sind.

Das Cytochrom a592 wurde als Komponente der Cytochrom c Oxidase des Glomus caroticums identifiziert, es besitzt im Gegensatz zu den anderen Cytochromen eine niedrige pO_2 - und hohe CN^- -Affinität (Streller et al., 2002). Ein Wechsel im Redoxzustand des Cytochroms a592 wird vermutlich durch die Bindung von O_2 , CN^- und CO an das Cytochrom a3-Cu_B Zentrum induziert. Es ist vorstellbar, dass das Cytochrom a592 an der Hypoxie-induzierten Signaltransduktionskaskade der Transmitterfreisetzung im Glomus caroticum beteiligt ist (Streller et al., 2002).

Es wird auch über eine Beteiligung von Komplex II (SDH) im Prozess der Sauerstoffmessung spekuliert. So beinhaltet die SDH ein Hämprotein und drei Eisenschwefelcluster (Hägerhall, 1997), die selbst als Sauerstoffsensorkandidaten diskutiert werden. Es wird angenommen, dass Eisenschwefelcluster wie das Hämprotein O_2 -abhängigen Konformationsänderungen unterliegen, die ihre Aktivität regulieren (Semenza, 1999).

Mutationen in SDH-D in familiären Glomustumoren werden als Paraganglioma Typ 1 klassifiziert (Baysal et al., 2000). Bei Paragangliomen vom Typ 3 liegt eine Punktmutation im Startcodon und ein Verlust der Heterozygotie vor. Immunhistochemisch wurde ein Verlust des SDH-C Proteins in Glomustumorzellen entdeckt, während dieses in Fibro-

blasten des Tumors nachweisbar war. Die Proliferation von Glomuszellen ist ein charakteristisches Merkmal für chronische Hypoxie. In Typ I-Zellen des Glomus caroticum sind also Mutationen des Komplex II-Proteins Ursache für familiäre Tumoren, die das Hypoxie-induzierte Wachstum des Glomusorgans nachahmen (Baysal et al., 2000; Niemann et al., 2003), dies unterstützt die Annahme einer Involvierung der SDH im Sauerstoffsensormechanismus.

Die molekulare Identität des Sauerstoffsensors wird noch diskutiert. Es gibt vermutlich mehrere Mechanismen und Wege, über die die Sauerstoffkonzentration reguliert wird. Es gibt Indikatoren, die für eine mitochondriale Rolle im Prozess der Sauerstoffmessung sprechen. Die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies im Sauerstoffsensormechanismus bleibt kontrovers.

2.3 Mitochondrium

2.3.1 Aufbau und Funktion des Mitochondriums

Mitochondrien sind semiautonome Organellen, denen essenzielle Funktionen im Zellstoffwechsel und der Regulation des apoptotischen Zelltods zukommen.

Die Hauptfunktion 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).

Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Die äußere, glatte Membran enthält das Transmembranprotein Porin, das unspezifische Poren bildet und kleinen Molekülen und bis zu 5 kDa großen Ionen den Durchtritt gewährleistet (Lloreta-Trull & Serrano, 1998). Die proteinreiche innere Mitochondrienmembran ist stark gefaltet und bildet Einstülpungen. In diese sind Enzyme und Redoxproteine, die den Elektronentransport und die oxidative Phosphorylierung katalysieren, integriert. Die innere Membran ist auf Grund des hohen Gehalts an dem membranstabilisierenden Cardiolipin für viele Metaboliten, polare Moleküle und die meisten Ionen impermeabel und ermöglicht nur Molekülen den Durchtritt, für die Transportproteine vorhanden sind (Capaldi, 1983; Hatefi, 1985; Pfeiffer et al., 2003)

Die innere Mitochondrienmembran umgibt die Matrix, die lösliche Enzyme des oxidativen Stoffwechsels, Substrate, Nukleotid-Kofaktoren, anorganische Ionen sowie den genetischen Apparat des Mitochondriums enthält (Capaldi, 1982).

Humane Mitochondrien besitzen ein 16,5 kb zirkuläres Genom, das 13 Proteine der oxidativen Phosphorylierung, ribosomale RNAs und Transfer-RNAs kodiert. Andere mitochondriale strukturelle und regulatorische Komponenten werden vom Kerngenom kodiert, im Zytoplasma synthetisiert und ins Mitochondrium transportiert (Poyton & McEwen, 1996; Suzuki et al., 1999; Lee & Wei, 2000).

2.3.2 Mitochondriale Atmungskette

Die Elektronentransportkette, auch Atmungskette genannt, besteht aus vier Multiprotein-komplexen (Capaldi et al., 1988). Die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat-Ubiquinon-Reduktase (Komplex II), die Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III) und die Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV) sind in der inneren mitochondrialen Membran aller Säugergewebe lokalisiert und transferieren Elektronen auf O₂. Es findet eine an den Elektronentransport gekoppelte Protonen-Translokation statt, die zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten führt. Dieser Gradient dient der ATP-Gewinnung (Capaldi et al., 1988, 1991) durch die ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte H⁺-ATPase (Komplex V) (Hatefi, 1985). ATP gilt als wichtigster Energiespeicher und -überträger des Intermediärstoffwechsels.

2.3.2.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (auch als NADH-Q-Dehydrogenase oder NADH-Dehydrogenase bezeichnet) katalysiert den ersten Reaktionsschritt in der Elektronentransportkette, den Elektronentransfer von zwei Elektronen vom NADH auf das Ubiquinon (Friedrich et al., 1990; Leif et al., 1993). Sie besteht aus einem 880 kDa großen Multi-Polypeptidkomplex, der in Säugerzellen aus mehr als 40 Polypeptiduntereinheiten (Hatefi, 1985, Friedrich et al., 1990; Koerber et al., 1998; Fearnley et al., 2001) besteht.

Die NADH-Ubiquinonoxidoreduktase weist eine zweiteilige, L-förmige Struktur auf (Weiss et al., 1991; Leif et al., 1993; Friedrich & Bottcher, 2004). Der horizontale, hydrophobe Anteil des Enzymkomplexes befindet sich innerhalb der Membran, während sein vertikaler Anteil zur Matrix weist. Dieser enthält neben peripheren Membranproteinen (Leif et al., 1993) ein Molekül Flavinmononukleotid (FMN) (Fearnley & Walker, 1992), welches als redoxaktive, prosthetische Gruppe der NADH-Dehydrogenase die Elektronen vom in der Matrix gebildeten NADH übernimmt. Das so gebildete FMNH₂ gibt die Elektronen an eine Reihe (bis zu 9 in Bakterien) von Eisen-Schwefel-Clustern (Eisen-Schwefel-Zentren, Fe-S) ab. Komplex I besitzt 2Fe-2S und 4Fe-4S-Cluster, die als N-1 bis N-4 bezeichnet werden

(Wang et al., 1991; Flemming et al., 2003).

Der Elektronentransfer erfolgt innerhalb des vertikalen Arms des Enzymkomplexes von FMNH₂ über die drei hintereinandergeschalteten Eisen-Schwefel-Zentren N1 (2Fe-2S), N3 und N4 (4Fe-4S) zu einem intern gebundenen Coenzym Q (CoQ) (Weiss et al., 1991). Gleichzeitig wird FMNH₂ zu FMN zurückoxidiert, das erneut Elektronen von NADH aufnehmen kann. Während dieses in Stufen ablaufenden Elektronentransfers durch die NADH-Q-Reduktase werden vier Protonen von der Matrix- auf die Zytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt (Friedrich et al., 1990; Weiss et al., 1991; Leif et al., 1993). Es kommt zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran (Fearnley & Walker, 1992), da es zu einer Akkumulation von H⁺ auf der Zytosolseite der inneren Membran gegenüber der Matrixseite kommt.

Diphenyleneiodonium (DPI, siehe Abbildungen 1+5) ist ein Inhibitor von Komplex I. Es bindet irreversibel an die Flavoprotein-Komponente von Flavoenzymen und inhibiert dort den Elektronentransfer (Tew, 1993). Die Bindung an Komplex I ist nicht spezifisch, sondern erfolgt an einer Vielzahl von Flavoproteinen (Riganti et al., 2004). DPI hemmt daher Enzymsysteme wie die NADPH-Oxidase (Cross & Jones, 1986; Tew, 1993; Majander et al., 1994), Xanthin-Oxidase, Stickstoffmonoxid-Synthetase sowie Komplex I und II der mitochondrialen Atmungskette (Li & Trush, 1998; Semenza, 1999).

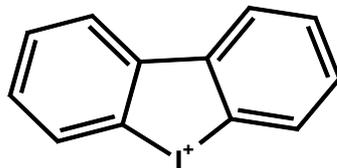


Abbildung 1: Strukturformel des Flavoproteininhibitors DPI

2.3.2.2 Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II)

Komplex II ist mit einer Molekülmasse von 140 kDa der kleinste Komplex in der Atmungskette und transferiert Elektronen von Succinat auf Coenzym Q (CoQ) (Hatefi, 1985; Hederstedt, 2003). Er ist der einzige der vier Komplexe, der bei den Eukaryonten komplett vom Kern kodiert wird (Capaldi, 1982) und setzt sich aus vier Proteinuntereinheiten (siehe Abbildung 4) zusammen (Hägerhall, 1997; Hederstedt, 2002). Komplex II besitzt in Pro- sowie in Eukaryonten eine weitgehend konservierte Zusammensetzung.

Die als Trimer (Iverson et al., 1999) angeordnete Succinatquinonreduktase (SQR)

aerober Organismen entspricht der SDH in eukaryontischen Zellen (Hägerhall, 1997; Hederstedt 2003). Anaerobe Zellen arbeiten mit der Quinol-fumaratreduktase (QFR) (Tielens & Van Hellmond, 1998; Baysal et al., 2001), wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxid-anionradikal (O_2^-) und Hydrogenperoxide (H_2O_2) produziert (Yankovskaya et al.; 2003) werden.

Eine Vielzahl an Bakterien (*E. coli*) und Parasiten exprimiert in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen die SQR oder QFR (Kita et al.; 2002). Saruta und Mitarbeiter (1995) fanden bei *Ascaris suum* je nach Entwicklungsstadium wachstumsspezifische Formen der SQR.

Es werden drei funktionelle Klassen der Succinat-quinonoxidoreduktasen unterschieden. Die Klasse I beinhaltet SQRs, die die Succinatoxidation und -reduktion mit einem hohen Quinolpotenzial (Ubiquinon) katalysieren. Zur Klasse I gehören alle mitochondrialen SQRs der Säuger.

Die Klasse II umfasst alle QFRs. Sie katalysieren die Oxidation mit Quinonen eines niedrigen Quinolpotenzials wie Menaquinol oder Rhodoquinol.

Die Klasse III beinhaltet SQRs, die in vivo die Succinatoxidation und -reduktion mit Quinonen, die ein niedriges Quinolpotenzial wie Menaquinon oder Thermoplasmaquinon besitzen, durchführen. Hierzu gehören die SQRs grampositiver Bakterien wie z.B. *B. subtilis* und *B. macerans* (Hägerhall, 1997, Lancaster et al., 2000).

Die Succinat-quinonoxidoreduktase ist aus vier Proteinuntereinheiten aufgebaut, die als A, B, C und D bezeichnet werden.

Die beiden Untereinheiten A + B bilden den hydrophilen katalytischen Teil des Komplexes II (Davis & Hatefi, 1971; Hägerhall, 1997; Hederstedt, 2002).

Die Untereinheit A (Flavoproteinuntereinheit, Fp, Succinatdehydrogenase, SDHA) wird von einem löslichen 79-65 kDa Flavoprotein dargestellt, liegt als lösliches Protein an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran und beinhaltet die Dikarboxylbindungsseite (Hägerhall, 1997; Hederstedt, 2002), welche durch einen Isoalloxazinring, zwei Argininseitenketten (Arg A301, Arg A404), eine Histidinseitenkette (His A369) und der Seitenkette des Phe A141 gebildet wird (Lancaster & Kröger, 2000). Tomitsuka und Mitarbeiter (2003) identifizierten zwei verschiedene cDNAs für die menschliche Flavoproteinuntereinheit.

Es werden im Fp die Segmente a-i unterschieden. Das Flavinadenin-dinukleotid (FAD) ist an den Histidinrest des Segments b über das N(3)-8alpha-riboflavin kovalent gebunden

(Hägerhall, 1997). Die Succinatoxidation ist nur möglich, wenn das FAD kovalent gebunden ist, welches in SQR/QFR als Zwei-Elektronencarrier fungiert. Das Flavin ist an der Substratbindungsseite lokalisiert und der erste Elektronenakzeptor während der Succinatoxidation (Hägerhall, 1997).

Die 31-24 kDa große Untereinheit B, auch als Eisenschwefelproteinuntereinheit (IP) bezeichnet (Davis & Hatefi, 1971), beinhaltet drei Eisenschwefelcluster: ein 4Fe-4S-Cluster (S2/FR2), ein 3Fe-4Fe-Cluster (S3/FR3) und ein 2Fe-2S-Cluster (S1/FR1) (Hägerhall, 1997; Hatefi, 1985).

Die N-terminale Domäne beinhaltet das 2Fe-2S-Cluster, während die C-terminale Domäne die 4Fe-4S-Cluster und 3Fe-4Fe-Cluster als Liganden besitzt. Die Eisenschwefelpeptide beinhalten drei Gruppen an Cysteinresten, die als Liganden der Eisenschwefelcluster fungieren (Hägerhall, 1997). Das Eisenschwefelcluster S1 ist nach dem Flavin der erste Elektronenakzeptor in SQRs bzw. in QFRs als FR1 der erste Elektronendonator für das Flavin. Das 4Fe-4S-Cluster (S2/FR2) verfügt über ein niedriges Potenzial und nimmt nicht am Elektronentransfer teil (Hägerhall, 1997).

Das 3Fe-4Fe-Cluster (S3/FR3) besitzt eine wichtige strukturgebende Rolle, so können lösliches FP und IP nur an die Ankerdomänen binden, wenn das S3-Cluster intakt ist (Baginsky et al., 1969, Onishi et al., 1976).

Die beiden hydrophoben Untereinheiten SDHC (CybL, 15 kDA) und SDHD (CybS, 12 kDA), sind integrale Membranproteine (Capaldi, 1982; Capaldi et al., 1988) und formen das Cytochrom b (Hägerhall, 1997; Ackrell, 2000), das die Hämgruppen bindet (Hägerhall, 1997).

SDHC und SDHD werden je nach Spezies gemeinsam von einer großen oder zwei kleinen Polypeptiden gebildet. Auf Grund der Anzahl hydrophober Domänen und Hämgruppen wird die SQR in fünf Gruppen (Typ A-E) klassifiziert. Die SQR der Säugermitochondrien mit zwei hydrophoben Untereinheiten und einer Hämgruppe gehört zum Typ C (Hägerhall, 1997).

Die hydrophoben Untereinheiten beinhalten zwei transmembrane Quinonbindungsstellen in SQR/QFR (Hägerhall, 1997; Oyedotun & Lemire 2001). Die proximale Quinonbindungsstelle ist in engem Kontakt zum S3 und Häm b_H an der negativen Membranninnenseite lokalisiert, während die distale Quinonbindungsstelle zur positiv geladenen Außenseite der Membran weist (Hägerhall, 1997).

Die Membrananker von Klasse III SQRs verfügen über zwei transmembranär angeordnete

Hämgruppen, wobei ein Häm (b_H) ein niedrigeres und eines (b_L) ein höheres Redoxpotenzial besitzt (Yu et al., 1987). Die Hämgruppen spielen eine wichtige Rolle bei der Anordnung und Stabilität der Membrananker, während ihre Anwesenheit für die Succinatoxidation per se nicht obligatorisch ist (Hägerhall, 1997).

Das bei der Reduktion im Enzymkomplex entstehende $FADH_2$ transferiert unter Beteiligung von einem kovalent gebundenen FAD (Davis & Hatefi, 1971; Hanstein et al., 1971), drei Eisenschwefelclustern und Cytochrom b (Hanstein et al., 1971; Capaldi, 1982; Hatefi, 1985; Capaldi 1991) seine Elektronen vom Succinat zum Ubiquinon (Hägerhall, 1997). Quinone arbeiten als in der Membran bewegliche Elektronencarrier, die den Protonen- und Elektronentransfer koppeln können.

Das 2-Thenoyltrifluoroazon (TTFA, siehe Abbildungen 2+5) ist ein Hemmstoff, der am Komplex II angreift. Der genaue Mechanismus ist bislang noch nicht erforscht. Es wird vermutet, dass TTFA den Elektronentransfer vom Eisenschwefelzentrum S-3 zum Quinonakzeptor blockiert. Die SQR besitzt zwei in der Ankerdomäne liegende Inhibitionsstellen für TTFA und hemmt die Reduktionsreaktion des Q zu QH^- und von QH^- zu QH_2 (Yang et al., 1998).

3'-Nitropropionsäure (3-NPA, siehe Abbildungen 3+5) wird durch die Succinatdehydrogenase oxidiert, dieses Oxidationsprodukt führt zur irreversiblen Inhibition der Untereinheit A des Komplexes II (Lopez et al., 1997; Andreassen et al., 2000).

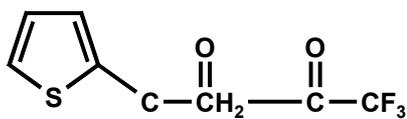


Abbildung 2: Strukturformel des Komplex II-Inhibitors TTFA

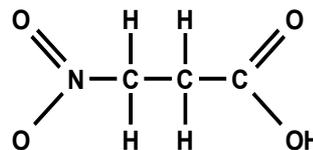


Abbildung 3: Strukturformel des Komplex II-Inhibitors 3-NPA

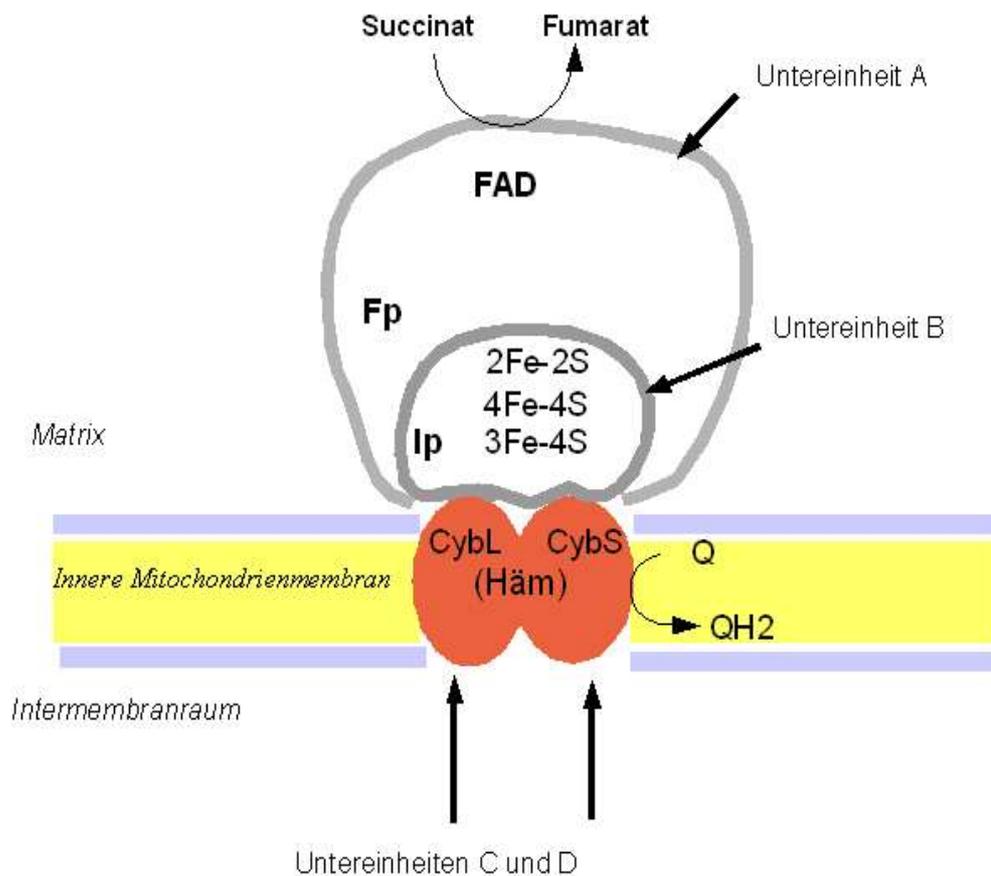


Abbildung 4: Modell der Succinatdehydrogenase mit Anordnung der vier Untereinheiten SDHA, SDHB, SDHC und SDHD (in Anlehnung an Miyadera et al., 2003).

2.3.2.2.1 Tumoren des Glomus caroticum

Die Assoziation von SDH-Mutationen mit Paragangliomen zeigt, dass der SDH eine primäre Rolle bei der Entstehung bestimmter Tumorarten zukommt (Heutink et al., 1992; Hirawake et al., 1999; Baysal, 2003; Gimenez-Roqueplo, 2003).

Die Inzidenz von Paragangliomen der Kopf-Halsregion wird auf 1:100.000 bis 1:1.000.000 geschätzt, dabei treten 10-50% aller Fälle familiär gehäuft auf. Es handelt sich in der Regel um benigne und hormonell inaktive Tumoren, die zum Großteil aus den paraganglionären Chemorezeptoren (Glomus caroticum) hervorgehen. Sie fallen klinisch meist auf Grund ihrer Raumforderung auf. Die Tumoren retroperitonealer Paraganglien und des Nebennierenmarks (Phäochromozytome) bilden dagegen in bis zu 50% aller Fälle Metastasen aus und sezernieren zum großen Teil Katecholamine (Hoffmann et al., 2000;

Baysal, 2003).

Das familiäre Auftreten von Paragangliomen lässt einen genetischen Defekt vermuten. Diese Vermutung konnte mittels Kopplungsanalysen 1992 in einer Studie an einer großen dänischen Familie mit hereditären Paragangliomen bestätigt werden. Die Erkrankung war mit dem Locus 11q23 gekoppelt (Heutink et al., 1992), einer Region, welche unter anderem für die SDH kodiert. Die SDH ist eine Komponente der Atmungskette und in den Zitratzyklus involviert (Hägerhall, 1997). Es konnten in allen vier Genen, die für die einzelnen Untereinheiten kodieren, Mutationen detektiert werden. Mutationen in SDHA führen zu Erkrankungen wie Enzephalopathie, Kardiomyopathie, Ataxie, Hypotonie oder Myopathie. Mutationen in den Genen SDHB, SDHC und SDHD führen zu hereditären Paragangliomen (Heutink et al., 1992; Hirawake et al., 1999; Niemann & Müller, 2000; Baysal et al., 2001; Astuti et al., 2003). Baysal et al. (2000) konnten Mutationen im SDHD-Gen in familiären Fällen von Paragangliomen und einen Verlust der Heterozygotie nachweisen. Dies führte sie zu der Annahme, dass SDHD ein Tumorsuppressor-Gen darstellt, welches für ein mitochondriales Protein kodiert. Daher wird angenommen, dass SDHD an spezifischen Zellantworten des Glomus caroticum auf Hypoxie beteiligt ist. Ein Funktionsverlust dieses potenziellen zellulären Tumorsuppressor-Gens könnte deswegen zu einer chronischen hypoxischen Stimulation und folgender Proliferation führen (Milunsky et al., 2001).

In 20-40% der Fälle aller sporadischen Paragangliome liegt ein Defekt im SDHD-Gen zugrunde (Gimm et al., 2000; Taschner et al., 2001). Es konnten zwei weitere Genregionen (PGL2, PGL3) sowie Mutationen im SDHD-Gen mit der Entstehung dieser Tumoren assoziiert werden.

Mutationen im SDHB-Gen familiärer und sporadischer Paragangliome (Astuti et al., 2001; Baysal et al., 2001) sind eng mit der Entstehung extra-adrenaler Phäochromozytome assoziiert und tragen ein hohes Risiko für Rezidive oder Malignität (Gimenez-Roqueplo et al., 2003).

Im SDHC-Gen, welches in der Region PGL-3 lokalisiert ist, konnten Mutationen bei familiären Paragangliomen und ein Verlust der Heterozygotie nachgewiesen werden (Niemann & Müller, 2000). Die Ergebnisse von Edström et al. (2000) zeigen, dass an der Entstehung familiärer, chromaffiner Paraganglien weitere Gene beteiligt sind. Der Mechanismus der Paragangliomentstehung ist noch nicht geklärt, es gibt jedoch Hinweise, die eine Beteiligung des Sauerstoffsensormechanismus zeigen.

Das Glomus caroticum misst den arteriellen pO_2 im Blut und initiiert adaptive Reaktionen wie reflektorische Hyperventilation und Katecholaminfreisetzung (Czyzyk-Krzeska, 1997;

Lopez-Barneo, 1997). Auf zellulärer Ebene ist der Transkriptionsfaktor HIF am Sauerstoffsensormechanismus beteiligt (Semenza, 1999, 2000). Eine zelluläre Hyperplasie im Glomus caroticum tritt bei Menschen auf, die chronischer Hypoxie ausgesetzt sind. Dies trifft z.B. bei in großen Höhenlagen lebenden Menschen zu (Arias-Stella, 1969; Laidler & Kay, 1975).

Paragangliome treten am häufigsten im Glomus caroticum auf, wobei diese auch eine zelluläre Hyperplasie ohne einen hypoxischen Stimulus aufweisen (Stiller et al., 1975; Lack et al., 1979). Aus den Gemeinsamkeiten von Paragangliomen und hypoxisch stimuliertem Glomus caroticum schlussfolgerten Baysal et al. (2000), dass bei Paragangliomen ein genetischer Defekt in PGL1 einen kritische Komponente im Sauerstoffsensormechanismus darstellen könnte. Diese These konnte durch weitere Experimente gefestigt werden (Prabhakar, 2000; Baysal, 2003). Die ein Hämprotein beinhaltende SDH wird als Sauerstoffsensoren gehandelt. Hypoxie führt über eine mitochondriale Depolarisation zu einer Depolarisation der Glomuszelle mit nachfolgender Transmitterausschüttung (Braun et al., 2004).

Douwes Dekker et al. (2003) zeigten, dass SDH-Mutationen zu einer Destabilisierung mit einer verminderten Enzymaktivität von Komplex II der Atmungskette sowie zu einer abnormalen Mitochondrienmorphologie führen.

2.3.2.3 Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)

Die Cytochrom-c-Reduktase (auch als Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase oder Cytochrom-bc₁-Komplex bezeichnet) ist ein 250 kDa großer Enzymkomplex, (Hatefi, 1985) der aus elf Untereinheiten besteht (Capaldi et al., 1988). Er bildet funktionell mit Komplex I einen Superkomplex (Bianchi et al., 2004). Der asymmetrisch orientierte Komplex III transferiert die Elektronen von Ubiquinol weiter auf Cytochrom c und pumpt gleichzeitig Protonen von der negativ geladenen Matrixseite auf die positiv geladene Aussenseite der inneren Mitochondrienmembran (Hatefi, 1985; Trumpower, 1990).

Er enthält neben Q drei Redoxzentren: Cytochrom b, welches als transmembranes Protein zwei nicht-kovalent gebundene Häm b-Gruppen (b₅₆₂ und b₅₆₆) besitzt, ein Cytochrom c₁ mit einer kovalent gebundenen Häm c-Gruppe und ein (2Fe-2S)-Cluster (Capaldi, 1982; Hatefi, 1985; Trumpower, 1990; Yue et al., 1991).

Komplex III verfügt über zwei Bindungsstellen für Ubiquinon. Gibt QH₂ den Wasserstoff ab, so werden zwei H⁺ zum Intermembranraum transportiert, ein Elektron wandert über ein Eisenschwefelzentrum und Cytochrom c₁ zum Cytochrom c. Ein weiteres Elektron redu-

ziert das Ubiquinon zum Semiquinon (Hatefi, 1985; Trumpower 1990). Von hier aus wird das Elektron über die Reaktionszentren b_{562} und b_{566} auf das matrixnahe Ubiquinon übertragen, das zusätzlich ein Elektron von Komplex I und zwei H^+ aus dem Matrixraum aufnimmt und so zum QH_2 reduziert wird (Hatefi, 1985; Trumpower 1990).

Ein zweites Molekül QH_2 reagiert mit Komplex III, um sein Elektron ebenfalls auf Cytochrom c zu transferieren. Ein Elektron wird (wie zuvor beschrieben) zu Cytochrom c transferiert, das zweite wird von dem erneut gebildeten $Q^{\cdot-}$ wieder über Cytochrom b_{566} auf Cytochrom b_{562} übertragen. Das in Zytosolnähe lokalisierte $Q^{\cdot-}$ übernimmt nun das Elektron von Cytochrom b_{562} und wird so zu QH_2 reduziert (Hatefi, 1985; Trumpower 1990).

Als Q-Zyklus wird der Mechanismus bezeichnet, bei dem der Cytochrom bc1 Komplex den Elektronentransfer in einen Protonengradienten umwandelt. In einem kompletten Q-Zyklus werden durch die Oxidation eines Ubiquinols zwei Moleküle Cytochrom c reduziert und vier Protonen von der Matrixseite auf die Zytosolseite der Mitochondrienmembran transferiert (Trumpower, 1990).

2.3.2.4 Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Die Cytochrom-c-Oxidase bildet den terminalen Komplex IV der Atmungskette, sie katalysiert die Abgabe von vier Elektronen des reduzierten Cytochrom c auf molekularen O_2 (Capaldi, 1983) und pumpt gleichzeitig acht Protonen von der Matrix auf die Zytosolseite der inneren Membran (Chan & Li, 1990).

Das Y-förmige Transmembranprotein besitzt eine Molekülmasse von 200 kDa und besteht bei Säugern aus mindestens dreizehn Untereinheiten (Takamiya et al., 1987, Chan & Li, 1990). Die drei größten Untereinheiten (CO I-III) werden von mitochondrialer DNA kodiert (Capaldi, 1983; Hatefi, 1985).

Komplex IV setzt sich aus vier redoxaktiven prosthetischen Gruppen, Cytochrom a, Cytochrom a_3 und zwei Kupferionen (Cu_A und Cu_B), die in den Untereinheiten I und II lokalisiert sind, zusammen (Hatefi, 1985; Chan & Li, 1990; Abramson et al., 2001; Maneg et al., 2003).

Die beiden redoxaktiven katalytischen Zentren des Enzyms werden von jeweils zwei prosthetischen Gruppen gebildet (Hatefi, 1985; Abramson et al., 2001). Das erste redoxaktive bimetallische Zentrum (Cytochrom a Cu_A) des Komplexes IV übernimmt das Elektron von Cytochrom c (Capaldi, 1983; Abramson et al., 2001) und überträgt es auf sein zweites bimetallisches Zentrum (Cytochrom a_3 Cu_B), das zuvor molekularen O_2 gebunden hat (Hatefi, 1985; Chan & Li, 1990). Dadurch kommt es zu einer Teilreduktion

des Cytochrom a3 Cu_B-Zentrums (Cu_B²⁺ zu Cu_B⁺). Anschließend erfolgt die Reduktion der Häm-Gruppe des Cytochrom a3 (Fe³⁺ zu Fe²⁺) durch ein zweites vom Cytochrom c transferiertes Elektron und das Cytochrom a3 Cu_B-Zentrum ist vollständig reduziert. Dieses übergibt nun die beiden Elektronen an den gebundenen Sauerstoff, wodurch ein Peroxyzwischenprodukt entsteht (Chan & Li, 1990).

Das Peroxid wird durch die Einschleusung eines weiteren Elektrons über Cytochrom c und die Aufnahme von zwei H⁺ abgespalten. Bei dem nun folgenden Transfer eines vierten Elektrons und der erneuten Aufnahme von zwei H⁺ entstehen zwei Moleküle H₂O (Hatefi, 1985).

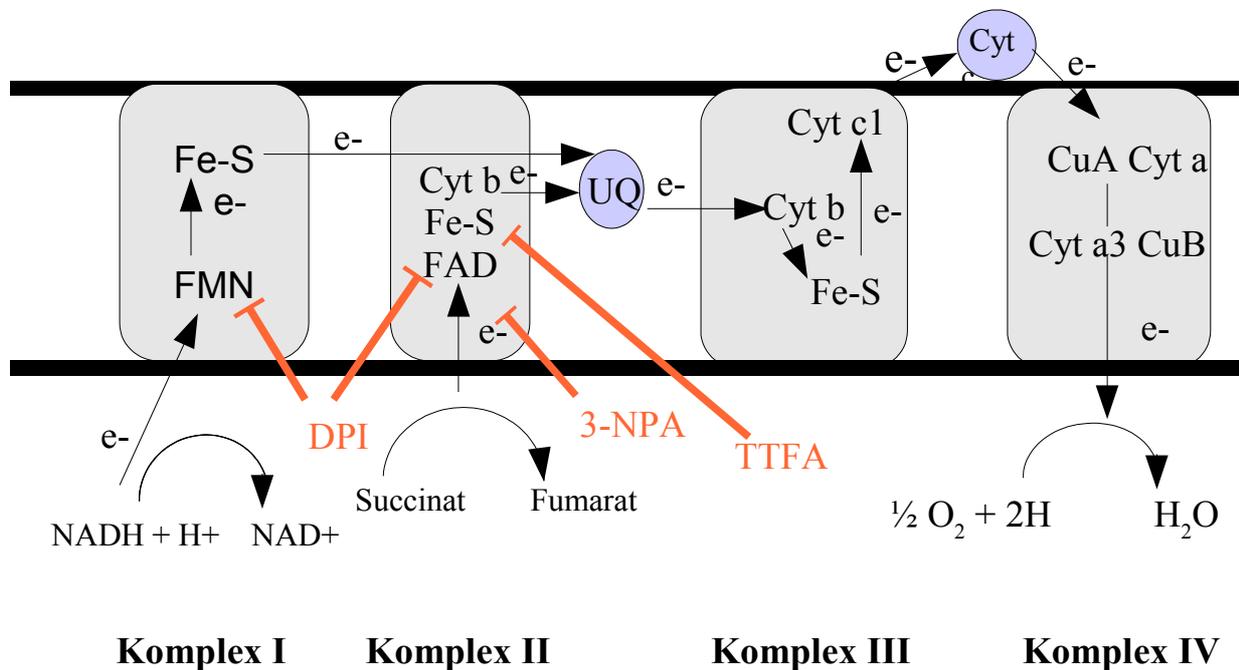


Abbildung 5: Schema der mitochondrialen Atmungskette mit den Bindungsstellen der Atmungsketteninhibitoren DPI, 3-NPA und TTFA.

2.4 Hypoxieantwort von Paraganglien/PC12-Zellen (TH, ADM, ROS)

Die von Greene und Tischler (1976) aus dem Nebennierenmark der Ratte isolierte Tumorzelllinie PC12 gilt auf Grund ihrer chemosensitiven Eigenschaften als Modellsystem für Studien über den Sauerstoffsensormechanismus auf zellulärer und molekularer Ebene (Spicer & Millhorn, 2003). Sie zeigt unter Hypoxie die gleichen adaptiven Reaktionen wie die neuroendokrinen Zellen des Glomus caroticum. Hierzu gehören die Hypoxie-induzierte Genexpression von TH (Kroll & Czyzyk-Krzeska, 1998; Höhler et al., 1999; Kummer et al.,

2000) und ADM (Cormier-Regard et al., 1998; Kitamuro et al., 2000; Martinez et al., 2003), sowie die Hypoxie-bedingte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Höhler et al., 1999; Yuang et al., 2004). Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Katecholaminbiosynthese und katalysiert als Monooxygenase die Umwandlung von L-Tyrosin zu 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (DOPA) (Nagatsu et al., 1964; Arita et al., 2002).

Hypoxie aktiviert in PC12-Zellen verschiedene Signaltransduktionswege. Membrandepolarisation und die Regulation der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration gehören zu wichtigen Komponenten im Signaltransduktionsweg der Hypoxie-induzierten TH-Genexpression in PC12-Zellen (Millhorn et al., 1997).

Bei den Hypoxie-sensitiven K^+ -Kanälen in PC12-Zellen handelt es sich um Kv1.2 -Kanäle (Conforti & Millhorn, 1997; Conforti et al., 2000). Die Inhibition dieser Kanäle unter Hypoxie führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Signaltransduktionswege wie den mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-, den stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK)- und den Phosphatidylinositol 3-Akt (PI3K-Akt)-Signaltransduktionsweg (Blancher et al., 2001) induziert (Conrad et al., 2001). Letzterer ist an der Regulation des Überlebens der Zelle und der Apoptose beteiligt. Die SAPK und MAPK spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf Stress sowie im Zellwachstum und -überleben (Su & Karin, 1996).

Auch die hypoxische Induktion der TH-Genexpression erfolgt Ca^{2+} -abhängig. So hemmt die Chelierung extrazellulären Ca^{2+} komplett den Hypoxie-induzierten TH-mRNA-Anstieg in PC12-Zellen (Raymond & Millhorn, 1997). Die zunehmende Hypoxie-bedingte TH-Genregulation ist sowohl auf eine steigende Gentranskription als auch auf eine erhöhte Stabilität der TH-mRNA zurückzuführen (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a). Dabei wird die zunehmende Hypoxie-induzierte TH-mRNA-Stabilität durch die Interaktion eines zytoplasmatischen Proteins mit einer pyrimidinreichen Sequenz in der 3'-UTR der TH-mRNA erreicht (Czyzyk-Krzeska et al., 1994b). Die Hypoxie-induzierte TH-Gentranskription in PC12-Zellen (5% O_2) beginnt innerhalb der ersten Stunde unter hypoxischen Bedingungen zu steigen und erreicht nach sechs Stunden einen viereinhalbfachen Anstieg der TH-mRNA (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a).

Die hypoxische TH-Genexpression wird durch die Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren mit cis-regulatorischen Sequenzen, die in der 5'-Region des TH-Promoters lokalisiert sind, reguliert. Eine bedeutende Funktion als regulatorische Komponenten besitzen dabei das aktivierende Protein 1 (AP-1), das cAMP-Antwortelement (CRE)

(Sabban, 1997) und HIF-1 (Czyzyk-Krzeska et al., 1994b; Norris & Millhorn, 1995; Millhorn et al., 1997; Conrad et al., 1999). Hierbei sind drei verschiedene Gruppen an Transkriptionsfaktoren von Bedeutung: HIFs, cFos und JunB, CREB. cFos und JunB interagieren unter Hypoxie mit der AP1-Sequenz im Glomus caroticum und in PC12-Zellen (Norris & Millhorn, 1995). HIFs binden an HRE (Norris & Millhorn, 1995) und der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) interagiert mit der proximalen CRE (Breitner-Johnson & Millhorn, 1998). CREB unterstützt die hypoxische TH-Genregulation, führt aber alleine nicht zur hypoxischen TH-Genexpression (Spicer & Millhorn, 2003).

In PC12-Zellen führen hypoxische Bedingungen zu einem schnellen und anhaltenden Anstieg der cFos- und JunB-mRNA (Prabhakar et al., 1995; Millhorn et al., 1997). Die cFos-mRNA Zunahme erfolgt Ca^{2+} - und Erk-(extrazelluläre signal-regulierte Proteinkinase) abhängig. Das TH-Gen beinhaltet AP1 regulatorische Komponenten in seiner Promoter-Region. cFos und junB binden in PC12-Zellen unter Hypoxie an diese Komponenten und sind somit neben CREB und HIF an der Hypoxie-induzierten Genregulation in PC12-Zellen beteiligt (Spicer & Millhorn, 2003).

Unabhängig vom induzierenden Stimulus (Hypoxie, Depolarisation, cAMP) stellt das CRE die Hauptdeterminante in der TH-Transkriptionsantwort da (Lewis-Tuffin et al., 2004).

Die EPAS-1-(endotheliales PAS Protein1; identisch mit HIF-2 α) trans-Aktivierung unter Hypoxie bedarf p42/p44 MAPK in PC12-Zellen (Conrad et al., 1999). Erk werden durch mitogene Stimuli aktiviert (Xing et al., 1998). In PC12-Zellen stimuliert Hypoxie spezifische Signalmoleküle des SAPK-Signaltransduktionsweges. So kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung von p38 α und p38 γ (Conrad et al., 1999), die Cyclin D beeinflussen, das in die Regulation der G1 Phase des Zellzyklus involviert ist (Baldin et al., 1993). Hypoxie führt in PC12-Zellen auch zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung von Erk1 und Erk2. Dadurch werden verschiedene Transkriptionsfaktoren, einschließlich HIF-2 α aktiviert. Erks regulieren indirekt über die Phosphorylierung anderer Mitglieder des HIF-2 α -Transkriptionskomplexes, wie z.B. dem CREB Bindungsprotein (CBP) (Liu et al., 1999), die HIF-Transaktivierung in PC12-Zellen.

Die Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) spielt eine entscheidende Rolle bei der hypoxischen Regulation bestimmter Gene (Semenza, 2000; Semenza, 2001; Schnell et al., 2003). Von den drei identifizierten HIF- α Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α /EPAS1 und HIF-3 α) wird in PC12-Zellen neben HIF-1 α vor allem HIF-2 α exprimiert (Tian et al., 1998). Hypoxie führt zu einer Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α (Paulding et al., 2002). Unter Hypoxie wird die Ubiquitinligase inhibiert, so dass es durch den fehlenden

proteosomalen Abbau zu einer Proteinstabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α kommt. Das pVHL reguliert unter Normoxie den Abbau von HIF-1 α und HIF-2 α durch die Bindung an die ODD (Salceda & Caro, 1997; Kallio et al., 1999; Cockmann et al., 2000; Maxwell et al., 1999; Tanimoto et al., 2000).

In vitro bindet HIF-2 α unter Normoxie Kobalt innerhalb der ODD (Yuan et al., 2001). Die Kobaltbindungsstelle überlappt die VHL-Bindungsstelle. Die Bindung von Kobalt führt zu einer Stabilisierung von HIF-2 α , indem eine Interaktion mit VHL verhindert wird. Das unter Hypoxie stabilisierte HIF-2 α dagegen kann kein Kobalt binden (Yuan et al., 2001). Unter Normoxie werden die Prolinreste Pro-402 und Pro-564 in der ODD durch die sauerstoff-abhängigen Prolylhydroxylasen hydroxyliert, dadurch wird die Interaktion von HIF-1 α bzw. 2 α mit VHL ermöglicht. Die anhand der Ubiquitinierung markierten HIF-1 α bzw. 2 α Moleküle werden von Proteasomen abgebaut (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999, Takahashi et al., 2004).

Adrenomedullin (ADM) ist ein weitverbreitet vorkommendes hypotensives Peptid, das ursprünglich aus einem menschlichen Phäochromozytom isoliert wurde (Kitamura et al., 1993). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Adaptation an Hypoxie. (Martinez et al., 2003). ADM besteht beim Menschen aus 52 Aminosäuren, bei der Ratte aus 50 Aminosäuren (Hinson et al., 2000). Die ADM-Synthese erfolgt über ein Vorläufermolekül, das Preproadrenomedullin (Hinson et al., 2000). ADM wird von vielen Zellarten, einschließlich Fibroblasten, Kardiomyozyten, Epithelzellen, Tumorzellen und Typ I-Glomuszellen (Martinez et al., 2003) exprimiert und freigesetzt (Isumi et al., 1998; Martinez et al., 1995; Tomoda et al., 2001). Es besitzt Funktionen als Vasodilatator (Nuki et al., 1993), Bronchodilatator (Kanazawa et al., 1994), Wachstumsfaktor (Miller et al., 1996), Regulator der Hormonsekretion (Martinez et al., 1996), als Neurotransmitter (Allen & Ferguson, 1996), antimikrobielles Agens (Allaker et al., 1999) und fungiert als regulatorisches Peptid in der Elektrolythomöostase der Niere (Jougasaki & Burnett, 2000). Es ist in viele physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Wachstum, Apoptose, Entzündung, Hormonsekretion, Angiogenese und Karzinogenese involviert (Martinez et al., 2002; Zudaire et al., 2003). Eine Hypoxie-induzierte Expression der ADM-mRNA wurde in Zellen der Bluthirnschranke der Ratte (Ladoux & Frelin., 2000), in Kardiomyozyten (Ngyen et al., 1999), in menschlichen Karzinomzellen, in humanen Endothelzellen der Koronararterien (Nakayama et al., 1999), in der Niere (Sandner et al., 2004) sowie in PC12-Zellen gezeigt (Martinez et al., 2003). Die ADM-Expression wird transkriptional und posttranskriptional kontrolliert.

Unter Hypoxie kommt es bereits nach vier Stunden zu einer Zunahme der ADM-Expression, die nach zwölf Stunden ihr Maximum erreicht (Martinez et al., 2003). Hypoxie wirkt nicht nur auf die ADM-Expression, sondern erhöht auch die Freisetzung aus sekretorischen Granula (Martinez et al., 2002). Die erhöhte ADM-mRNA Menge ist auf eine erhöhte Transkriptionsrate zurückzuführen und ähnlich der TH-Genexpression wird eine Änderung in der mRNA-Stabilität vermutet (Nagata et al., 1999; Ladoux & Frelin, 2000). Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass der Nervenwachstumsfaktor (NGF) die Abbaurate von ADM-mRNA in PC12-Zellen verlangsamt (Kobayashi et al., 2004). Die ADM-Expression in PC12-Zellen wird vermutlich nach einem HIF-1-abhängigen Mechanismus reguliert, wie er für die Hypoxie-sensitiven Gene EPO, VEGF und TH nachgewiesen wurde (Cormier-Regard et al., 1998; Ladoux et al., 2000).

Es wird angenommen, dass ROS als Signalübermittler in der O₂-Messung dienen. Verschiedene Studien hierzu sind aber kontrovers. So stellten einige Wissenschaftler eine Abnahme von ROS unter Hypoxie fest (Fandrey et al., 1994; Kroll & Czyzyk-Czreska, 1998; Görlach et al., 2003), während andere eine Hypoxie-bedingte Zunahme der ROS-Produktion beobachteten (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998; Kummer et al., 2003). In PC12-Zellen nimmt die Bildung von ROS unter Hypoxie zu (Kummer et al., 2003) und die hypoxische Hochregulierung der TH-Genexpression erfolgt parallel zur steigenden ROS-Bildung wird jedoch nicht durch diese induziert (Höhler et al., 1999).

Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass ROS als second messenger im HIF-1-abhängigen Signaltransduktionsweg beteiligt sind. Untersuchungen von Salceda & Caro (1997) zeigten eine steigende HIF-1 α -Protein/HIF-Reporter-Genexpression unter einem Abfall von ROS bei normoxischen Verhältnissen, ein ROS-Anstieg unter Hypoxie führte dagegen zu einer abnehmenden HIF-1 α -Protein/HIF-Reporter-Genexpression (Wiesener et al., 1998; Wartenberg et al., 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie

Für die Zellkultur wurden PC12-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte (Greene und Tischler, 1976) aus der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

3.1.2 Kulturbedingungen

Zur Anzucht wurden 75 mm² Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) mit RPMI 1640 Medium (PAA, Marburg) beschichtet. Zu 500 ml des RPMI 1640 Mediums wurden jeweils 50 ml Pferdeserum, 25 ml fötales Kälberserum (FCS) (Pan System, Aidenbach) und 5 ml Penicillin/Streptomycin (PAA, Marburg) zugesetzt. Dreimal wöchentlich wurden die PC12-Zellen einem Mediumwechsel unterzogen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.3 Splitting

Die PC12-Zellen wurden nach 5-8 Tagen gesplittet. Hierbei wurde zunächst das Medium abpipettiert. Anschließend wurden die adhären wachsenden Zellen durch Zugabe von 3 ml Accutase (PAA, Marburg) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und 5 min bei 500x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Hilfe einer silikonisierten Pasteurpipette mehrmals trituiert und dann im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

3.1.4 Mykoplasmentest mit 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI)

Vor der Kryokonservierung wurde ein Mykoplasmentest mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Vierundzwanzig Stunden vor der Färbung wurden die PC12-Zellen in „Culture slides“ ausgesät.

Durchführung der Färbung: Das Medium wurde abpipettiert und die „Culture slides“ mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) gewaschen. Dann wurden die Zellen 5-10 min mit Methanol fixiert. Nach Entfernen der Fixationslösung wurden die Präparate mit DAPI-Lösung (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) für 30 min beschichtet. Die „Culture slides“ wurden dann je einmal mit PBS und einmal mit Methanol gewaschen, mit gepuffertem Glycerol (siehe 3.4

Rezepturen eingesetzter Lösungen) eingedeckelt und 30 min im Kühlschrank belassen. Anschließend wurden die PC12-Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) mikroskopiert. Es wurde ein Erregerfilter mit einer Bandbreite von 360-370 nm und ein Sperrfilter mit einer Bandbreite von 420-460 nm eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wird von Zellen rasch aufgenommen, bindet selektiv an die DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität, so dass die Zellkerne im Fluoreszenzlicht blau erscheinen. Eine zytoplasmatische Fluoreszenz ist nicht nachweisbar. Bei einer Mykoplasmenkontamination von PC12-Zellen sind einzelne fluoreszierende Punkte im Zytoplasma und auf der Oberfläche der Zellen sowie manchmal auch im interzellulären Raum zu sehen. Es wurden hier keine Mykoplasmen nachgewiesen.

3.1.5 Kryokonservierung

Die sich in exponentieller Wachstumsphase befindlichen PC12-Zellen wurden 5 min bei 500x g zentrifugiert, um eine Mindestmenge von 5×10^6 Zellen pro ml zu erhalten. Dem Kulturmedium wurde 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Anschließend wurde das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml fassende Kryoröhrchen portioniert. Die Kryoröhrchen wurden zunächst 1 h im Kühlschrank abgekühlt, danach für zwölf Stunden in einer -20°C Gefriertruhe, dann 24 h bei -80°C zwischengelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.6 Auftauen

Bei Bedarf wurden die Kryoröhrchen für 2-3 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt wurde in 9 ml angewärmtes Kulturmedium pipettiert und eine Minute bei 500x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Kulturmedium versetzt und in einer 75 mm^2 Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellen wie üblich inkubiert.

3.1.7 Vitalfärbung der PC12-Zellen mit Trypanblau

3-Nitropropionsäure (3-NPA) (Sigma, Deisenhofen) wurde in verschiedenen Konzentrationen ($5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $5000 \mu\text{M}$) zu den einen Tag zuvor in Schalen (Falcon, Heidelberg) ausgesäten PC12-Zellen gegeben, um seine Toxizität zu ermitteln. Die Schalen wurden für 6,5 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml

Trypanblau (Sigma, Deisenhofen), 0,4%ig in PBS gelöst (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) und in die Schalen pipettiert. Die PC12-Zellen wurden mit einem Inversmikroskop (Leitz DM IL, Leica, Wetzlar) mikroskopiert und anschließend wurde ein Digitalbild aufgenommen. Tote PC12-Zellen nahmen den Farbstoff auf und färbten sich blau.

3.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

3.2.1 Aussaat der Zellen

Vierundzwanzig Stunden vor Versuchsbeginn wurden 30.000 Zellen/Napf je Versuchsansatz in zuvor mit FCS beschichteten 24-Napfplatten (Greiner, Frickenhausen) in jeweils 0,5 ml Kulturmedium pro Napf ausgesät.

3.2.2 Reagenzien

Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium aus den Nöpfen abpipettiert. In jeden Napf wurden anschließend 0,3 ml des jeweiligen Versuchsansatzes pipettiert. Abhängig vom Versuchsansatz wurden die in Tabelle 1 gelisteten Substanzen eingesetzt.

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle	Vehikel	Konzentration
2'-Thenoyltrifluoroazeton	TTFA	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	10 µM
3'-Nitropropionsäure	3-NPA	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	500 µM
Succinat	Succ	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	15 µM
Diphenyleiodonium	DPI	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	10 µM

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

3.2.3 Inkubation der Zellen

Zwei 24-Napfplatten wurden 30 min im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Dann wurde eine der Platten herausgenommen und 6 h unter hypoxischen Bedingungen in einer speziell hierfür angefertigten Plastikbox mit 6 Gas zuführenden Schläuchen inkubiert. Ein Festgasgemisch, bestehend aus 5% O₂, 5% CO₂ und N₂ als Balance, wurde aus einer Gasflasche (Messer-Griesheim, Duisburg), kontinuierlich in die Box geleitet. Die andere 24-Napfplatte verblieb 6 h unter Normoxie.

Nach Entnahme der Platten aus der Hypoxiekammer bzw. dem Brutschrank wurde das Medium zügig abpipettiert. Die Zellen wurden mit jeweils 1,5 ml Accutase (PAA, Marburg) vom Flaschenboden gelöst, mit 10 ml Medium von diesem abgespült und in 15 ml Kultur-röhrchen pipettiert. Diese wurden bei 500x g und 37°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das verbleibende Zellpellet in je 0,5 ml PBS gelöst und bei 2000x g und 4°C 1 min zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen eingestellt und zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 350 µl Lysispuffer (1 ml Lysispuffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) von der 24-Napfplatte abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde in einen Zellzerkleinerer (Shredder, QIAGEN, Hilden) überführt und 1 min bei 10.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Zu dem Filtrat wurde das gleiche Volumen 70% Ethanol gegeben und gut durchmischt. Dann wurde die RNA-Suspension auf eine Silikagelsäule (RNeasy spin) gegeben und 1 min bei 10.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die auf der Säule gebundene RNA wurde mit 700 µl eines Waschpuffers (RW1) gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die RNA zweimal mit 500 µl eines zweiten Waschpuffers (RPE) gewaschen und wiederum 1 min bei 10.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Trocknen der RNA wurde diese 2 min bei 20.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend in 30 µl sterilem H₂O (Ampuwa; Fresenius Kabi, Bad Homburg) eluiert und 1 min bei 10.000x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260-280 nm bestimmt und nach der Messung zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

3.2.5 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Es wurde jeweils 1 µg RNA in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß (Biozym, Hamburg) zur Synthese vorgelegt. Vor der cDNA-Synthese erfolgte ein DNase-Verdau, um eine Amplifikation von noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen zu vermeiden.

Für den Verdau wurden 1 µl Enzym (DNase I, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl Reaktions-

puffer (DNase I Puffer, Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt, auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und bei 25°C 15 min in einem Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dem Ansatz 1 µl einer 25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) zum Abstoppen der Reaktion hinzugesetzt und zum Inaktivieren des Enzyms der Ansatz 10 min auf 65°C erhitzt.

Es wurden zu dem Ansatz 1 µl Oligo (dt)₁₂₋₁₈-Lösung (500 µg/ml) (MWG-Biotech, Ebersberg) und 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes (10 mM von jeweils dATP, dGTP und dTTP mit neutralem pH) (Pharmacia, Karlsruhe) pipettiert und 5 min bei 65°C wiederum im Thermocycler inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Dann wurde ein Mix aus 4 µl 5x Erst-Strang-Puffer (5x First Strand Buffer; Invitrogen, Karlsruhe), 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT; Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl H₂O hinzupipettiert und der Ansatz 2 min bei 42°C vorinkubiert. Anschließend wurden jeweils 1 µl SuperScript™ II RNase H-Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben und 50 min bei 42°C im Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Transkriptase wurde 15 min bei 70°C inaktiviert.

3.2.6 QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

Das PCR-Produkt wurde auf ein 2% Agarosegel (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) aufgetragen und die zu bestimmende Bande unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die ausgeschnittenen Banden wurden gewogen. Zu 1 Volumenteil des Gels wurden 3 Volumenteile des Lösungspuffers (QG Puffer, QIAGEN, Hilden) gegeben und für 10 min bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln gelöst.

Anschließend wurde 1 Gelvolumenteil Isopropanol hinzu pipettiert, die Suspension in eine Silikagelsäule (QIAquick Säule, QIAGEN, Hilden) überführt und 1 min bei 17900x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und nochmals mit 500 µl des QG Puffers gewaschen und wiederum 1 min bei 17.900x g zentrifugiert.

Das Filtrat wurde wiederum verworfen und die gebundene DNA mit 750 µl eines Waschpuffers (PE Puffer; QIAGEN, Hilden) gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert.

Die Säule wurde nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, die DNA in 50 µl sterilem H₂O (Ampuwa; Fresenius Kabi, Bad Homburg) eluiert und bei 17900x g 1 min zentrifugiert.

Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt und die DNA unter Vakuum (SpeedVac Plus, Savant; Life Sciences International GmbH, Frankfurt) getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg).

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In einem sterilem 200 μ l-PCR-Reaktionsgefäß (Biozym, Hess. Oldendorf) wurden für einen 25 μ l-Ansatz die in Tabelle 2 gelisteten Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert.

Volumen	Endkonzentration	Reagenzien
1 μ l	1x	cDNA
17,6 μ l	1x	steriles H ₂ O (Ampuwa; Fresenius Kabi, Bad Homburg)
2,0 μ l	2,5 mM	MgCl ₂ (Applied Biosystems, New Jersey, Ohio)
2,5 μ l	1x	10x Puffer (Applied Biosystems, New Jersey, Ohio)
0,6 μ l	10 mM	dNTP-Mix (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
0,6 μ l	20 pM/ μ l	Primer forward (Tyrosinhydroxylase (TH), Adrenomedullin (ADM), β -Aktin (MWG-Biotech, Ebersberg)
0,6 μ l	20 pM/ μ l	Primer reverse (TH, ADM, β -Aktin) (MWG-Biotech, Ebersberg)

Tabelle 2: Für die PCR verwendete Reagenzien mit Angabe des eingesetzten Volumens und der Endkonzentration.

Dann wurde der Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf, Hamburg) beschickt. Nach einer 12 minütigen Erhitzung auf 95°C erfolgte die Zugabe von 0,1 μ l Taq-Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, Ohio) und anschließend eine Denaturierung für 45 sec bei 95°C.

Nun folgten 40 Zyklen mit folgendem Schema:

95°C für 45 sec (Denaturierung)

60°C für 30 sec (Annealing)

72°C für 30 sec (Extension)

Der Vorgang wurde durch eine 10minütige Beibehaltung der letzten Temperatureingabe (72°C) abgeschlossen. Der Thermocycler hielt bis zur Probenentnahme eine Temperatur von 4°C.

3.2.8 Gelelektrophorese

Zehn µl der PCR-Produkte wurden mit jeweils 2 µl Ladepuffer (Orange G, siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) gemischt und dann in ein 1,2%-Agarosegel (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) aufgetragen und durch eine horizontale Elektrophorese in einer „Horizon 11 · 14 Kammer“ (Life Technologies, Gibco) mit Tri-(hydroxy)methylaminomethan (TRIS)-Eisessig-EDTA-Puffer (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) aufgetrennt.

Als Marker wurde 0,5 µl 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwandt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 150 V über 45 min.

Die Größe der PCR-Fragmente wurde dann unter UV-Licht detektiert.

3.2.9 Quantitative PCR

Im Unterschied zur qualitativen RT-PCR und Analyse durch ein Agarosegel liefert die Echtzeit-PCR quantitative Ergebnisse.

Primer	Primersequenz	Produktlänge (bp)	Annealing-Temperatur	Accession-Nr. National Center for Biotechnology Information
TH forward	ACGTCCCCAAGGTTTCATC	216 (453-472)	60°C	L22651
TH reverse	TACAGCCCCGAGACAA-GGA	216 (670-653)	60°C	L22651
ADM forward	TGGGTTCACTCGCTTTCCTA	200 (207-226)	60°C	NM 009627
ADM reverse	AGTTGTGTTCTGCTCGTCCA	200 (406-387)	60°C	NM 009627
β -Aktin forward	ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	132 (1460-1481)	60°C	V01217
β -Aktin reverse	GGGTCATCTTTTCACGGTTG	132 (1691-1672)	60°C	V01217

Tabelle 3: Sequenz der verwendeten Primer mit Angabe der Produktlänge und der gewählten Annealing-Temperaturen. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, bezogen. Als Referenzgen („Housekeeping gene“) wurde β -Aktin eingesetzt.

Zur Durchführung der quantitativen PCR wurde für jedes Primerpaar ein separates Hauptgemisch vorgelegt, das sich aus den in Tabelle 4 aufgeführten Reagenzien zusammensetzte.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen je Probe
Fluoreszein	1:1000 in PCR-Puffer	1,0 μ l
2xQuantiTectProbe PCR-Mastermix *	1 x	12,5 μ l
Primer forward	200 pM	1,5 μ l
Primer reverse	200 pM	1,5 μ l
H ₂ O		ad 25 μ l

Tabelle 4: In den Experimenten eingesetztes Hauptgemisch mit Angabe der Reagenzien, der Endkonzentration und dem Volumen je Probe. * fertig bezogener Mastermix der Firma QIAGEN (Hilden) beinhaltet: PCR-Puffer, 10 mM dNTP-Mix, 8 mM MgCl₂, SYBR-Green.

In ein steriles 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß (Biozym, Hess. Oldendorf) wurden jeweils 24 µl des zuvor angesetzten Hauptgemisches pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 1 µl cDNA, die hier 1:10 in H₂O verdünnt eingesetzt wurde. Jede Probe wurde dreifach bestimmt.

Die quantitative PCR erfolgte nach folgendem Schema:

- | | | |
|-----------|--------|------------------|
| 1) 95°C | 15 min | Enzymaktivierung |
| 2) 95°C | 30 sec | Denaturierung |
| 3) 60,6°C | 30 sec | Annealing |
| 4) 72°C | 30 sec | Extension |

Die Schritte 2-4 wurden 40 x wiederholt.

- 5) Schmelzkurvenbestimmung

Die quantitativen Bestimmungen der relativen TH- und ADM-Expression wurden mit einem ICycler der Firma Biorad (München) durchgeführt.

Das bei der Echtzeit- („real-time“) PCR verwendete SYBR-green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Gemessen wurde dann der Fluoreszenzanstieg, der auf Grund der Bindung an die zunehmende Doppelstrang-DNA-Menge im Reaktionsgefäß entsteht. Während der Echtzeit-PCR wurde neben der DNA-Synthese gleichzeitig der Schmelzpunkt des amplifizierten Produkts ermittelt. Jede Doppelstrang-DNA besitzt eine eigene spezifische Schmelztemperatur (T_m), welche als die Temperatur definiert ist, bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegen. Alle PCR-Produkte eines Ansatzes sollten dabei die gleiche Schmelztemperatur aufweisen, da die Schmelztemperatur der DNA-Doppelhelix von ihrer Basenzusammensetzung abhängig ist. Differenzen in der Schmelztemperatur können ein Hinweis auf Kontamination, Primerdimere oder Artefakte sein. Die Schmelzkurve (siehe Abbildung 6) dient dazu, die Spezifität des amplifizierten Produkts zu überprüfen.

Die Fluoreszenzintensität wird gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen. Als Schwellenwert gilt der Punkt, an dem die Reaktion eine Fluoreszenzintensität überschreitet, die signifikant über der nicht-spezifischen Fluoreszenz liegt. Der Schwellenwert wird vom Benutzer selbst festgelegt, muss aber in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion liegen. Als C_T wird die X-Koordinate (Zykluszahl) desjenigen Punkts bezeichnet, an dem die Fluoreszenz den Schwellenwert erreicht (Beispiel: siehe Abbildung 7).

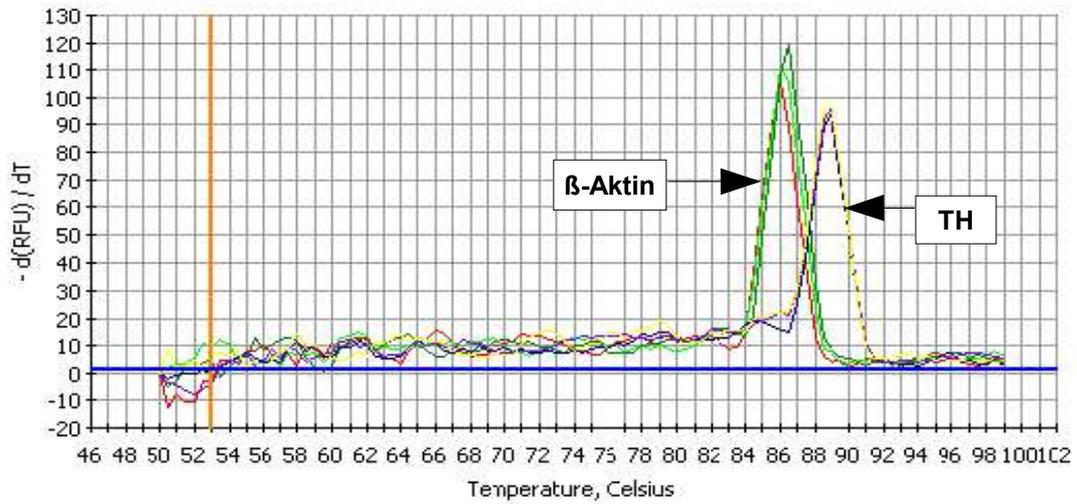


Abbildung 6: Schmelzkurven von β -Aktin und TH. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten. Anhand dieser Schmelzkurven ist zu erkennen, dass die amplifizierte Produkte spezifisch waren. Es liegen keine Differenzen in der Schmelztemperatur der Produkte vor. Es sind mehrere Peaks für β -Aktin und TH abgebildet, da in diesem Ansatz Amplifikate unter verschiedenen Bedingungen (Hypoxie, Normoxie, Hemmstoffzugabe) gemessen wurden.

Normoxie/Kontrolle

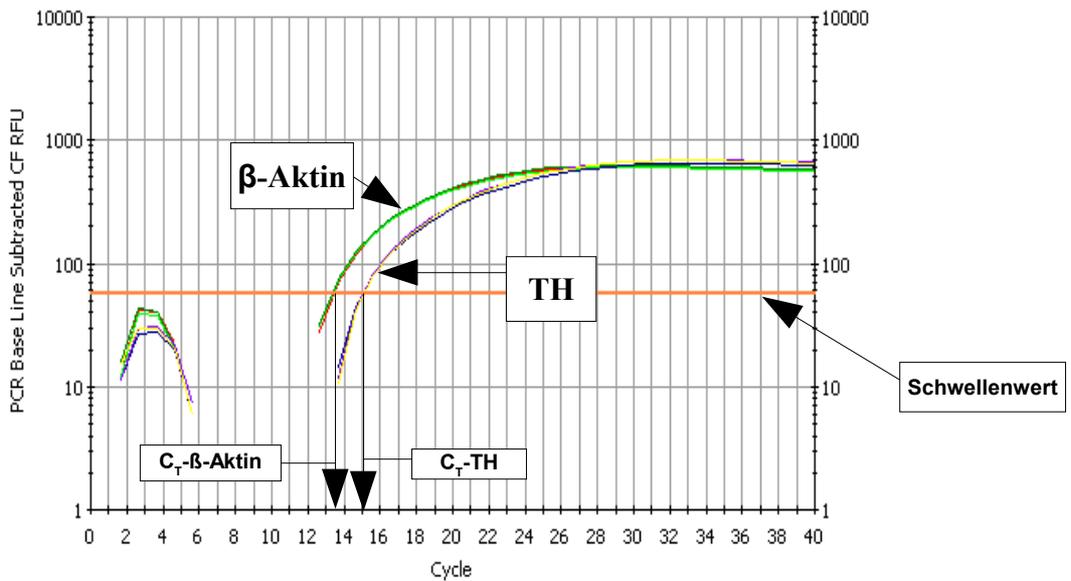


Abbildung 7: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und TH unter Normoxie. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten

3.2.10 Berechnung der relativen Expression

Es wird das Verhältnis des gebildeten Amplifikats vom Zielmolekül („gene of interest“, GOI) und einem Referenzmolekül („Housekeeping gene“, HKG) in der selben Probe bestimmt. Als Referenzgen wurde hier β -Aktin verwendet.

Aus den anhand der quantitativen PCR ermittelten Dreifachbestimmungen (C_T -Werte) wurden zunächst C_T -Mittelwerte gebildet. Dann wurde die Differenz zwischen TH C_T bzw. ADM C_T und dem Referenzgen (HKG) β -Aktin für die jeweiligen Hypoxie- bzw. Normoxiewerte gebildet. Die ermittelten Normoxiewerte von TH und ADM wurden von den Hypoxiewerten subtrahiert. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte dann nach folgender Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\text{(H}\Delta C_T - \text{N}\Delta C_T)}$$

Beispiele zur Berechnung der relativen Expression siehe Tabelle 5.

ΔC_T ist definiert als Differenz der C_T -Werte zwischen TH bzw. ADM und dem HKG und ergibt sich aus **(TH bzw. ADM C_T) - (HKG C_T)**.

H ΔC_T - N ΔC_T ist hier die Differenz zwischen den Hypoxiewerten ΔC_T und Normoxiewerten ΔC_T .

Normoxie/Kontrolle

	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}	C_T Mittelwert (MW)	$GOI C_T$	$HKG C_T$	ΔC_T		rel. Expr. (gesetzt)
β -Aktin	15,4	15	14,8	15,07					
TH	15,9	15,8	15,8	15,83	15,83	15,07	0,76		1,00
ADM	20	20,1	20,4	20,17	20,17	15,07	5,1		1,00

Die relative Expression für die Normoxie/Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Sie galt als Bezugswert für alle übrigen Proben mit Inhibitoren.

Hypoxie/Kontrolle

	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}	MW	$GOI C_T$	$HKG C_T$	ΔC_T	$H\Delta C_T$ $N\Delta C_T$	rel. Expr.
β -Aktin	15,4	15,1	15,2	15,23					
TH	14,7	14,7	14,6	14,67	14,67	15,23	-0,56	-1,32	2,50
ADM	18,8	18,7	18,4	18,63	18,63	15,23	3,4	-1,7	3,25

Normoxie/3-NPA

	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}	MW	$GOI C_T$	$HKG C_T$	ΔC_T	$H\Delta C_T$ $N\Delta C_T$	rel. Expr.
β -Aktin	15,7	15,5	15,4	15,53					
TH	16,5	16,5	16	16,33	16,33	15,53	0,8	0,04	0,97
ADM	20,1	20	21,1	20,40	20,4	15,53	4,87	-0,23	1,17

Hypoxie/3-NPA

	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}	MW	$GOI C_T$	$HKG C_T$	ΔC_T	$H\Delta C_T$ $N\Delta C_T$	rel. Expr.
β -Aktin	15,9	15	15,4	15,43					
TH	15,2	15,3	15,2	15,23	15,23	15,43	-0,2	-0,96	1,95
ADM	18,8	19,3	19,2	19,10	19,1	15,43	3,67	-1,43	2,69

Tabelle 5: Beispiele für die Berechnung der relativen Expression.

3.2.11 Statistische Auswertung

Die relative Expression der verschiedenen Versuchsgruppen aller Versuchstage von TH und ADM wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0 einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Die Ergebnisse wurden in Form von Boxplots dargestellt. Dann wurden die nicht-parametrischen Tests für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und, falls der Kruskal-Wallis-Test Unterschiede anzeigte, weiterführende Tests nach Mann-Whitney durchgeführt. Beobachtete Differenzen wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant

eingestuft. Anhand des Mann-Whitney-Tests wurden jeweils zwei Proben aufeinander bezogen: Normoxie ohne Inhibitor gegen Hypoxie ohne Hemmstoff, Normoxie ohne Inhibitor gegen Normoxie mit Inhibitor und Hypoxie ohne Hemmstoff gegen Hypoxie mit Hemmstoff.

3.3 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikator

3.3.1 Aussaat der Zellen

Vierundzwanzig Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in Kulturmedium auf vier zuvor mit FCS beschichteten „Culture Slides“ (Falcon, Heidelberg), 30.000 Zellen/Napf je Versuchsansatz ausgesät. Die Kammerung des „Culture slide“ in acht Nöpfe ermöglichte die variable Kombination verschiedener Reagenzien an einem Versuchstag.

3.3.2 Reagenzien

Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium von den Nöpfen der „Culture Slides“ abgesaugt. In jeden Napf wurden anschließend 0,3 ml des Mediums mit dem jeweiligen Inhibitor und dem Fluoreszenzindikator 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) pipettiert. Abhängig vom Versuchsansatz wurden folgende Substanzen in unterschiedlicher Kombination und Anordnung in die Nöpfe der „Culture Slides“ eingebracht (siehe Tabelle 6):

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle	Vehikel	Konzentration
2'-Thenoyltrifluoroazeton	TTFA	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	10 µM
3'-Nitropropionsäure	3-NPA	ICN, Aurora, USA	Kulturmedium	500 µM
Succinat	Succ	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	15 µM
Diphenyleneiodonium	DPI	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	10 µM
Nitrobluetetrazolium	NBT	Biomol, Hamburg	Kulturmedium	500 nM
2',7'-Dichlorofluorescein-Diazetat	DCFH-DA	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	20 µM

Tabelle 6: In den Experimenten eingesetzte Substanzen mit Angabe ihrer Abkürzungen, Bezugsquellen und Konzentrationen im jeweiligen Versuchsansatz.

3.3.3 Inkubation der Zellen

Zwei Objektträger wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen (20% O₂, 5% CO₂, 37°C) inkubiert. Die beiden anderen Objektträger wurden in einer abgedichteten Plastikbox mit einem Volumen von 300 ml unter hypoxischen Bedingungen (5% O₂, 5% CO₂, 37°C) inkubiert. Hierfür wurde über eine Schlauchkonstruktion im Deckel der Plastikbox ein Festgasgemisch, bestehend aus 5% O₂, 5% CO₂ und N₂ als Balance, aus einer Gasflasche (Messer-Griesheim, Duisburg) kontinuierlich in die Box geleitet.

Nach 60 min wurden alle Objektträger mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PBS (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) fixiert. Das Plastikgefäß wurde dafür über eine weitere Öffnung im Deckel mit Hilfe eines Injektionssystems mit dem Fixationsmittel geflutet, um die Zellen vor einer Reoxygenierung noch im Inkubator zu fixieren. Nach 10 min wurde die Fixierung der Zellen und des Fluoreszenzindikators abgeschlossen.

Nach der Fixation wurden die Zellen zur Entfernung des überschüssigen Fluoreszenzindikators und des Fixationsmittels zweimal 10 min mit 0,1 M PBS gewaschen und mit gepuffertem Glycerol (siehe 3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen) als Eindeckelmedium eingedeckt. Um temperaturbedingter Radikalbildung vorzubeugen, wurden die Objektträger während der Messungen bei 4°C aufbewahrt.

3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Objektträger mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Axioplan 2, Zeiss, Jena) analysiert. Es wurde ein Erregerfilter mit der Bandbreite von 460-490 nm und ein Sperrfilter mit einer Bandbreite von 515-550 nm sowie ein 40er Objektiv verwendet.

Am ersten Versuchstag wurden zu Beginn der Messungen der Kontrast und die Helligkeit separat für den Fluoreszenzindikator eingestellt. Dafür wurden alle vier Objektträger kurzzeitig mit Fluoreszenzlicht mikroskopiert und geeignete Kontrast- und Helligkeitswerte ermittelt, die sowohl bei Objektträgern mit sehr hoher, als auch mit sehr niedriger Fluoreszenzintensität eine Auswertung ermöglichten. Die hierbei als optimal ermittelte Belichtungszeit von 1386 ms bei einer Verstärkung von 4 wurde bei allen folgenden Versuchstagen verwendet. Es wurde im Schwarzweißmodus gearbeitet.

3.3.5 Messreihenfolge

An einem Versuchstag wurden die vier mit Buchstaben kodierte Objektträger blind analysiert.

Die kodierte Objektträger wurden in definierter gleicher Reihenfolge (Objektträger (OT) A: L1, R1; OT B: L1, R1; OT A: L3, R3; OT B: L3, R3; OT A: L2, R2; OT B: L2, R2; OT A: L4, R4; OT B: L4, R4) durchgemustert (siehe Abbildung 8), um alle Näpfe während der Messungen den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen auszusetzen.

L1	L2	R1	R2	A
L3	L4	R3	R4	
L1	L2	R1	R2	B
L3	L4	R3	R4	

Abbildung 8: Achtfache Kammerung eines „Culture slide“ für variable Substanzkombinationen mit Bezeichnung der einzelnen Kulturkammern.

3.3.6 Messvorgang

Zunächst wurden die Näpfe aller Objektträger im Durchlicht kurz betrachtet, um geeignete Zellen auszuwählen. Es wurden Zellen gemessen, die sich in der Mitte der Näpfe befanden und nicht übereinander lagen. Das Fluoreszenzlicht wurde eingeschaltet, die gewählten Zellen fokussiert und es wurde ein Digitalbild aufgenommen. Von jedem Napf wurden die Umrisse von zehn Zellen umfahren und deren Fluoreszenzintensität gemessen. Die anhand des Softwareprogrammes AxioVision 3.0 ermittelten Werte für die Fluoreszenzintensität wurden in Graustufen auf einer Skala von 0 bis 255 wiedergegeben.

3.3.7 Statistische Auswertung

Jeder Zelle wurde auf Grund ihres Fluoreszenzsignals durch das Computerprogramm Axio Vision 3.0 ein Grauwert zwischen 0 und 255 zugeordnet. Pro Kulturkammer wurden 10 Zellen ausgewertet. Die so ermittelten Grauwerte der einzelnen Versuchstage wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0 einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Für die Auswertung der Daten wurden die nicht-parametrischen Tests für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney durchgeführt und auf Signifikanz geprüft. Beobachtete Differenzen wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant eingestuft.

Anhand des Mann-Whitney-Tests wurden jeweils zwei Proben aufeinander bezogen: Normoxie ohne Inhibitor gegen Hypoxie ohne Hemmstoff, Normoxie ohne Inhibitor gegen Normoxie mit Inhibitor und Hypoxie ohne Hemmstoff gegen Hypoxie mit Hemmstoff.

Abschließend wurden die Mittelwerte der ROS-Produktion aller Versuchstage für die Normoxie gleich eins gesetzt und galten als Bezugswert für die übrigen Mittelwerte der Proben mit anderen Versuchsbedingungen.

Mit dem SPSS 9.0 wurde anhand dieser Mittelwerte letztendlich eine zusammenfassende Gesamtauswertung erstellt. Dabei wurde nach dem gleichen Prinzip wie bei der Auswertung für die einzelnen Versuchstage verfahren. Die zusammengefassten Ergebnisse wurden mit Hilfe von Boxplots dargestellt.

3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen

DAPI-Lösung (Sigma, Deisenhofen)

Die Stammlösung (0,1 mg/ml) wurde in sterilem Aqua dest. angesetzt.

Herstellen der Arbeitslösung: Stammlösung 1:2000 mit Methanol verdünnen.

Lichtgeschützt bei 2-8°C lagern.

Phosphatpuffer (PP): 0,2 M, pH 7,4

31,2 g/l Lösung A: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Merck,
Darmstadt)

35,6 g/l Lösung B: 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
(Merck, Darmstadt)

230 ml der Lösung A wurden mit 770 ml der Lösung B gemischt
und der pH auf 7,4 eingestellt.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): 0,2 M, pH 7,4

28,75 ml Lösung A (0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat)

96,20 ml Lösung B (0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)

22,4 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

ad 5000 ml

gepuffertes Glycerol

Pufferlösung: 50 ml Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Merck, Darmstadt) auf pH 8,6
einstellen.

Zwei Teile des Glycerols (Merck, Darmstadt) mit einem Teil Puffer mischen.

Fixationslösung

4% Paraformaldehyd (PFA; Sigma, Deisenhofen) in 0,1 M PP, pH 7,2-7,4

Ansatz: 40 g Paraformaldehyd ad 500 ml Aqua dest., langsam auf 70°C
erhitzen.

Einige Tropfen 2 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird.

Erkalten lassen, 500 ml 0,2 PP zugeben. Anschließend den pH
auf 7,2-7,4 einstellen, membranfiltrieren (3 µm) und bei -20°C
vor Licht geschützt lagern.

0,4% Trypanblau

Ansatz: 0,4 g Trypanblau (Sigma, Deisenhofen) ad 100 ml PBS.

Orange G; pH 8,0

Ansetzen von 10 ml Ladepuffer:

5,88 ml 87%iges Glycerol mit 250 µl 2 M Tris-HCL-Puffer (pH 8,0) und 1 ml EDTA-Lösung
(pH 8,0) mischen und add 10 ml mit Aqua dest. auffüllen.

0,1 g Orange G dye (Sigma, Deisenhofen) hinzufügen, den Ansatz steril filtrieren und
Aliquots à 500 µl bei -20°C einfrieren

50fach konzentrierter TRIS-Eisessig-EDTA-Laufpuffer; pH 8,0

242 g TRIS (NH₂ C (CH₂ OH)₃ (USB, Cleveland, Ohio)

57,1 ml Eisessig (Merck, Darmstadt)

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) (Invitrogen, Karlsruhe)

Agarosegel 2%

2,0 g Agarose (Genagarose L.E., iNNO-TRAIN Diagnostik GmbH, Kronberg, Taunus)
werden mit 100 ml TRIS-Eisessig-EDTA-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Das flüssige
Gel wurde dann in den Schlitten gegeben und hier mit 0,5 µl Ethidiumbromid (1%, Roth
GmbH + Co, Karlsruhe) gemischt.

4 Ergebnisse

4.1 Vitalfärbung mit Trypanblau zur Toxizitätsbestimmung von 3-NPA

Die PC12-Zellen verloren bei einer 3-NPA-Konzentration von 5000 μM nach 6,5 stündiger Normoxie ihre Vitalität (siehe Abbildung 9). Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration von 500 μM gewählt.

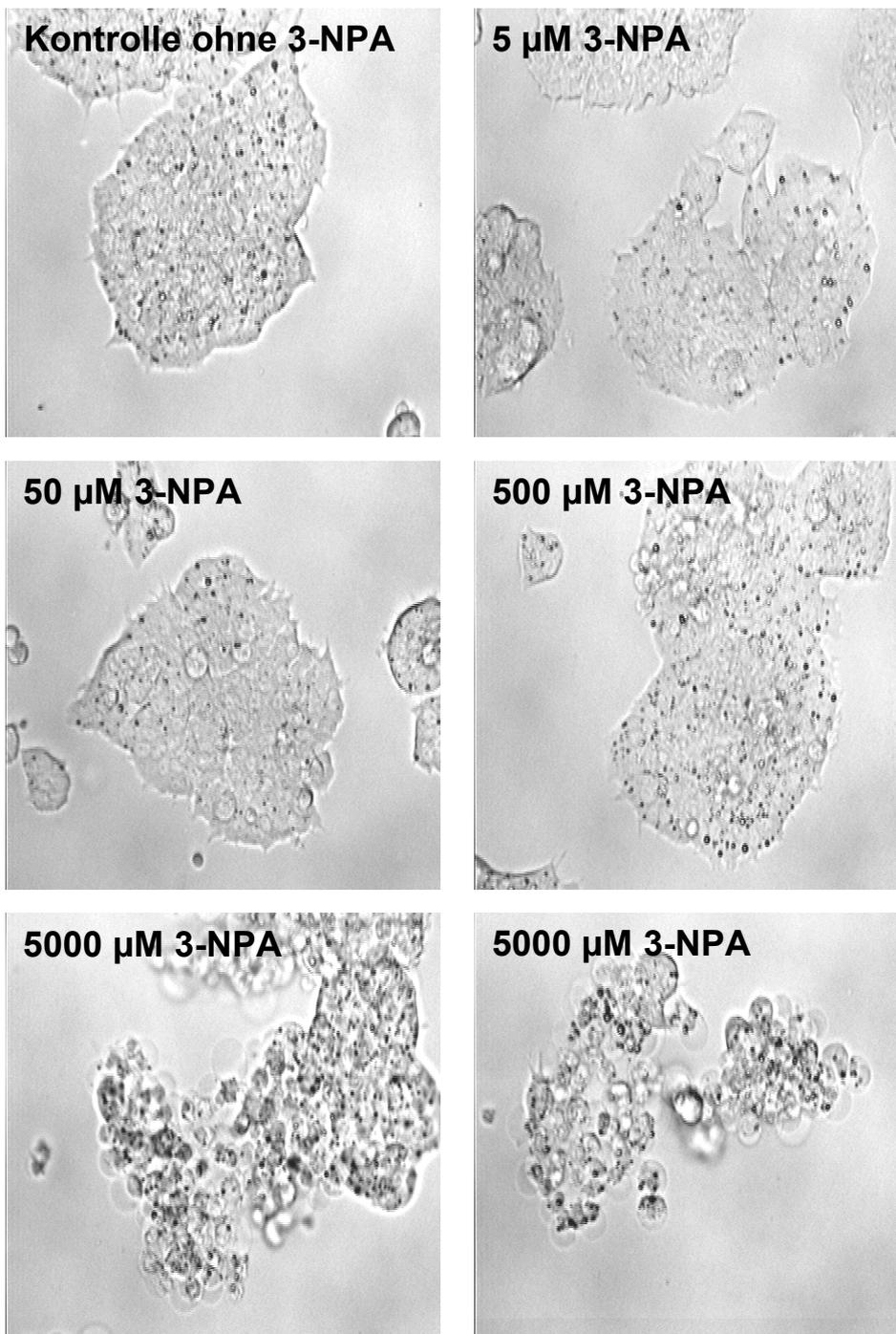


Abbildung 9: Vitalfärbung mit Trypanblau zur Ermittlung der in den Versuchen eingesetzten Hemmstoffkonzentration von 3-NPA. Tote PC12-Zellen nahmen den Farbstoff auf und färbten sich blau, sie stellen sich hier dunkelgrau dar.

4.2 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren

4.2.1 Hypoxie-bedingter ROS-Anstieg in PC12-Zellen

In 21 Versuchen wurde unter Verwendung von DCF die Fluoreszenzintensität unter Normoxie und Hypoxie verglichen. Es konnte bei allen Messungen ein signifikanter Anstieg (Median = 1,8) der Fluoreszenzintensität, d.h. der ROS-Bildung, unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden (siehe Tabelle 7 und Abbildungen 10-12).

20% O ₂	5% O ₂
1	1,42
1	1,4
1	2,06
1	1,94
1	1,24
1	1,5
1	1,5
1	1,76
1	2,1
1	2,4
1	1,8
1	1,2
1	1,5
1	1,53
1	1,53
1	2,04
1	1,8
1	1,9
1	2,66
1	2,26
1	3,42

Tabelle 7: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei PC12-Kontrollzellen in 21 unabhängigen Versuchen.

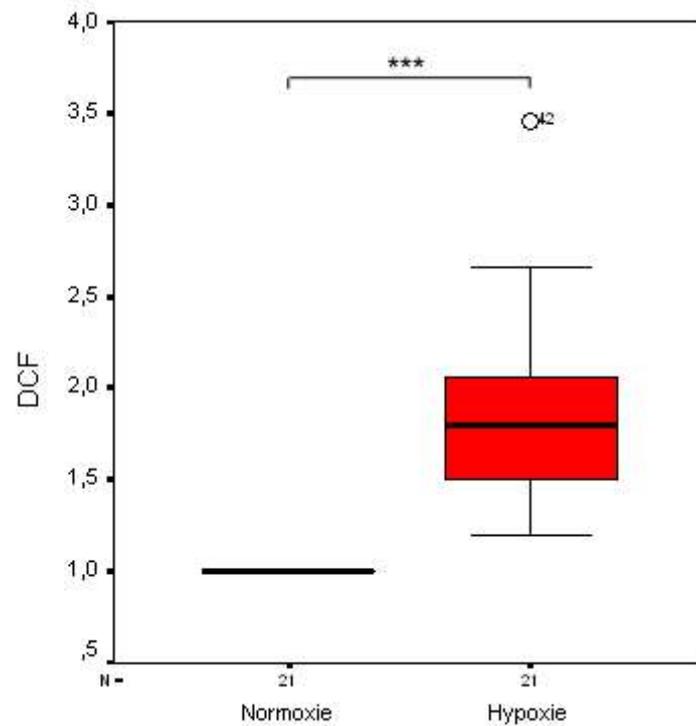


Abbildung 10: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz in 21 Versuchen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) (***) ($p < 0,001$).

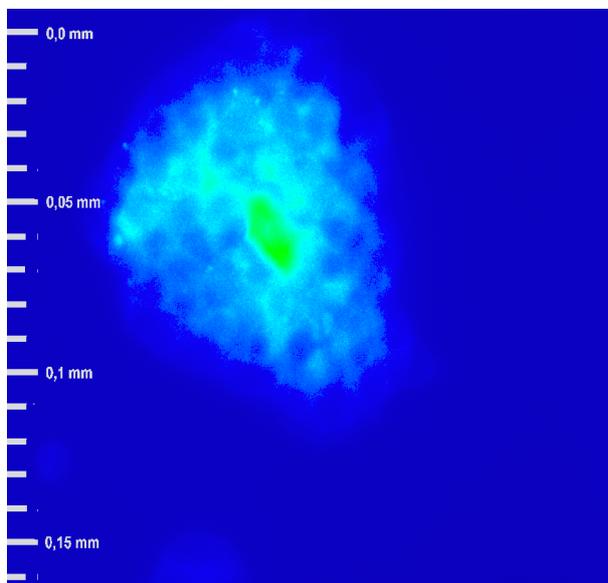


Abbildung 11: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

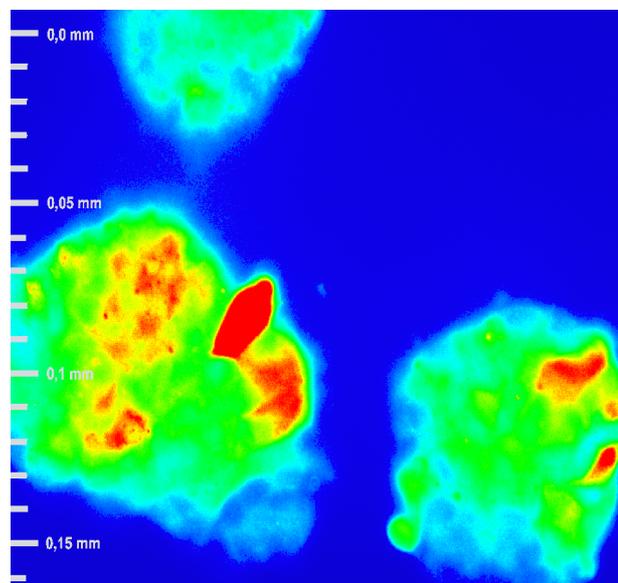


Abbildung 12: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂).

4.2.2 Inkubation von PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren

4.2.2.1 DPI

Unter normoxischen Bedingungen führte die Zugabe des Flavoproteinhemmers DPI zu keiner signifikanten Veränderung der ROS-Produktion in PC12-Zellen.

Nach DPI-Inkubation konnte bei den PC12-Zellen unter Hypoxie ein Trend zu einer höheren ROS-Produktion als unter Normoxie beobachtet werden, dieser war jedoch nicht signifikant. Unter Hypoxie kam es bei den mit DPI-behandelten PC12-Zellen zu einer nicht-signifikanten Abschwächung der ROS-Bildung im Vergleich zu den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen (siehe Tabelle 8 und Abbildungen 13-17).

<i>20% O₂ + DPI</i>	<i>5% O₂ + DPI</i>
0,96	1,12
1,57	2,23
0,87	3,28
1,5	1,28
1,04	1,57
1,03	1,31
0,78	1,03

Tabelle 8: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei DPI-inkubierten PC12-Zellen in 7 unabhängigen Versuchen.

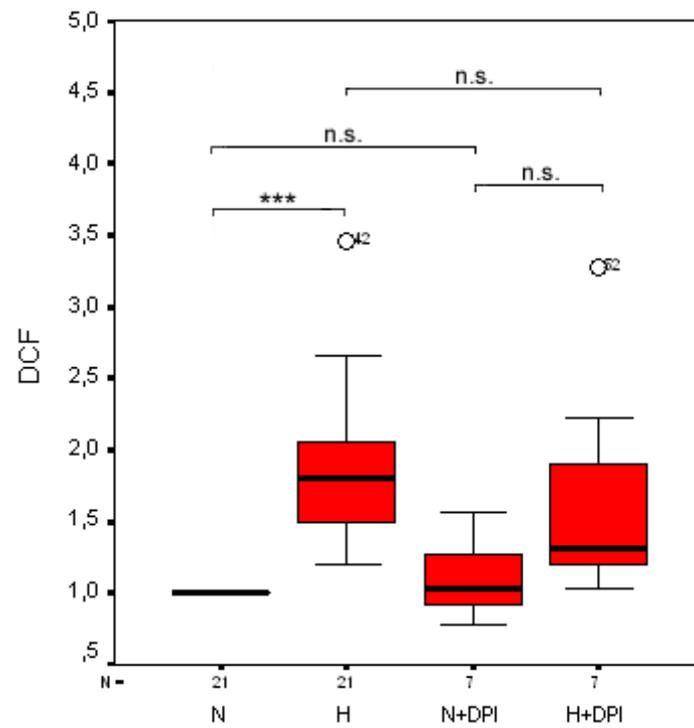


Abbildung 13: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) und DPI-Inkubation bei PC12-Zellen (***) $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$).

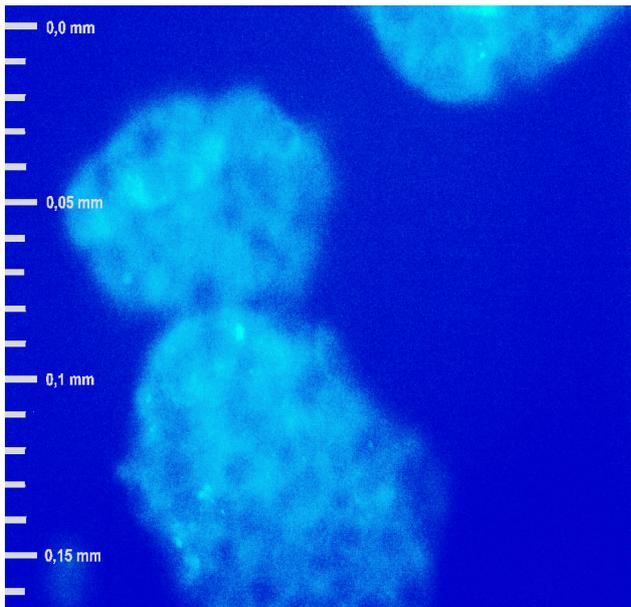


Abbildung 14: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

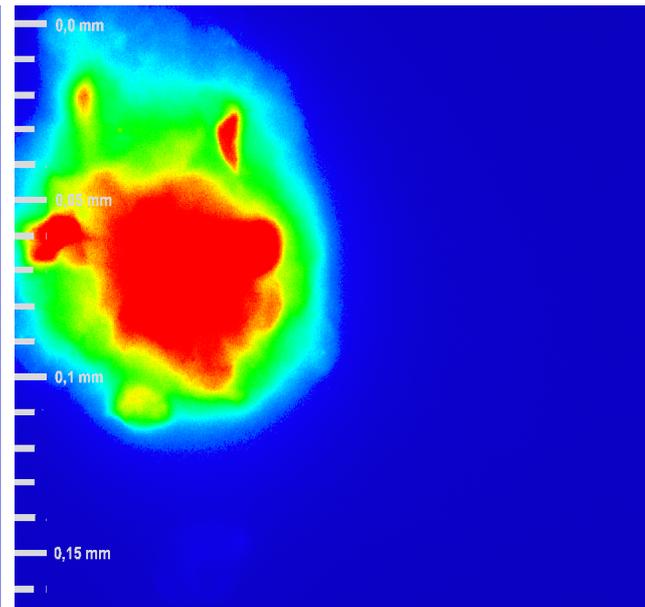


Abbildung 15: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂).

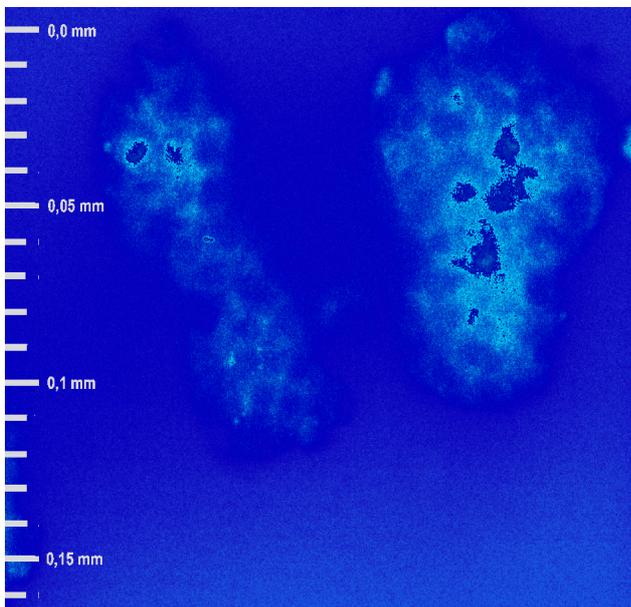


Abbildung 16: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und DPI-Inkubation.

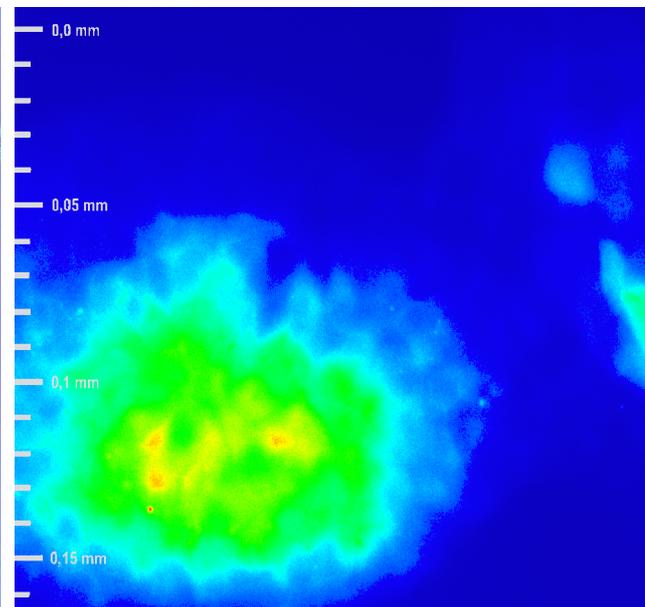


Abbildung 17: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂) und DPI-Inkubation.

4.2.2.2 3-NPA

Unter Normoxie konnte bei Zugabe von 3-NPA eine geringe, signifikante Abschwächung der ROS-Produktion festgestellt werden.

Die mit 3-NPA behandelten Zellen wiesen unter Hypoxie eine höhere ROS-Produktion auf

als unter normoxischen Bedingungen. Dieser Anstieg der ROS-Bildung war jedoch geringer als bei den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen (siehe Tabelle 9 und Abbildungen 18-20).

<i>20% O₂ + 3-NPA</i>	<i>5% O₂ + 3-NPA</i>
1,3	1,19
0,94	1,49
0,87	2,8
0,98	1,3
0,98	1
0,69	0,99

Tabelle 9: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei 3-NPA-inkubierten PC12-Zellen in 6 unabhängigen Versuchen.

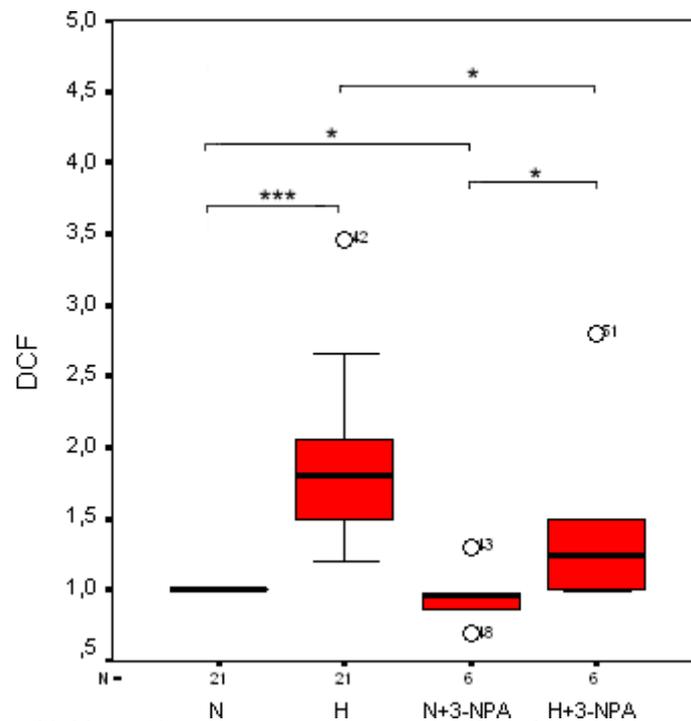


Abbildung 18: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) und 3-NPA-Inkubation bei PC12-Zellen. (***) $p < 0,001$; (*) $p < 0,05$).

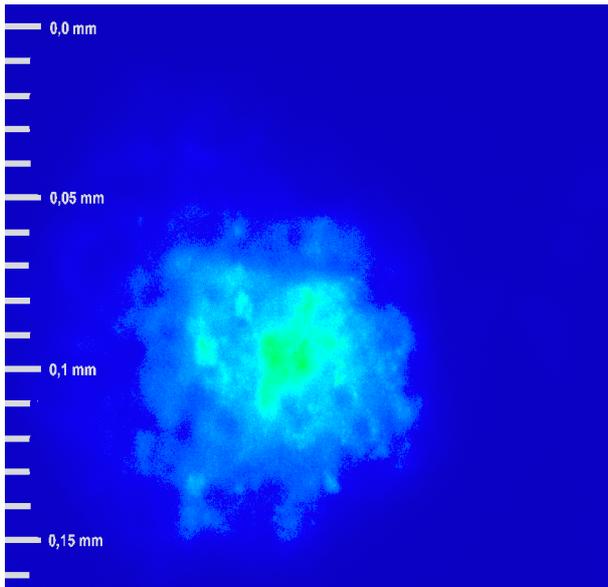


Abbildung 19: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und 3-NPA-Inkubation.

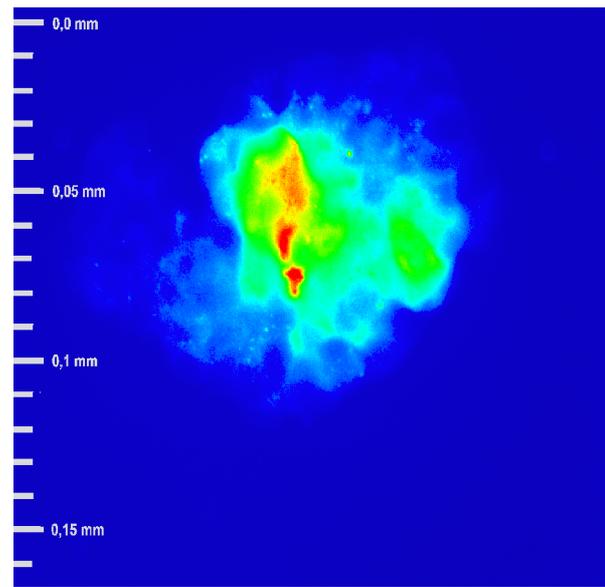


Abbildung 20: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂) und 3-NPA-Inkubation.

4.2.2.3 TTFA

Unter normoxischen Bedingungen waren nach TTFA-Inkubation keine signifikanten Unterschiede in der ROS-Produktion festzustellen. Nach TTFA-Zugabe konnte unter Hypoxie ein deutlicher, signifikanter Anstieg in der ROS-Bildung beobachtet werden, der genauso hoch war, wie bei den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen (siehe Tabelle 10 Abbildungen 21-23).

<i>20% O₂ + TTFA</i>	<i>5% O₂ + TTFA</i>
0,78	2
1,06	2,02
0,76	2,67
1,05	2,08
0,91	1,42

Tabelle 10: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei TTFA-inkubierten PC12-Zellen in 5 unabhängigen Versuchen.

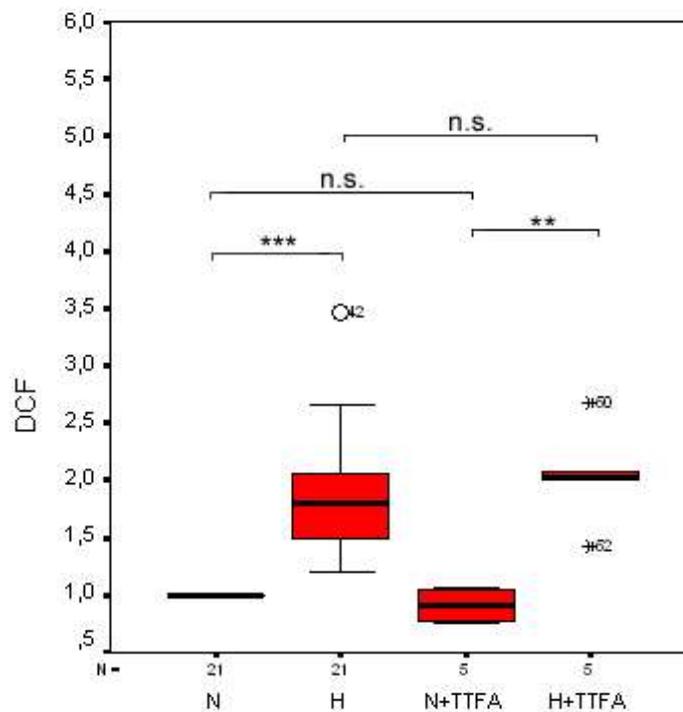


Abbildung 21: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) und TTFA-Inkubation bei PC12-Zellen (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

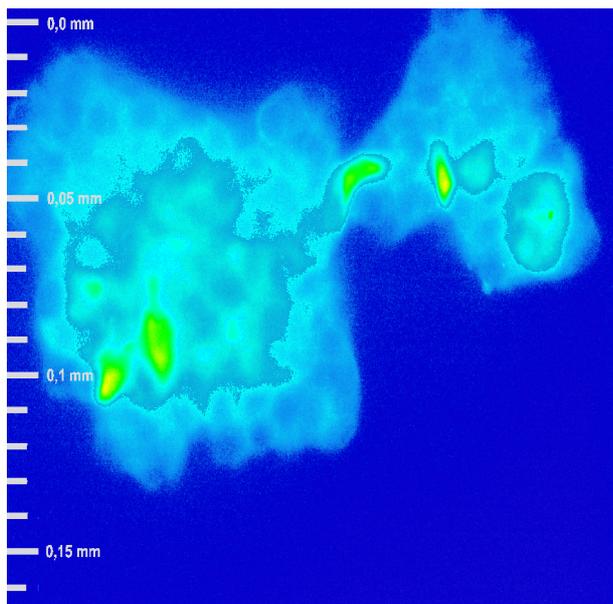


Abbildung 22: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und TFA-Inkubation.

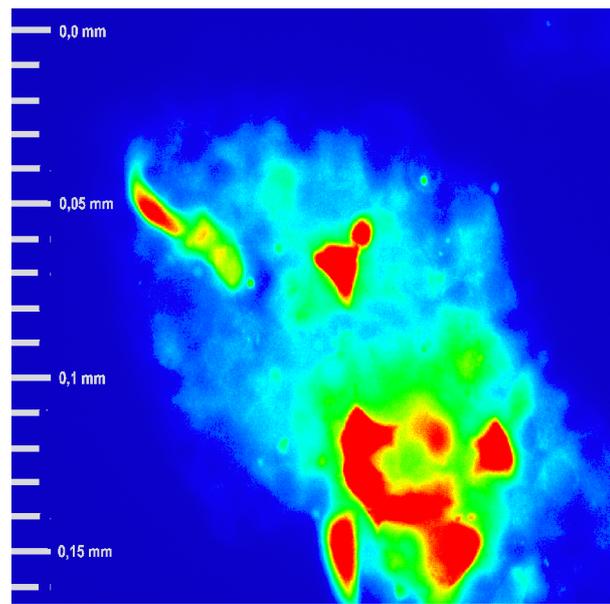


Abbildung 23: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂) und TFA-Inkubation.

4.2.2.4 Succinat

Unter Normoxie konnte bei Zugabe von Succinat kein signifikanter Unterschied in der ROS-Produktion festgestellt werden. Die mit Succinat behandelten Zellen zeigten nach Inkubation unter Hypoxie eine signifikante Zunahme der ROS-Produktion, die jedoch geringer war als bei den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen (siehe Tabelle 11 und Abbildungen 24-26).

20% O ₂ + Succinat	5% O ₂ + Succinat
0,87	1,61
1,03	1,41
1,06	1,16
1,56	1,08
0,88	1,78
1,03	1,48

Tabelle 11: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei Succinat-inkubierten PC12-Zellen in 6 unabhängigen Versuchen.

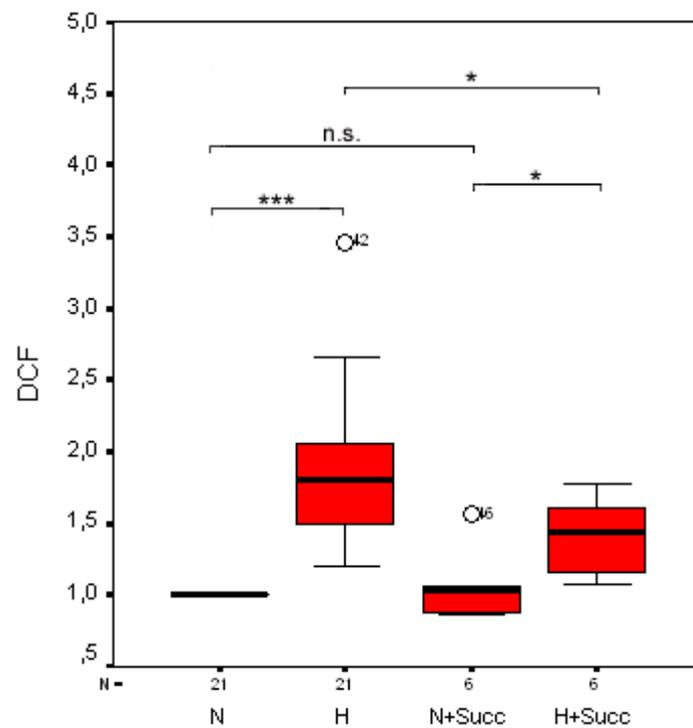


Abbildung 24: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) und Succinat-Inkubation bei PC12-Zellen. (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$; n.s. $p > 0,05$).

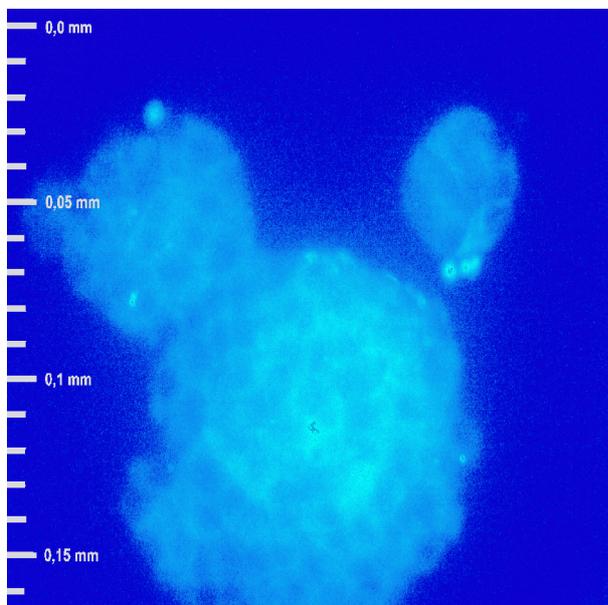


Abbildung 25: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Succinat-Inkubation.

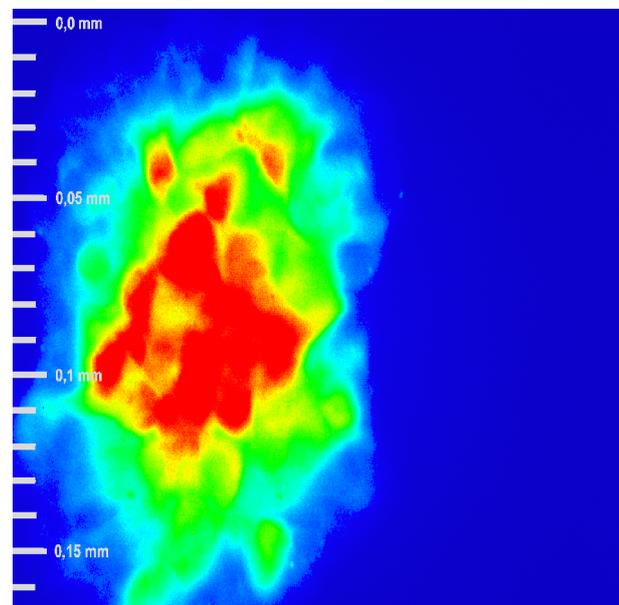


Abbildung 26: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung in PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂) und Succinat-Inkubation.

4.2.2.5 NBT

Unter Normoxie war nach NBT-Inkubation kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen NBT-behandelten Zellen und PC12-Kontrollzellen festzustellen. NBT verhinderte unter hypoxischen Bedingungen einen Anstieg der ROS-Bildung (siehe Tabelle 12 und Abbildungen 27-29).

<i>20% O₂ + NBT</i>	<i>5% O₂ + NBT</i>
0,97	0,81
0,93	1,12
0,99	1,14
1,07	1,04
0,94	1,03
1,04	1,1

Tabelle 12: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) bei NBT-inkubierten PC12-Zellen in 6 unabhängigen Versuchen.

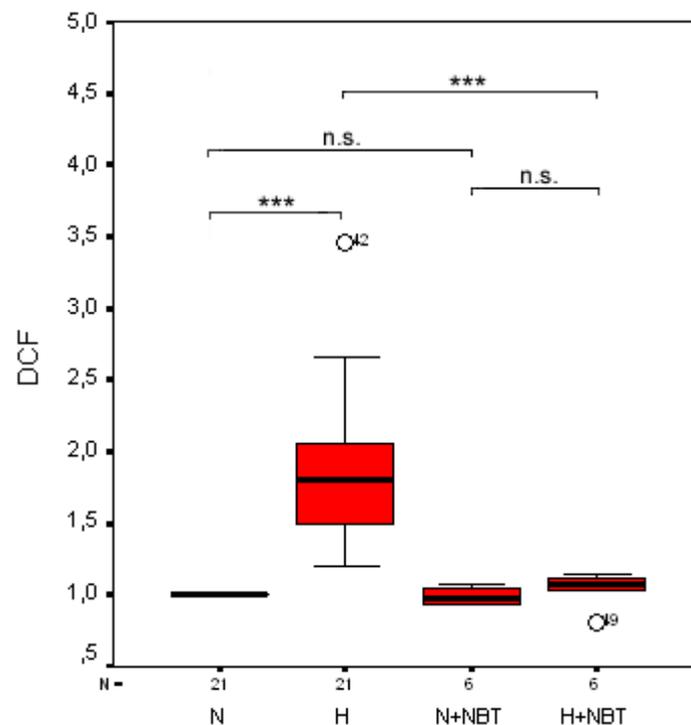


Abbildung 27: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz eines Versuchstages nach einstündiger Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) und NBT-Inkubation bei PC12-Zellen (***) $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$).

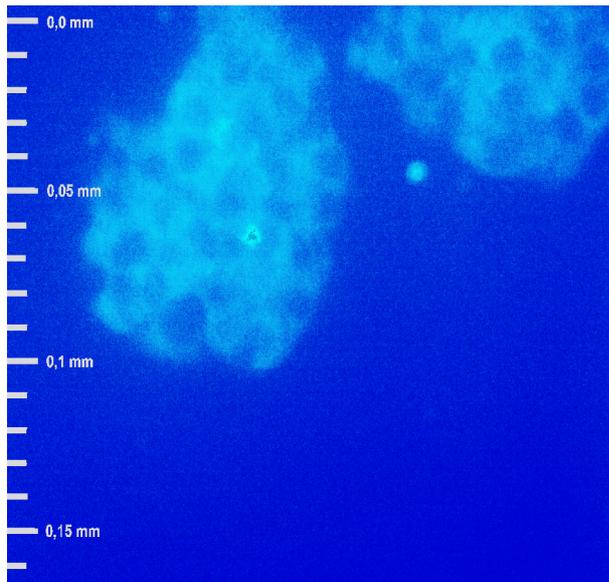


Abbildung 28: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und NBT-Inkubation.

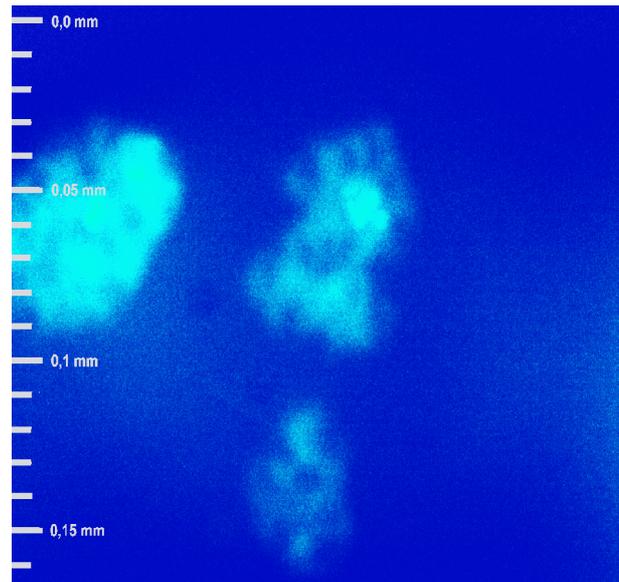


Abbildung 29: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (5% O₂) und NBT-Inkubation.

4.3 PCR

Mittels der RT-PCR wurden Produkte mit der erwarteten Größe amplifiziert: β -Aktin 132 bp, TH 216 bp und ADM 200 bp.

Die Sequenzierung der Amplifikate zeigte die Identität mit den erwarteten Produkten.

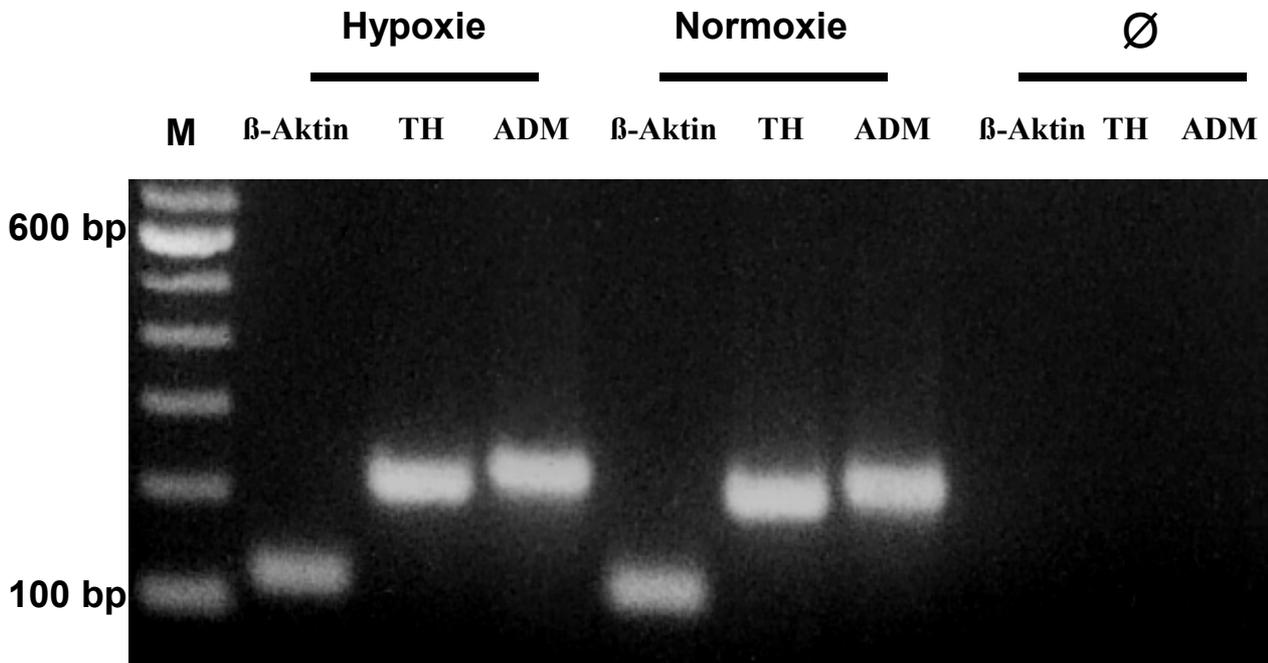


Abbildung 30: Elektrophoresegel der PCR-Produkte von β -Aktin, TH und ADM. M = Größenstandard. Die PCR-Fragmente zeigen die erwartete Größe: β -Aktin = 132 bp, TH = 216 bp, ADM = 200 bp. Ø = Wasserprobe.

4.4 Quantitative RT-PCR

4.4.1 Messung der relativen TH-Expression

4.4.1.1 Hypoxie-bedingter Anstieg der relativen TH-Expression

In 6 Versuchen wurde die relative TH-Expression unter Normoxie und Hypoxie verglichen. In allen 6 Versuchen konnte ein Hypoxie-bedingter signifikanter Anstieg (Median = 2,2) der relativen TH-Expression festgestellt werden (siehe Tabelle 13 und Abbildung 31).

<i>PC12 20% O₂</i>	<i>PC12 5% O₂</i>
1	2,5
1	8,82
1	1,66
1	2,19
1	2,27
1	1,52

Tabelle 13: Medianwerte der relativen TH-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) in 6 unabhängigen Versuchen.

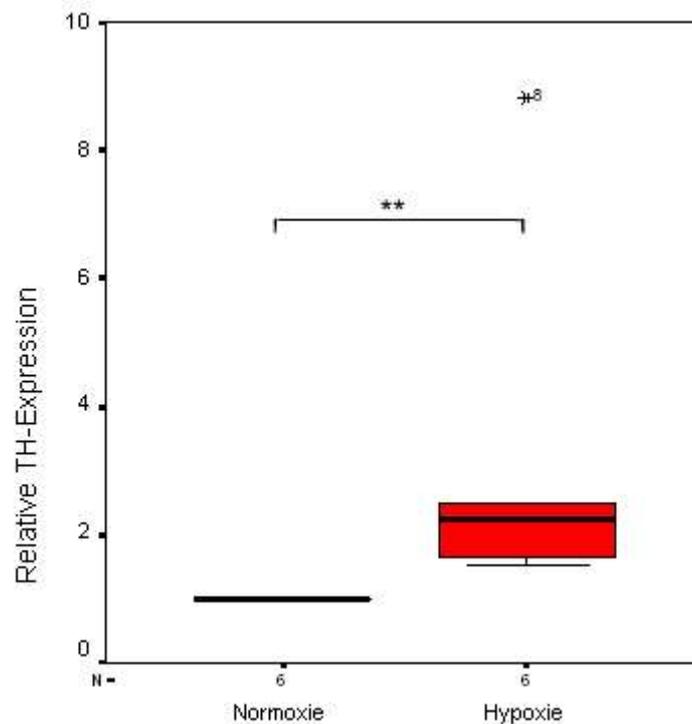


Abbildung 31: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen TH-Expression in PC12-Zellen in 6 Versuchen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$).

4.4.1.1.1 DPI

Unter Normoxie konnte nach Zugabe des Flavoproteinhemmers DPI eine nicht-signifikante Zunahme der relativen TH-Expression gemessen werden.

Nach DPI-Inkubation war unter Hypoxie gegenüber den normoxischen DPI-inkubierten und den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen keine Veränderungen in der relativen TH-Expression festzustellen. DPI blockt den Hypoxie-induzierten Anstieg der TH-Expression (siehe Tabelle 14 und Abbildung 32).

<i>20% O₂</i>	<i>5% O₂</i>	<i>20% O₂ + DPI</i>	<i>5% O₂ + DPI</i>
1	2,5	2,08	1,95
1	8,82	2,36	2,31
1	1,66	0,89	1,15
1	2,19	1,48	1,79
1	2,27	2,03	2,03
1	1,52	1,69	1,78

Tabelle 14: Medianwerte der relativen TH-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach DPI-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

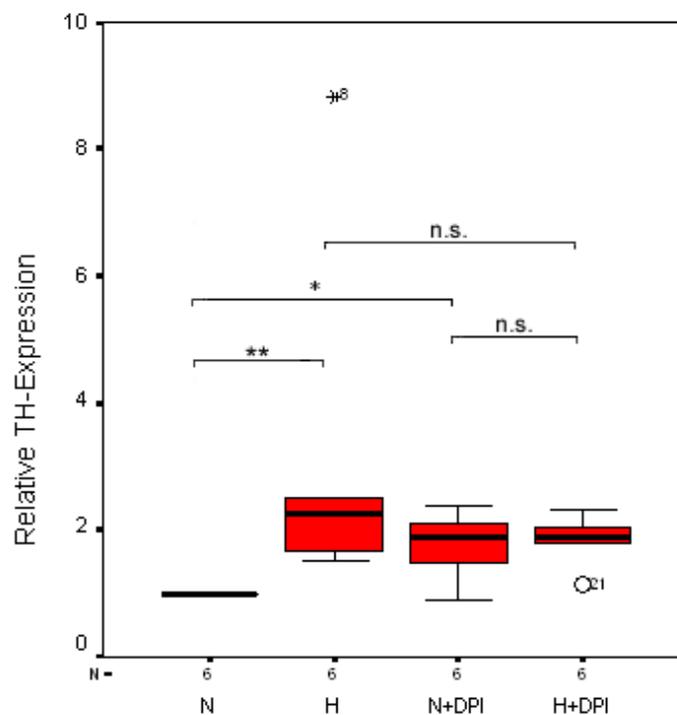


Abbildung 32: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen TH-Expression in PC12-Kontrollzellen und DPI-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.1.1.2 TTFA

Unter normoxischen Bedingungen führte die Zugabe von TTFA zu keiner signifikanten Änderung der relativen TH-Expression.

Die Messergebnisse TTFA-inkubierter Zellen zeigten unter Hypoxie gegenüber den normoxischen TTFA-behandelten Zellen eine signifikante Zunahme der TH-Expression, die sich nicht signifikant von den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen unterschied (siehe Tabelle 15 und Abbildung 33).

20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂ + TTFA	5% O ₂ + TTFA
1	2,5	1,35	1,95
1	8,82	2,2	2,97
1	1,66	0,63	1,66
1	2,19	1,07	2,85
1	2,27	1,01	3,29
1	1,52	1,26	2,51

Tabelle 15: Medianwerte der relativen TH-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach TTFA-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

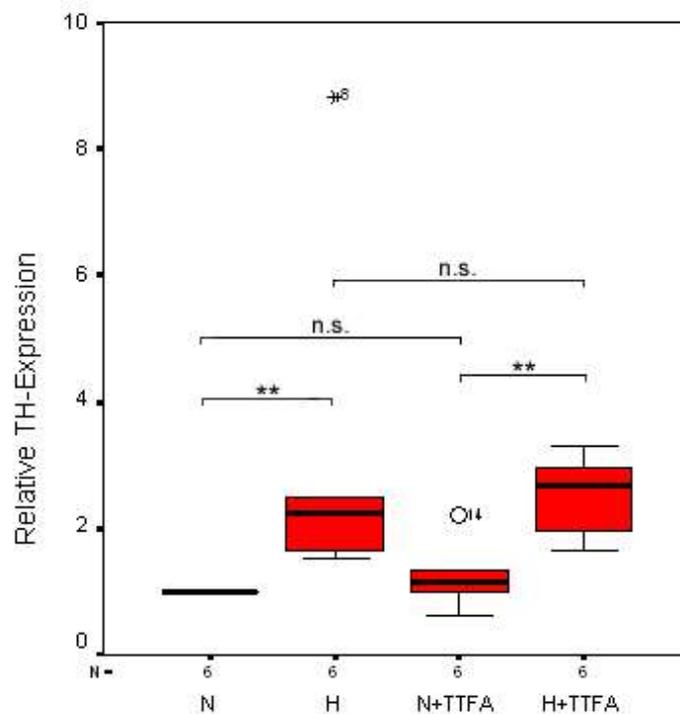


Abbildung 33: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen TH-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und TTFA-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.1.1.3 3-NPA

Nach Zugabe von 3-NPA war unter Normoxie keine Änderung in der relativen TH-Expression feststellbar. Nach 3-NPA-Inkubation zeigten die PC12-Zellen unter Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen 3-NPA-behandelten Zellen eine signifikante Zunahme der TH-Expression, die sich nicht signifikant von den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen unterschied (siehe Tabelle 16 und Abbildung 34).

20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂ + 3-NPA	5% O ₂ + 3-NPA
1	2,5	0,97	1,95
1	8,82	1,41	6,28
1	1,66	0,86	1,35
1	2,19	1,03	2,64
1	2,27	0,87	2,43
1	1,52	1,13	6,23

Tabelle 16: Medianwerte der relativen TH-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach 3-NPA-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

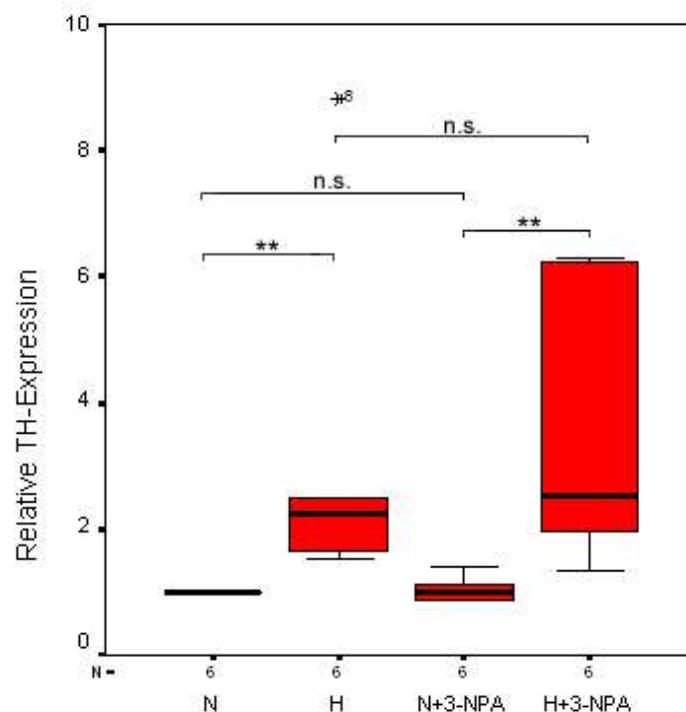


Abbildung 34: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen TH-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und 3-NPA-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.1.1.4 Succinat

Unter normoxischen Bedingungen konnte nach Succinatzugabe keine signifikante Veränderung der relativen TH-Expression festgestellt werden.

Nach Succinatinkubation konnte unter Hypoxie gegenüber den normoxischen behandelten Zellen eine signifikante Zunahme der relativen TH-Expression beobachtet werden, die sich nicht von den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen unterschied (siehe Tabelle 17 und Abbildungen 35-39).

<i>20% O₂</i>	<i>5% O₂</i>	<i>20% O₂+ Succinat</i>	<i>5% O₂+ Succinat</i>
1	2,5	0,89	1,52
1	8,82	1,21	3,84
1	1,66	0,57	1,66
1	2,19	0,8	3,18
1	2,27	0,88	2,55
1	1,52	0,85	2,08

Tabelle 17: Medianwerte der relativen TH-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach Succinat-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

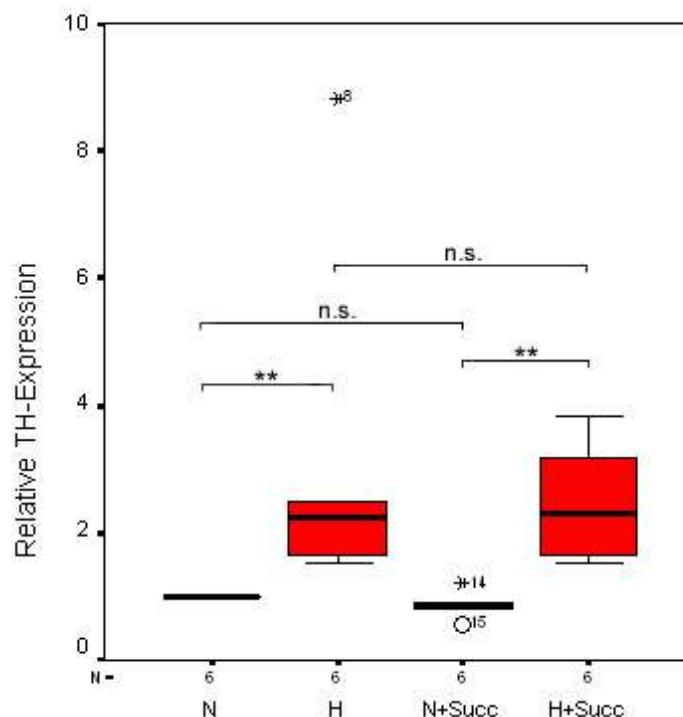


Abbildung 35: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen TH-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und Succinat-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

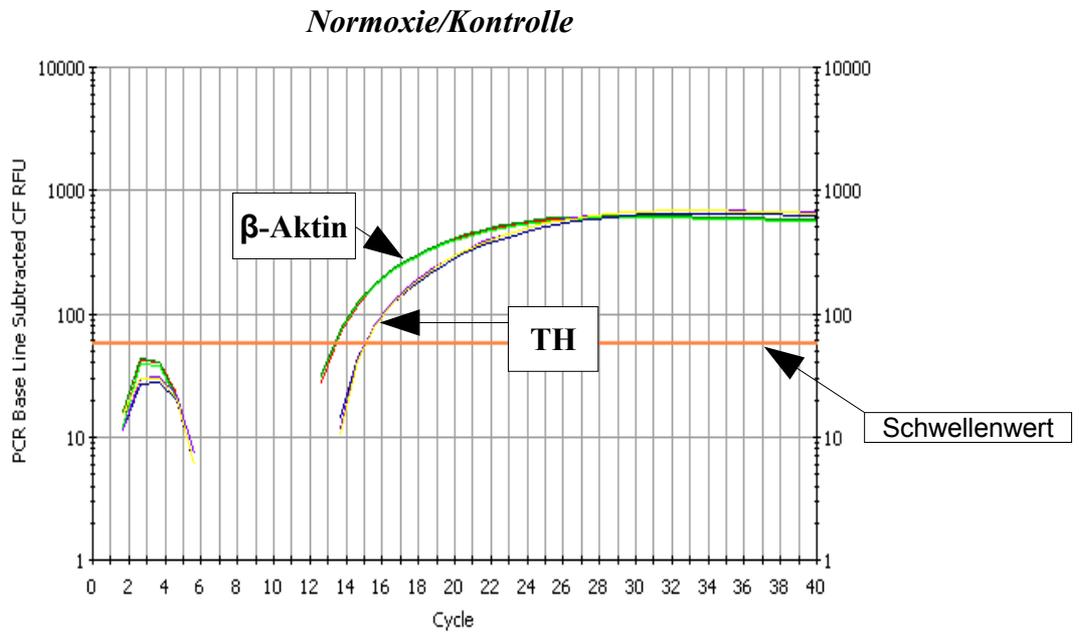


Abbildung 36: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und TH unter Normoxie. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

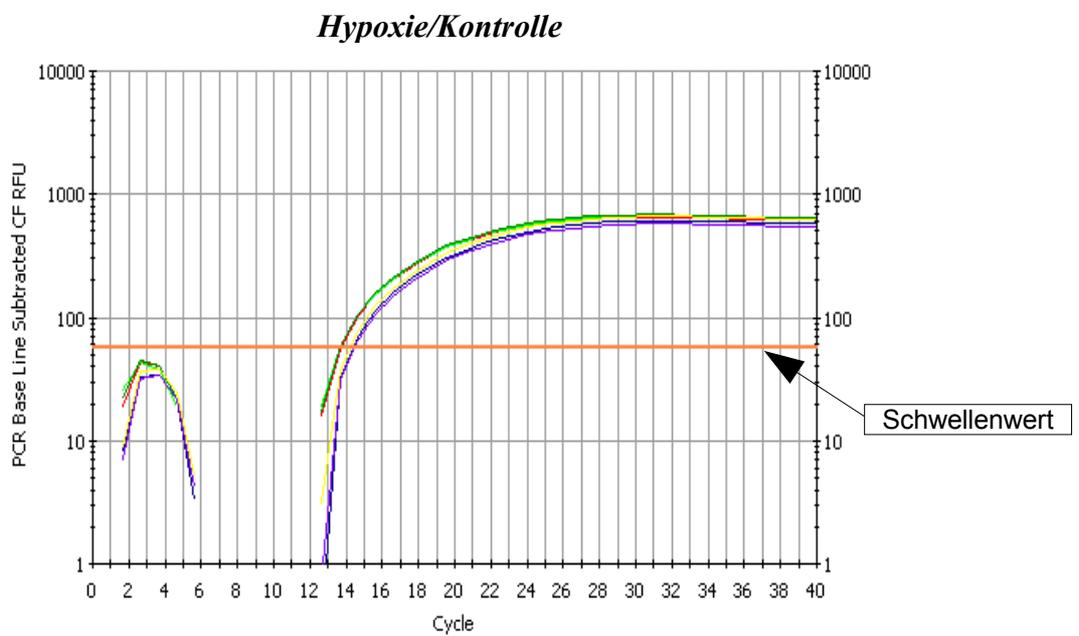


Abbildung 37: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und TH unter Hypoxie. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

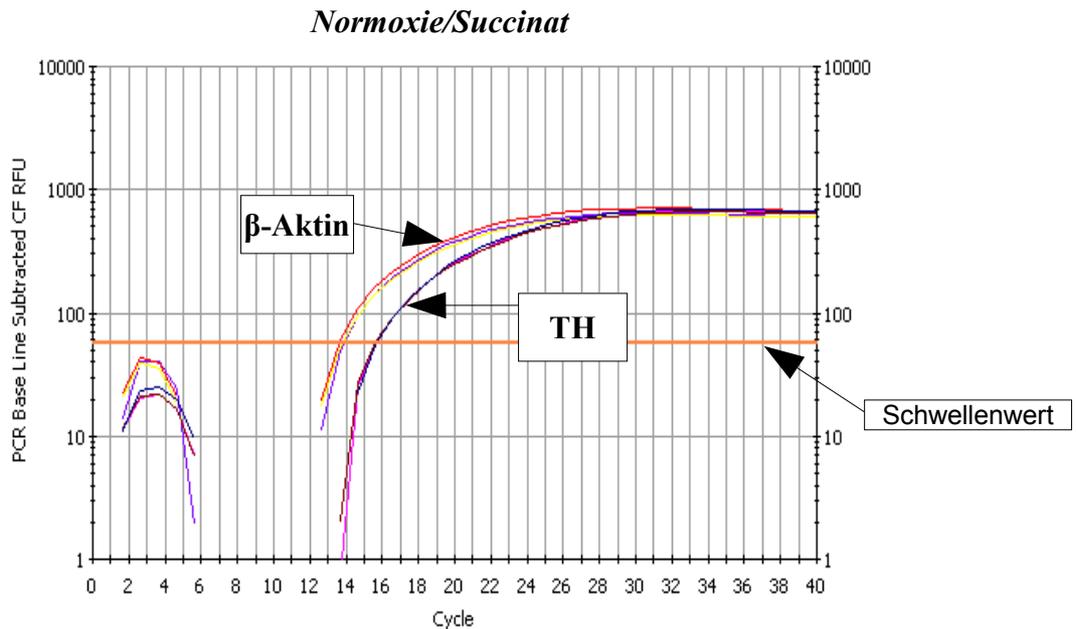


Abbildung 38: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und TH nach Succinatinkubation unter Normoxie. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

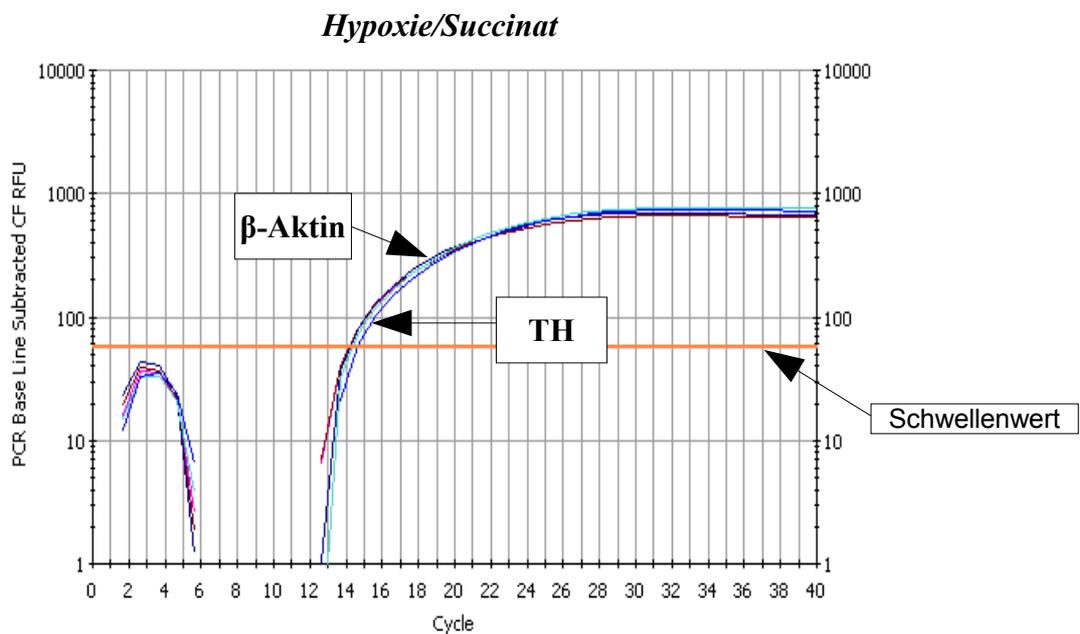


Abbildung 39: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und TH nach Succinatinkubation unter Hypoxie. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

Die Abbildungen 36-39 zeigen die Echtzeitdarstellungen der PCR-Amplifikation von β -Aktin, TH und ADM eines Versuchstages. Die PC12-Zellen wurden unbehandelt und unter Zugabe von Succinat sechs Stunden unter Normoxie und Hypoxie inkubiert

4.4.2 Messung der relativen ADM-Expression

4.4.2.1 Hypoxie-bedingter Anstieg der relativen ADM-Expression

In 5 Versuchen wurde die relative ADM-Expression unter Normoxie und Hypoxie verglichen. In allen 5 Versuchen konnte ein Hypoxie-bedingter signifikanter Anstieg der relativen ADM-Expression (Median = 2) festgestellt werden (siehe Tabelle 18 und Abbildung 40).

20% O ₂	5% O ₂
1	3,25
1	4,29
1	1,59
1	2,06
1	1,54

Tabelle 18: Medianwerte der relativen ADM-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) in 6 unabhängigen Versuchen.

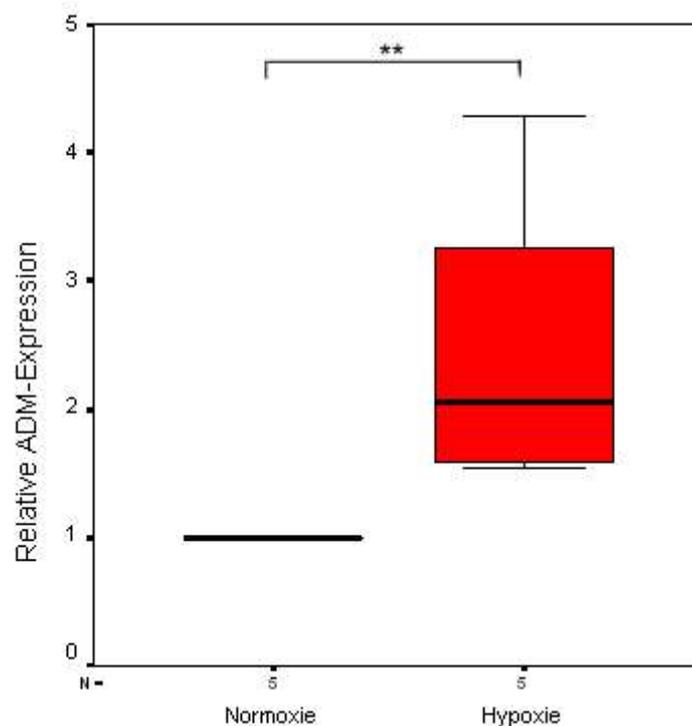


Abbildung 40: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen ADM-Expression bei PC12-Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$).

4.4.2.1.1 DPI

Unter normoxischen Bedingungen konnte nach Einsatz des Flavoproteinhemmers DPI eine signifikante Zunahme relativen ADM-Expression beobachtet werden. Dieser Anstieg erfolgte auf dem Niveau der TH-Expression unbehandelter Zellen in Hypoxie. Hypoxie führte in DPI-behandelten Zellen zu keinem weiteren Anstieg der relativen TH-Expression (siehe Tabelle 19 und Abbildung 41).

20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂ + DPI	5% O ₂ + DPI
1	3,25	2,69	2,89
1	4,29	2,71	2,36
1	1,59	1,59	1,93
1	2,06	2,06	2,06
1	1,54	1,41	1,49

Tabelle 19: Medianwerte der relativen ADM-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach DPI-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

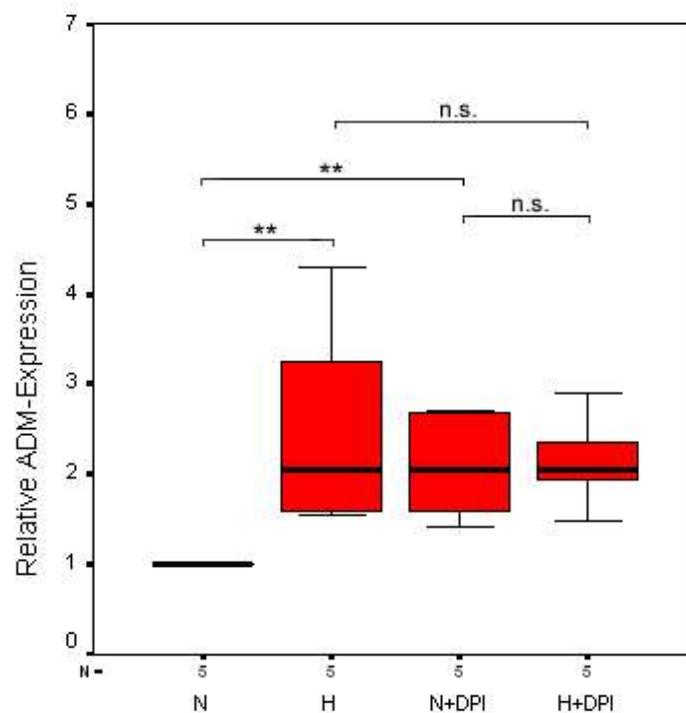


Abbildung 41: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen ADM-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und DPI-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.2.1.2 TTFA

Unter Normoxie kam es nach TTFA-Behandlung zu einem nicht-signifikanten Trend zur Abnahme der relativen ADM-Expression.

Die TTFA-Inkubation führte unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den normoxischen TTFA-behandelten Zellen zu einer signifikanten Zunahme der relativen ADM-Expression, die der von unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen entsprach (siehe Tabelle 20 und Abbildung 42).

20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂ + TTFA	5% O ₂ + TTFA
1	3,25	0,91	2,64
1	4,29	1,07	2,71
1	1,59	0,5	1,83
1	2,06	0,98	2,43
1	1,54	0,64	1,72

Tabelle 20: Medianwerte der relativen ADM-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach TTFA-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

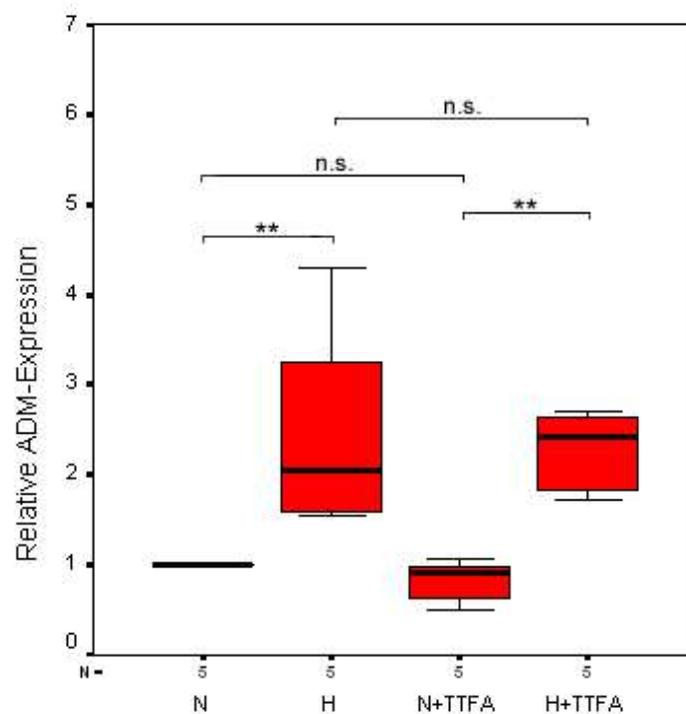


Abbildung 42: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen ADM-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und TTFA-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.2.1.3 3-NPA

Unter Normoxie konnte zwischen 3-NPA behandelten und unbehandelten PC12-Zellen kein signifikanter Unterschied in der relativen ADM-Expression festgestellt werden.

Nach 3-NPA-Inkubation konnte unter Hypoxie ein signifikanter Anstieg der relativen ADM-Expression gemessen werden. Dieser Anstieg zeigte im Vergleich zu den unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen einen Trend zu einer Zunahme der relativen ADM-Expression, der jedoch nicht signifikant war (siehe Tabelle 21 und Abbildung 43).

<i>20% O₂</i>	<i>5% O₂</i>	<i>20% O₂+ 3-NPA</i>	<i>5% O₂+ 3-NPA</i>
1	3,25	1,17	2,69
1	4,29	1,39	4,44
1	1,59	0,89	2
1	2,06	1,06	3,18
1	1,54	1,13	6,54

Tabelle 21: Medianwerte der relativen ADM-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach 3-NPA-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

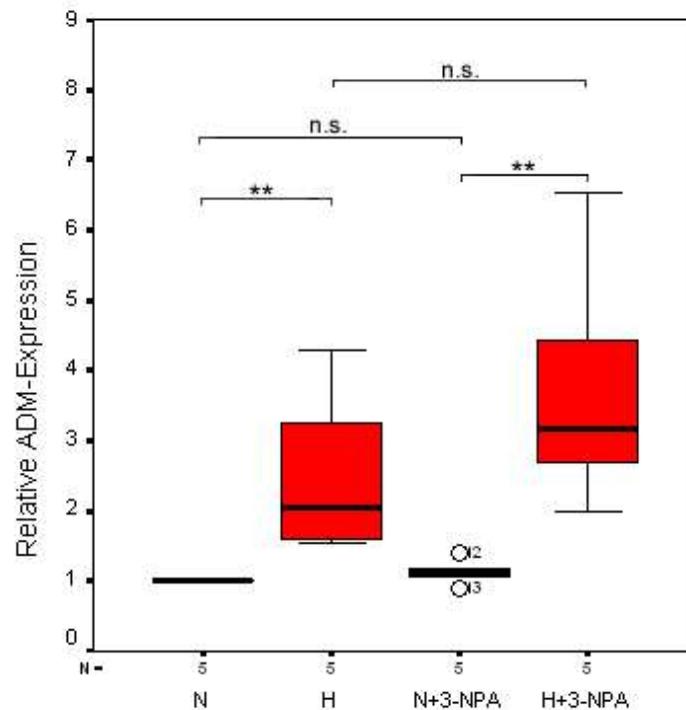


Abbildung 43: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen ADM-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und 3-NPA-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (** $p < 0,01$; n.s. $p > 0,05$).

4.4.2.1.4 Succinat

Unter Normoxie kam es durch Succinatbehandlung zu einer geringen, nicht-signifikanten Abnahme der relativen ADM-Expression. Die Succinatinkubation führte unter Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen Succinat-behandelten Zellen zu einer signifikanten Zunahme der relativen ADM-Expression, die der von unbehandelten hypoxischen Kontrollzellen entsprach (siehe Tabelle 22 und Abbildung 44-48).

20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂ + Succinat	5% O ₂ + Succinat
1	3,25	0,93	1,59
1	4,29	1,39	2,58
1	1,59	0,56	2,07
1	2,06	0,7	2,85
1	1,54	0,27	2,11

Tabelle 22: Medianwerte der relativen ADM-Expression in PC12-Zellen nach sechsständiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (5% O₂) sowie nach Succinat-Inkubation in 6 unabhängigen Versuchen.

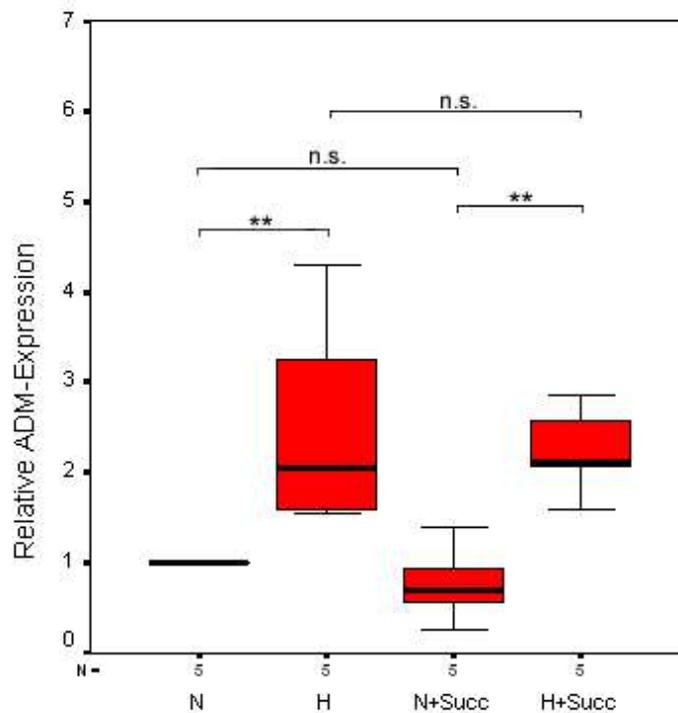


Abbildung 44: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der relativen ADM-Expression eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und 3-NPA-inkubierten Zellen nach sechs Stunden Normoxie (N, 20% O₂) und Hypoxie (H, 5% O₂) (n.s. $p > 0,05$; ** $p < 0,01$).

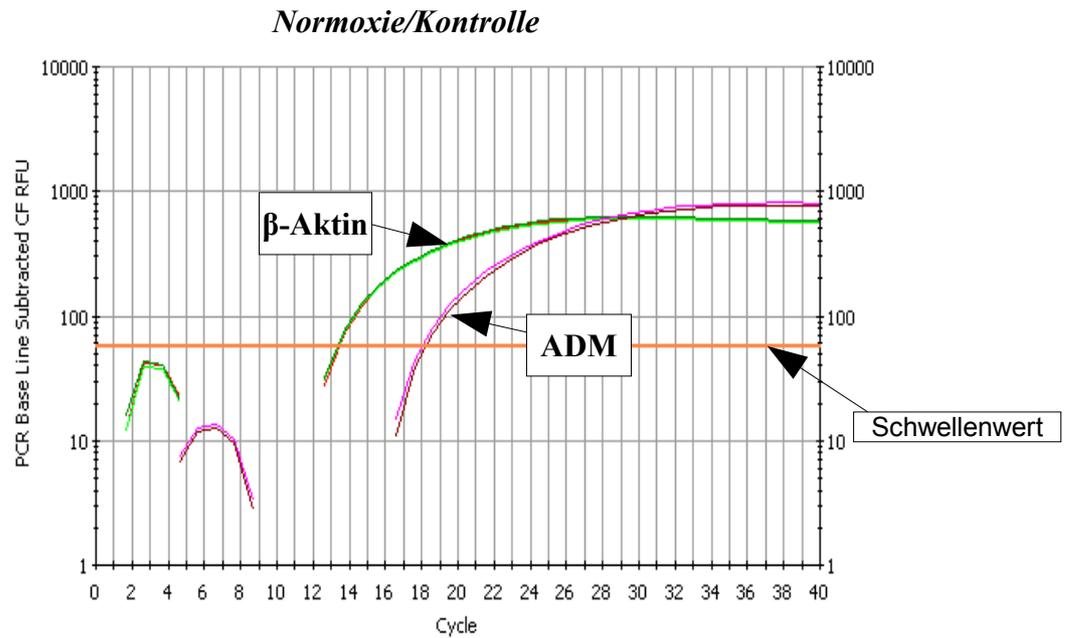


Abbildung 45: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und ADM unter Normoxie. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten.

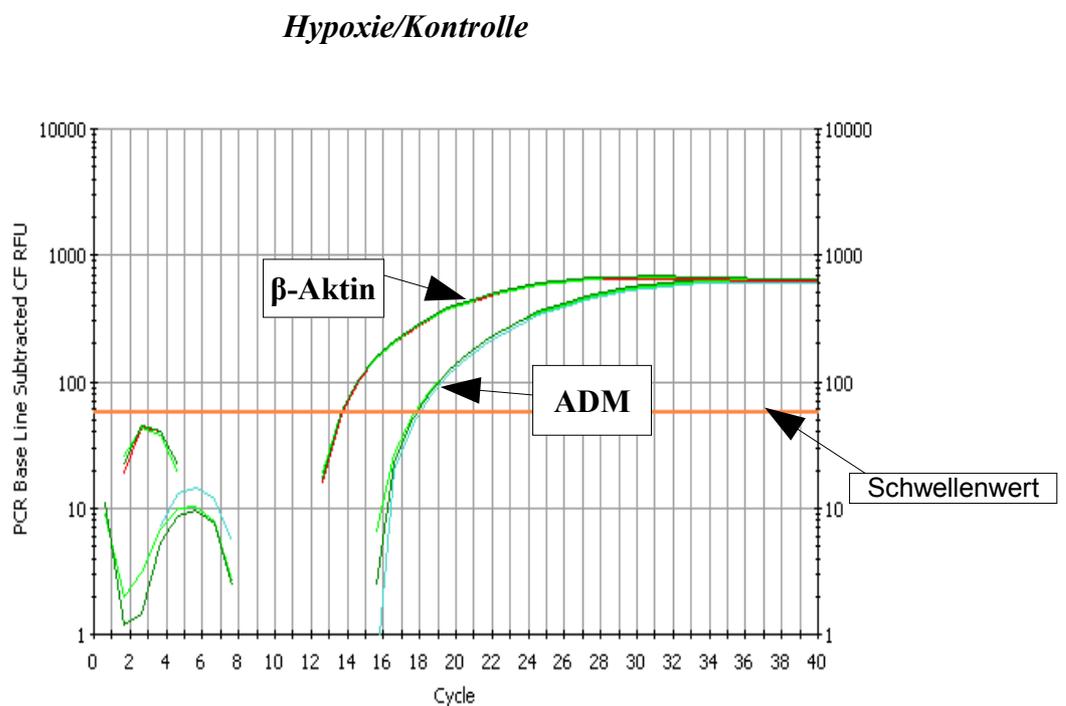


Abbildung 46: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und ADM unter Hypoxie. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten.

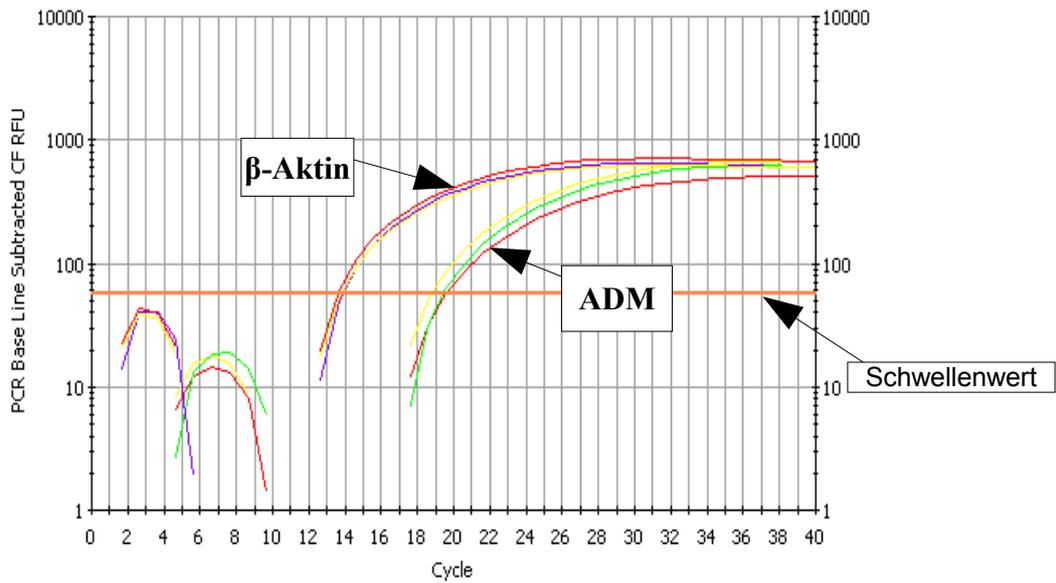
Normoxie/Succinat

Abbildung 47: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und ADM nach Succinatinkubation unter Normoxie. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten.

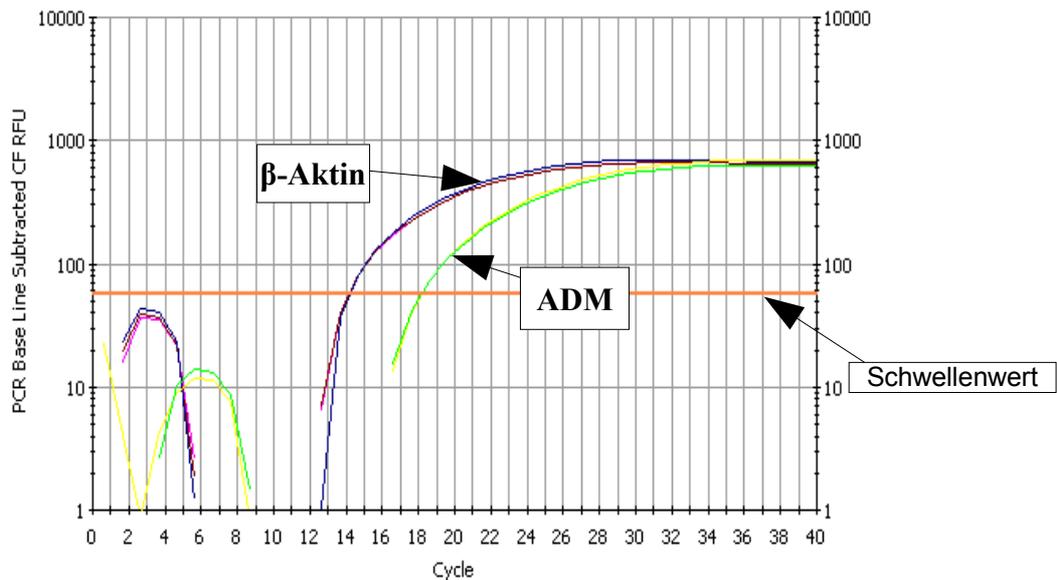
Hypoxie/Succinat

Abbildung 48: Echtzeitdarstellung der PCR-Amplifikation von β -Aktin und ADM nach Succinatinkubation unter Hypoxie. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten.

Die Abbildungen 45-48 zeigen Echtzeitdarstellungen der PCR-Amplifikationen von β -Aktin, TH und ADM eines Versuchstages nach sechstündiger Normoxie, Hypoxie von unbehandelten PC12-Zellen sowie nach Succinatinkubation.

5 Diskussion

5.1 Messung der intrazellulären ROS-Bildung mittels des Fluoreszenzindikators DCF-DA

Der farblose Fluoreszenzindikator DCF-DA wird durch intrazellulär gebildete ROS in den innerhalb der Zelle gebildeten fluoreszierenden Metaboliten DCF oxidiert. Anhand der DCF-Fluoreszenzintensität kann die ROS-Bildung am Fluoreszenzmikroskop gemessen werden (Bass et al., 1983; Zhu et al., 1994; Wang et al., 1996; Crow, 1997; Gorman et al., 1997). Sell (2001) zeigte in ihren Experimenten, dass DCF-DA einen ebenso guten Indikator für intrazellulär gebildete ROS in PC12-Zellen darstellt wie der Fluoreszenzfarbstoff Dihydrorhodamin 123 (H_2R).

Die stabile lipidlösliche Diazetatform (DCF-DA) von DCFH ist membranpermeabel. In der Zelle spalten Esterasen die Azetatgruppe ab, so dass intrazellulär das reduzierte Agens DCFH entsteht. Rota et al. (1999) vermuten, dass die Abspaltung der Diazetatgruppe durch zelluläre Esterasen in geringen Mengen zur H_2O_2 -Bildung führen kann. Myhre et al. (2003) sehen diese H_2O_2 -Quelle in zellulären Systemen jedoch als nicht signifikant an. Die DCF-Fluoreszenzintensität reflektiert einen generellen Anstieg in der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (LeBel et al., 1992; Zhu et al., 1994). Es ist nach wie vor umstritten, welche reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen für die Oxidation von DCFH zu DCF verantwortlich sind. Zuerst wurde DCF-DA für die Messung von H_2O_2 in Anwesenheit der Peroxidase eingesetzt (Keston & Brandt, 1965). Rothe und Valet (1990) nehmen ebenfalls eine hohe Sensitivität für H_2O_2 und Hydroxylradikale und nur eine geringe Sensitivität für Superoxid an. Das Superoxidanion oxidiert DCFH nicht direkt. H_2O_2 ist hauptsächlich für die nichtenzymatische Oxidation von DCFH verantwortlich (LeBel et al., 1992; Zhu et al., 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten für DCFH eine geringe Sensitivität gegenüber der Oxidation durch NO, Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder H_2O_2 , beschrieben dagegen eine höhere Sensitivität für Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) (Royall & Ischiropoulos, 1993; Kooy et al., 1997; Possel et al., 1997). Andere Arbeitsgruppen beschrieben dagegen eine deutliche Sensitivität gegenüber der Oxidation für $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 und Hydroxylradikale ($\cdot OH$) (Scott et al., 1988; Zhu et al., 1994). Burkitt & Wardmann (2001) bemängeln die geringe Sensitivität von DCF als Repräsentant für ROS im Hinblick auf Änderungen in der Konzentration von Superoxiden oder H_2O_2 .

Myhre und Mitarbeiter (2003) beobachteten in ihren Experimenten, dass neutrophile Granulozyten unter alleiniger Zugabe von H_2O_2 eine Zunahme der DCF-Fluoreszenz um 265% im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen. Dagegen führte die Zugabe von H_2O_2

allein im zellfreien System zu keiner Zunahme der DCF-Bildung. Horseradish Peroxidase (HRP) führte allein sowie in Kombination mit H_2O_2 zur Oxidation von DCFH zu DCF (LeBel et al., 1992; Myhre et al., 2003). Reagiert HRP mit H_2O_2 , so entsteht die HRP-I Komponente, welche DCFH zu DCF^\cdot oxidiert. In der Gegenwart von O_2 reagiert DCF^\cdot zur fluoreszierenden Komponente DCF unter Bildung von O_2^\cdot (Rota et al., 1999). Diese Reaktion ist lichtabhängig. Die zunehmende Oxidation von DCFH durch HRP in zellfreien Systemen führte zu der Annahme, dass die Gegenwart von Peroxidasen in biologischen Systemen, die H_2O_2 oder anderen ROS ausgesetzt sind, zu falschen Schlussfolgerungen geführt haben könnte (Myhre et al., 2003).

Es herrscht Uneinigkeit in der Literatur über den Effekt der Superoxiddismutase (SOD) auf DCF-Messwerte. Einige Studien zeigen einen inhibitorischen Effekt der SOD (Burow & Valet, 1987; Reid et al., 1992; Fukumura et al., 1995; Gunasekar et al., 1996; Atlante et al., 1997), andere Arbeitsgruppen konnten keinen Effekt der SOD feststellen (Entman et al., 1992; Zhu et al., 1994; Wang et al., 1996; Shen et al., 1996; Yang et al., 1996). Die SOD vermittelt eine schnelle Umwandlung von Superoxidradikalen in das stabile H_2O_2 (McCord & Fridovich; 1969; Liochev & Fridovich; 2003).

LeBel et al. (1992) weisen darauf hin, dass bei der Interpretation der Messung spezifischer ROS, die in die Oxidation von DCFH zu DCF in biologischen Systemen involviert sein können, Vorsicht geboten ist. Marchesi et al. (1999) zeigten, dass die Fotoreduktion von DCF zur Bildung des freien DCF Semiquinon Radikals (DCF^\cdot) führt, welches unter aeroben Bedingungen wieder zu seiner Ausgangssubstanz DCF oxidieren kann, wobei Superoxidradikale entstehen. Die direkte Reaktion zwischen H_2O_2 , das auch spontan aus O_2^\cdot entstehen kann, und DCFH zu DCF erfolgt sehr langsam, es handelt sich um einen „Zwei-Elektronen-Prozess“. Durch die initiale Oxidation entsteht zunächst Semiquinon (Rota et al., 1999).

Swift & Sarvazyan (2000) kritisieren das Fehlen systematischer Studien über die Lokalisation und Retention von DCFH und seinem Oxidationsprodukt DCF. Es wurde angenommen, dass DCF als sensitiver zytosolischer Marker für oxidativen Stress fungiert. Diese Annahme über die Fähigkeit der DCF- und DCFH-Retention von Zellen wurde später in Frage gestellt, da kultivierte Endothelzellen der Aorta DCFH und DCF nicht intrazellulär behalten konnten (Royall & Ischiropoulos, 1993). Demnach scheint die zelluläre Verteilung von DCF vom jeweiligen Gewebe oder Zelltyp abhängig zu sein (Crow, 1997; Royall & Ischiropoulos, 1993; Sarvazyan, 1996; Gabriel et al., 1997). In PC12-Zellen beobachtete Sell (2001) eine diffuse Verteilung von DCF.

DCFH und DCF reichern sich vorwiegend in den Mitochondrien von Kardiomyozyten an (Swift & Sarvazyan, 2000). Swift & Sarvazyan (2000) gehen auf Grund der DCF-Verteilung in Kardiomyozyten von der Annahme aus, dass Zellen, die wenige Mitochondrien besitzen, DCF zu einem geringeren Anteil behalten. Die DCF-Retention scheint proportional zum Mitochondrienvolumen zu sein.

DCFH kann in Lösungen, die Sauerstoff enthalten, spontan oxidieren (Zhu et al., 1996; Jakubowski & Bartosz, 2000). Diese spontane und H_2O_2 -induzierte Oxidation von H_2DCF kann durch Glutathion (GSH), einem intrazellulären Antioxidans, verringert werden (Zhu et al., 1996; Jakubowski & Bartosz, 2000). DCF konkurriert auch mit dem enzymatischen ROS-Abbau. Zelluläre Reduktanzien können DCF oder das Semiquinon-Zwischenprodukt in einer Ein-Elektronen-Oxidation von DCFH re-reduzieren. Solch eine Reduktion wird durch Licht begünstigt (Marchesi et al., 1999). Um diese Reoxygenierung zu vermeiden, wurden die PC12-Zellen in der vorliegenden Studie noch im hypoxischen Zustand fixiert. Für die Messung der Fluoreszenzintensität am Fluoreszenzmikroskop wurden daher auch zunächst Digitalbilder von Zellarealen aufgenommen. Die Auswertung der Versuche erfolgte anschliessend anhand der Digitalbilder. Um die Gefahr einer artefiziellen ROS-Bildung zu vermeiden, wurden die PC12-Zellen bei $4^\circ C$ sowie im Dunkeln aufbewahrt und die Versuchsauswertung wurde unverzüglich nach der Inkubation durchgeführt. Jakubowski und Bartosz (2000) sehen die ROS-Messung mit DCF auf Grund der vielen Faktoren, die mit DCF reagieren können, als eine grobe Einschätzung. Eine steigende DCFH-Oxidation als Maß für eine zunehmende ROS-Bildung dagegen sei erst nach genaueren Erkenntnissen gerechtfertigt. In der vorliegenden Studie war unter Berücksichtigung und Vermeidung von Reaktionen, die zu einer artefiziellen ROS-Bildung sowie zur Reoxygenierung führen können, eine Hypoxie-bedingte Zunahme der DCF-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Kontrollzellen zu messen. Sell (2001) kam in ihren Experimenten mit PC12-Zellen zu einem übereinstimmenden Ergebnis. Die Spezifität der DCF-Bestimmung hinsichtlich bestimmter ROS bleibt weiterhin umstritten. Da Superoxidanionradikale allerdings schnell durch die SOD in das stabilere H_2O_2 umgewandelt werden (McCord & Fridovich; 1969; Liochev & Fridovich; 2003), wird H_2O_2 im Allgemeinen als Indikator für die mitochondriale ROS-Bildung herangezogen (Nohl et al., 2004).

Es ist auch eine mögliche Interaktion von Succinat mit dem Fluoreszenzindikator DCF denkbar. DCF ist ein organisches Anion und kann daher möglicherweise die mitochondriale Atmung inhibieren, indem es mit anderen anionischen Transportsystemen konkurriert. In Versuchen an isolierten Mitochondrien verringerte DCF signifikant die

Succinat-gebundene mitochondriale Atmung (Swift & Sarvazyan, 2000). DCF limitiert demnach vermutlich die Verfügbarkeit von Succinat, wenn von der Annahme ausgegangen wird, dass der Dikarboxyltransporter als Übermittler des mitochondrialen Transports von DCF dient (Swift & Sarvazyan, 2000).

Die DCF-Fluoreszenzintensität reflektiert einen generellen Anstieg in der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale. DCFH eignet sich demnach zur Messung der intrazellulären ROS-Bildung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, sofern es nicht um die Bestimmung spezifischer ROS geht. Darüber hinaus sollten die Zellen im hypoxischen Zustand fixiert werden, um eine Reoxygenierung zu vermeiden.

5.2 ROS-Bildung in PC12-Zellen unter Hypoxie

Es wurde in allen Experimenten unter Verwendung des Fluoreszenzindikators DCF-DA eine signifikant erhöhte ROS-Produktion unter hypoxischen Bedingungen in PC12-Zellen gemessen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Höhler und Mitarbeiter (1999, 2000) sowie Kummer et al. (2003), die in ihren Versuchen sowohl die gleiche Zelllinie als auch den gleichen Fluoreszenzindikator verwendeten. Auch in Lungengefäßen konnte unter DCF eine signifikant erhöhte Hypoxie-induzierte ROS-Produktion festgestellt werden (Paddenberg et al., 2003a). Chandel und Mitarbeiter (1998, 2000) führten in der Hepatomzelllinie Hep3B ebenfalls Experimente über die Hypoxie-bedingte ROS-Produktion durch und kamen zu dem gleichen Resultat. Auch Duranteau et al. (1998) konnten mit DCF-DA in Kardiomyozyten eine erhöhte ROS-Bildung unter Hypoxie nachweisen. Wartenberg et al. (2003) wiesen unter Einsatz des Fluoreszenzindikators DCF-DA eine erhöhte ROS-Bildung unter Hypoxie in der Hepatomzelllinie Hepa1C4 nach, die mit einer erhöhten HIF- α -Protein-Stabilisierung/HIF-Reportergenexpression einherging.

Andere Arbeitsgruppen beobachteten hingegen eine verminderte ROS-Bildung unter Hypoxie (Fandrey et al., 1994; Görlach et al., 2003). Nach Semenza (2000) hängen die widersprüchlichen Ergebnisse bei der ROS-Messung mit den Messverfahren zusammen. Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) stellten in PC12-Zellen unter Hypoxie eine verminderte ROS-Bildung fest. Nach Beendigung der Hypoxie-Inkubation inkubierten sie die Zellen weitere fünf Minuten mit DCF-DA und nahmen dann die Auswertung vor. Die verminderte ROS-Bildung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Messung erst einige Zeit nach der Inkubation durchgeführt wurde, daher könnte ein Hypoxie-bedingter ROS-Anstieg auf Grund der Reoxygenierung vor den ROS-Messungen bei Kroll und Czyzyk-

Krzeska (1998) wieder abgenommen haben (Sell, 2001). In der vorliegenden Studie wurden die PC12-Zellen noch unter hypoxischen Bedingungen fixiert und die ROS-Bildung wurde anschliessend unverzüglich gemessen, um eine Reoxygenierung zu vermeiden. Somit wird ein Abfall der unter Hypoxie gebildeten ROS durch Reoxygenierung verhindert.

5.3 Die ROS-Produktion einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette

Zu den ROS gehören das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). ROS werden von der mitochondrialen Atmungskette gebildet (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998; Sell, 2001). Darüber hinaus sind verschiedene zytosolische und membrangebundene Oxidasen an der ROS-Bildung beteiligt (Halliwell & Gutteridge, 1990). Loschen et al. (1971) zeigten zum ersten Mal, dass ROS von der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Obwohl nur 1-2% der Elektronen den physiologischen Transferweg der Atmungskette verlassen, produzieren die Mitochondrien, bedingt durch ihre hohe Stoffwechselaktivität, beachtliche Mengen an $O_2^{\cdot-}$ (Cross & Jones, 1990). Nohl und Mitarbeiter (2004) stellen die weitverbreitete Annahme in Frage, dass die mitochondriale Atmungskette zwingend mit der Bildung von $O_2^{\cdot-}$ verknüpft ist. Sie gehen auf Grund einer neuen nicht-invasiven Detektionsmethode für H_2O_2 davon aus, dass von $O_2^{\cdot-}$ abgeleitetes H_2O_2 kein Nebenprodukt der regulären Zellatmung ist. Die mitochondriale Atmungskette wird ihrer Meinung nach zur Quelle der ROS-Bildung, wenn das Ubiquinol/bc1 Redoxpaar beteiligt ist (Nohl et al., 2004). Sie nehmen an, dass der physikalische Zustand der Mitochondrienmembran bestimmt, ob Superoxidanionradikale gebildet werden.

Während des Elektronentransfers durch die mitochondriale Atmungskette können ROS an allen vier Multienzymkomplexen entstehen (Chandel et al., 2000; Paddenberg et al., 2003; Batandier et al., 2004). Es werden vor allem die Komplexe I und III hinsichtlich der mitochondrialen ROS-Produktion diskutiert (Chandel et al., 2000; Chen et al., 2003). Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) katalysiert die Elektronenübertragung vom Ubiquinol auf das Cytochrom c. Gleichzeitig werden Protonen von der negativ geladenen Matrix- auf die positiv geladene Zytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt (Hatefi, 1985; Trumpower, 1990). Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) transferiert dann vier Elektronen vom reduzierten Cytochrom c auf molekularen O_2 , während ausserdem

acht Protonen von der Matrix- auf die Zytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt werden (Chan & Li, 1990). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unter Hypoxie die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase gehemmt wird (Chandel & Schumacker; 1996; Duranteau et al., 1998; Semenza, 1999). Chandel et al. (1997) nehmen an, dass es bei einer Verminderung der V_{max} , hervorgerufen durch Hypoxie oder den kompetitiven Hemmstoff der Cytochrom-c-Oxidase NaN_3 (Petersen, 1977), zu einer Erhöhung des Redoxstatus mitochondrialer Elektronencarrier kommen kann, die vor Komplex IV lokalisiert sind. Folglich kommt es zu einer gesteigerten Bildung von Ubisemiquinon an Komplex III, was wiederum zu einer erhöhten ROS-Produktion führt (Semenza, 1999; Chandel & Schumacker, 2000). Duranteau und Mitarbeiter kamen in Experimenten an Kardiomyozyten zu übereinstimmenden Ergebnissen. Sie beobachteten sowohl unter Hypoxie als auch nach NaN_3 -Inkubation eine Zunahme der DCF-Fluoreszenzintensität (Duranteau et al., 1998).

Mitochondrien sind für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg in PC12-Zellen verantwortlich. Dies konnte in einer vorangegangenen Studie anhand von Thiamphenicol-behandelten PC12-Zellen (T-PC12-Zellen) gezeigt werden (Sell, 2001). Thiamphenicol hemmt speziell die mitochondriale Proteinbiosynthese (Kuzela et al., 1988). Die T-PC12-Zellen zeigten keine vermehrte ROS-Produktion unter Hypoxie, im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen. Dies lässt auf eine Beteiligung mitochondrial kodierter Proteine bei der Hypoxie-bedingten ROS-Zunahme in PC12-Zellen schließen. In PC12-Zellen wird bisher Komplex I als mitochondriale Quelle der ROS-Produktion unter Hypoxie angenommen (Sell, 2001). Zu hiermit übereinstimmenden Ergebnissen kamen Yuang et al. (2004). Sie beobachteten in ihren Experimenten an PC12-Zellen unter intermittierender Hypoxie (IH) ebenfalls eine Zunahme der ROS-Bildung, v.a. von $\text{O}_2^{\cdot-}$, das eine wichtige Rolle bei der c-fos-Aktivierung spielt. Sie sehen in der Inhibition von Komplex I eine Quelle für die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung unter IH. In weiterführenden Experimenten konnten Komplex I in Mitochondrien der Rattenleber (Batandier et al., 2004) und Komplex III in Hep3B-Zellen (Chandel et al., 2000) sowie in Mitochondrien der Ratte (Chen et al., 2003) als Quelle der mitochondrialen ROS-Produktion identifiziert werden. Paddenberg und Mitarbeiter (2003a, 2003b) konnten weiterhin die Beteiligung von Komplex II an der ROS-Bildung in Lungengefäßen zeigen.

5.4 Die Rolle von Komplex II in der mitochondrialen ROS-Produktion von PC12-Zellen

Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) konnten in ihren Experimenten an PC12-Zellen weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen ROS-Abfall nach DPI-Inkubation beobachten. Sie stellten ausserdem keine veränderte Genexpression der TH, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Katecholaminsynthese (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Kroll & Czyzyk-Krzeska, 1998) fest. Sie vermuteten daher, dass DPI keinerlei Wirkung in PC12-Zellen habe. Höhler und Mitarbeiter (1999) konnten jedoch in ausführlichen Untersuchungen an PC12-Zellen einen inhibitorischen Effekt von DPI auf die Hypoxie-induzierte TH-Genexpression und somit grundsätzlich eine Wirkung von DPI in PC12-Zellen zeigen.

Ebenso konnten Kummer und Mitarbeiter (2000) einen Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg in PC12-Zellen nachweisen. Der Flavoproteinhemmer DPI schwächte den Hypoxieeffekt ab, verhinderte ihn jedoch nicht. In der vorliegenden Studie zeigte DPI keine Abschwächung des Hypoxieeffekts. Der bei Kroll & Czyzyk-Krzeska (1998) ausbleibende DPI-Effekt auf die ROS-Bildung könnte möglicherweise durch eine Reoxygenierung auf Grund der fehlenden Fixierung unter Hypoxie maskiert worden sein.

In Lungengefäßen wird die ROS-Bildung unter Hypoxie und Normoxie durch DPI geblockt (Paddenberg et al., 2003a), so dass für die ROS-Bildung der Elektronenfluss innerhalb der mitochondrialen Atmungskette über Komplex I Voraussetzung ist.

In Kardiomyozyten (Chandel et al., 2000) und Hepatozyten (Chen et al., 2003) besitzen Komplex I und III eine herausragende Rolle in der Signaltransduktion unter Hypoxie. Die Arbeitsgruppe von Weissmann et al. (2003) vermutete auf Grund ihrer Experimente an Kaninchenlungen eine Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion. Paddenberg und Mitarbeiter (2003a) konnten in Lungengefäßen für Komplex II eine Beteiligung an der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung zeigen.

Der Komplex II-Inhibitor 3-NPA zeigte in Lungengefäßen unter Normoxie keinen Einfluss auf die ROS-Bildung, verhinderte unter Hypoxie aber den ROS-Anstieg (Paddenberg et al., 2003a). Unter dem Einsatz von TTFA konnte unter Hypoxie und Normoxie eine reduzierte ROS-Bildung festgestellt werden, wobei der inhibitorische Effekt unter Normoxie auf die Esterase zurückzuführen sein kann, die für die intrazelluläre Spaltung von DCF-DA verantwortlich ist (Zhang & Fariss, 2002). TTFA ist neben seiner Eigenschaft als Komplex II-Hemmstoff ein Inhibitor der Karboxylesteraseaktivität. Daher ist Vorsicht bei der Interpretation von Versuchsergebnissen geboten, wenn TTFA als Komplex II-Inhibitor in Kombination mit Esterase-Substraten, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen,

eingesetzt wird (Zhang & Fariss, 2002). Diese Ergebnisse demonstrierten eine essenzielle Rolle von Komplex II in der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion in Lungengefäßen. Auch Duranteau und Mitarbeiter (1998) stellten in Kardiomyozyten unter dem Einsatz von TTFA eine Abnahme der DCF-Fluoreszenz in ihren Experimenten fest.

In der vorliegenden Arbeit konnte in PC12-Zellen nach TTFA-Inkubation unter Hypoxie keine Hemmung des Hypoxie-induzierten ROS-Anstiegs beobachtet werden. Die Zugabe von 3-NPA hingegen reduzierte die Hypoxie-induzierte Zunahme der ROS-Produktion, dennoch blieb ein Hypoxie-bedingter Anstieg der ROS-Produktion bestehen.

Komplex II, auch als Succinatdehydrogenase (SDH) bezeichnet, ist Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und gleichzeitig in den Krebszyklus involviert. Unter normoxischen Bedingungen katalysiert die SDH die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die in dieser Reaktion freiwerdenden Elektronen reduzieren in der Atmungskette das Ubiquinon zum Ubiquinol (Hägerhall, 1997). Hohl und Mitarbeiter (1987) konnten in nicht-neuronalen Zellen eine Umkehr der SDH-Aktivität unter Hypoxie nachweisen, so dass Succinat und Ubiquinon entstehen. Die Arbeitsgruppe von Paddenberg und Mitarbeitern (2003a,b) geht auf Grund der unter Hypoxie reduzierten SDH-Aktivität und des inhibitorischen Effekts von Succinat in ihren Experimenten an Lungengefäßen ebenso von einem „Switch“ in der SDH-Aktivität aus, so dass Komplex II unter Hypoxie als Fumaratreduktase arbeitet, wobei ein Teil der an Komplex I gebildeten Elektronen zu Komplex II fließt und hier für die Reduktion von Fumarat zu Succinat benötigt wird. Henrich et al. (2004) gehen von einem ähnlichen Mechanismus in sensorischen Neuronen aus. Demnach kommt Komplex II in diesen Zellen eine bedeutende Rolle in der hypoxischen Signaltransduktionskaskade zu.

In der vorliegenden Studie wurde daher Succinat im Überschuss eingesetzt, um eine mögliche Umkehrreaktion der SDH zur Fumaratreduktase in PC12-Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. In der Hypothese einer Hypoxie-induzierten Umkehrreaktion würde Succinat das Endprodukt darstellen und daher bei einer Zugabe im Überschuss zu einer Hemmung der Fumaratreduktase führen.

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Abnahme der Hypoxie-bedingten ROS-Bildung nach Succinatinkubation gezeigt werden, obwohl ein 55%iger Anstieg der ROS-Produktion auch unter Succinatzugabe bei Hypoxie bestehen blieb.

Zusammenfassend sprechen die Befunde mit 3-NPA und Succinat auch in PC12-Zellen für einen Hypoxie-bedingten „Switch“ der SDH zur Fumaratreduktase, der zwar partiell zur Hypoxie-bedingten ROS-Produktion beiträgt, diese jedoch nicht dominiert.

5.5 Die Hypoxie-induzierte Gentranskription der TH und des ADM in PC12-Zellen und die Rolle von Komplex II

Hypoxie induziert in PC12-Zellen die TH- (Czyzyk-Krzeska et al., 1992, 1994a+b; Norris & Millhorn, 1995; Kroll & Czyzyk-Krzeska, 1998; Gross et al., 2000) und ADM-Gentranskription (Cormier-Regard et al., 1998; Kitamuro et al., 2000; Martinez et al., 2003). Darüber hinaus kommt es zu einer Hypoxie-bedingten Zunahme der mRNA-Stabilität (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Ladoux & Frelin, 2000). Einige Autoren vertreten die Theorie, die hypoxische Induktion der TH und des ADM erfolge in PC12-Zellen HIF-1-abhängig (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Martinez et al., 2003). In Hep3B-Zellen ist die mitochondriale ROS-Bildung an Komplex III für die Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie notwendig (Chandel et al., 2000). In anderen Publikationen dagegen wird darauf hingewiesen, dass die Regulierung der TH-Gentranskription neben HIF-1 α durch andere Transkriptionsfaktoren erfolgt (Ebert & Bunn, 1998; Breitner-Johnson & Millhorn, 1999). Als mögliche Kandidaten gelten AP1 (Aktivatorprotein 1), CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) und ICER (Inducible cAMP Early Repressor). Lewis-Tuffin et al. (2004) gehen auf Grund von Experimenten an Neuronen und neuroendokrinen Zellen davon aus, dass unabhängig vom induzierenden Stimulus die Transkription der TH primär vom CREB abhängig ist.

Nach 6stündiger Hypoxie ist im Vergleich zur Normoxie ein zweifacher TH-mRNA-Anstieg in PC12-Zellen zu beobachten (Kroll & Czyzyk-Krzeska, 1998; Höhler et al., 1999; Kummer et al., 2000). Nach 15stündiger Hypoxie wiesen Ladoux & Frelin (2000) einen 2,2fachen Anstieg der ADM-mRNA in Endothelzellen der Bluthirnschranke von Ratten nach. In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den oben genannten Publikationen ein 2facher Hypoxie-induzierter Anstieg der TH-mRNA-Menge und ein 2,2facher Anstieg des Medians der ADM-mRNA-Menge beobachtet werden.

In den Versuchen von Kummer und Mitarbeitern (2003) konnte der Hypoxie-bedingte TH-mRNA-Anstieg nicht durch Radikalfänger unterbunden werden. Thiamphenicol-behandelte PC12-Zellen, die keine Hypoxie-induzierte ROS-Bildung zeigen, antworteten weiterhin mit einer Zunahme der TH-mRNA unter Hypoxie (Kummer et al., 2003). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass weder die ROS-Produktion noch eine intakte mitochondriale Atmungskette für die Hypoxie-induzierte TH-Transkription in PC12-Zellen essenziell sind. Komplex II wird als einziger der vier Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette allein vom Kerngenom kodiert (Lombardo et al., 1990; Oostveen et al., 1995), d.h. er bleibt in T-PC12-Zellen intakt. Anhand dieser Versuche

kann daher eine Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-induzierten Transkription der TH-mRNA nicht ausgeschlossen werden.

Unter kontinuierlicher Hypoxie kommt es in Zellkulturen zu einer Hypoxie-induzierten cFos-Expression und unter Beteiligung des AP1-Transkriptionsfaktors werden AP1 regulierte nachgeschaltete Gene wie die TH stimuliert (Prabhakar et al., 1995; Mishra et al., 1998). Bei intermittierender Hypoxie konnte eine selektive Herunterregulierung von Komplex I beobachtet werden, während Komplex III unberührt blieb. Unter dem Einsatz des Komplex I Inhibitors Rotenon konnten bei IH keine Veränderungen in der H₂O₂-Produktion nachgewiesen werden, die ROS-Produktion in den Kontrollzellen stieg unter Hypoxie (Yuan et al., 2004).

IH aktiviert in PC12-Zellen die c-fos-Genexpression, die an den AP-1-Transkriptionsfaktor und die TH gekoppelt ist. Oxidativer Stress (Inhibition von Komplex I) spielt eine Rolle in der IH-induzierten c-fos und nachgeschalteten Genexpression (Greenberg et al., 1999; Kumar et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte DPI die hypoxische Transkription von TH und ADM verringern, jedoch nicht unterbinden.

Yuang und Mitarbeiter (2004) konnten auf Grund ihrer Experimente an PC12-Zellen in Übereinstimmung mit Kumar et al. (2003) unter IH keinen Unterschied in der TH-Proteinmenge feststellen, obwohl die TH-mRNA-Menge erhöht war. Sie vermuten, dass für eine Zunahme des TH-Proteins entweder längerandauernde Hypoxie nötig ist, oder ein zunehmender TH-Protein-Umsatz die steigende Proteinsynthese maskiert. Yuang et al. (2004) gehen von einer Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies unter IH bei der cFos-Aktivierung und der nachgeschalteten Genregulierung aus. Einige Autoren stellen die Wichtigkeit von ROS in der Genaktivierung unter Hypoxie in Frage (Höhler et al., 1999; Srinivas et al., 2001). Srinivas et al. (2001) stellten in Experimenten an HeLa-Zellen fest, dass eine Überexpression an Katalase im Zytosol oder Mitochondrium unter Normoxie und Hypoxie keine Wirkung auf die HIF-1 α -Stabilisierung hatte. Sie bezweifelten daraufhin die Rolle von H₂O₂ als Signalmolekül in der Hypoxieantwort. Höhler und Mitarbeiter (1999) wiesen eine Hypoxie-bedingte ROS-Bildung in PC12-Zellen nach, Radikalfänger konnten die Hochregulierung der TH-mRNA jedoch nicht verhindern, so dass die TH-Gentranskription nicht durch ROS induziert wird. Die Ergebnisse von Yuang et al. (2004) und Höhler et al. (1999) führen zu der Annahme, dass unter anhaltender Hypoxie möglicherweise andere Mechanismen als ROS an der Genregulierung beteiligt sind.

Die Familie der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIFs) besitzt eine Schlüsselposition bei der hypoxischen Regulation bestimmter Gene (Semenza, 2000; Semenza, 2001; Schnell et al., 2003). Von den drei identifizierten HIF- α -Untereinheiten wird in PC12-Zellen neben HIF-1 α v.a. HIF-2 α exprimiert (Tian et al., 1998). Die TH (Czyzyk-Krzeska et al., 1992, 1994a; Norris & Millhorn, 1995; Kroll & Czyzyk-Krzeska, 1998; Gross et al., 2000) und das ADM (Cormier-Regard et al., 1998; Kitamura et al., 2000; Martinez et al., 2003) werden in PC12-Zellen exprimiert und zeigen unter hypoxischen Bedingungen eine Zunahme der mRNA, wie es anhand der hier durchgeführten Experimente belegt werden konnte.

DPI blockierte in der vorliegenden Arbeit die hypoxische Induktion der TH- und ADM-Transkription, führte aber bereits unter Normoxie zu einer Steigerung von der kein weiterer hypoxischer Anstieg zu erzielen war. Dies entspricht der Publikation von Gleadle et al. (1995), nach der DPI die hypoxische Induktion HIF-1-abhängiger Gene aufhebt.

Die Inkubation mit spezifischen Komplex II-Inhibitoren führte zu gleichen Resultaten in der TH- und ADM-Genexpression, so dass ähnliche Mechanismen der Hypoxie-bedingten TH- und ADM-Genexpression in PC12-Zellen angenommen werden können, und deckt sich mit bereits publizierte Veröffentlichungen (Cormier-Regard et al., 1998; Ladoux & Frelin, 2000), die von einem der TH vergleichbaren Regulationsmechanismus für ADM unter Hypoxie ausgehen.

In Hep3B-Zellen unterdrückt die Inhibition von Komplex I und III, jedoch nicht die Inhibition von Komplex IV, die Expression der HIF-1-Zielgene unter Hypoxie (Chandel et al., 1998; Semenza, 1999). Agani et al. (2000) konnten in einer humanen Zybridzelllinie, welche über ein partielles Komplex I-Defizit verfügt, die hypoxische Induktion von HIF-1 α durch das Komplex II-Substrat Succinat, welches den Elektronenfluss vom Komplex II zum Komplex III aufrechterhält, wiederherstellen. Sie gehen davon aus, dass eine intakte mitochondriale Atmungskette in PC12-Zellen entscheidend ist für die HIF-1 α -Stabilisierung unter Hypoxie. Srinivas et al. (2001) dagegen postulierten, dass die HIF-1-Aktivierung nicht an eine aktive mitochondriale Atmungskette gebunden ist. Kummer und Mitarbeiter (2003) konnten in ihren Experimenten nachweisen, dass weder ROS noch eine intakte Elektronentransportkette essenziell sind für die hypoxische TH-Genexpression.

Unter dem Einsatz der spezifischen Komplex II-Inhibitoren TTFA und 3-NPA wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypoxie-induzierte Genexpression von ADM und TH nicht unterdrückt.

Die Inkubation mit Succinat führte zu keinen Veränderungen in der TH- und ADM-Expression unter Hypoxie. In dieser Studie konnte daher keine Beteiligung der SDH in der hypoxischen Induktion der TH- und ADM-Gentranskription in PC12-Zellen nachgewiesen werden.

5.6 Die unterschiedliche Regulation der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion und der Hypoxie-bedingten Zunahme der TH- sowie ADM-mRNA-Menge

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten Unterschiede in der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung und der Hypoxie-bedingten Zunahme der TH- und ADM-mRNA-Menge festgestellt werden. Die spezifischen Komplex II-Inhibitoren 3-NPA, TTFA, sowie Succinat und der Flavoproteinhemmer DPI hemmten die Hypoxie-induzierte Zunahme der TH- und ADM-mRNA nicht. Die ROS-Bildung unter Hypoxie hingegen konnte unter 3-NPA und Succinat verringert werden. Demnach ist eine partielle Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion, jedoch keine Involvierung im Hypoxie-induzierten Anstieg der TH- und ADM-mRNA-Menge anzunehmen.

Ein weiterer Unterschied in der Regulation unter Hypoxie konnte unter Einsatz des Flavoproteinhemmers DPI beobachtet werden. Die Hypoxie-bedingte ROS-Produktion konnte nach DPI-Zugabe nicht geschwächt werden. Kummer et al. (2000) dagegen konnten eine Abschwächung des DPI-Effekts unter Hypoxie feststellen, wobei dieser nicht unterbunden wurde. Im Unterschied zur ROS-Produktion blockte DPI in der vorliegenden Studie den Hypoxie-induzierten Anstieg der TH- und ADM-Expression.

In PC12-Zellen ist unter Hypoxie sowohl eine Zunahme der ROS-Produktion (Höhler et al., 1999; Kummer et al., 2003) als auch ein Anstieg der TH- (Czyzyk-Krzeska et al., 1994a; Höhler et al., 1999; Kummer et al., 2000, 2003) und ADM-mRNA-Menge (Martinez et al., 2003) zu beobachten, die jedoch beide vermutlich auf separaten Wegen reguliert werden. Darüber hinaus konnten in der TH-mRNA-Menge von PC12-Zellen Unterschiede nach DPI-Inkubation unter Normoxie festgestellt werden. Höhler et al. (1999) beobachteten in ihren Slot-Blot-Versuchen nach DPI-Zugabe keinen Anstieg der TH-mRNA-Menge unter normoxischen Bedingungen.

Dagegen konnte in der vorliegenden Studie unter Normoxie nach DPI-Inkubation eine Zunahme der relativen TH- sowie auch ADM-Expression gemessen werden. Das unterschiedliche Verhalten der PC12-Zellen hinsichtlich ihrer ROS-Produktion nach DPI-

Zugabe unter normoxischen Bedingungen kann auf die Interaktion mit anderen Flavoenzymen zurückzuführen sein. DPI bindet nicht spezifisch an Komplex I oder II, sondern bindet an einer Vielzahl von Flavoproteinen (Riganti et al., 2004) und hemmt daher Enzymsysteme wie die NADPH-Oxidase (Cross & Jones, 1986; Tew, 1993; Majander et al., 1994), Xanthin-Oxidase, Stickstoffmonoxid-Synthetase sowie Komplex I und II der mitochondrialen Atmungskette (Li & Trush, 1998, Semenza, 1999). Die Affinitäten von DPI zu diesen verschiedenen Flavoproteinen sind unterschiedlich (Cross & Jones, 1986; Majander et al., 1994; Riganti et al., 2004). Daher können die Differenzen in den Befunden durch die unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen mit beeinflusst worden sein. Höhler und Mitarbeiter (1999) setzten DPI in einer Konzentration von 20 μM ein, während in dieser Arbeit eine Konzentration von 10 μM gewählt wurde.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse in PC12-Zellen für eine partielle Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion. Unter Hypoxie ist ein Korrelation in der Zunahme der ROS-Produktion und der TH- und ADM-mRNA-Menge zu beobachten, die jedoch beide vermutlich über separate Regulationsmechanismen gesteuert werden.

6 Zusammenfassung

Der Sauerstoffsensormechanismus in Paraganglien von Säugern ist bisher nicht vollständig geklärt. Es konnte bisher an Lungengefäßen und in sensorischen Neuronen der Ratte eine bedeutende Rolle von Komplex II in der hypoxischen Signaltransduktionskaskade gezeigt werden. In beiden Zellarten kommt es unter Hypoxie zu einem „Switch“ in der Succinatdehydrogenase (SDH)-Aktivität, so dass Komplex II unter Hypoxie als Fumaratreduktase arbeitet und ein Teil der an Komplex I gebildeten Elektronen zu Komplex II fließt und hier für die Reduktion von Fumarat zu Succinat benötigt wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der SDH in der Hypoxie-bedingten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie in der hypoxischen Induktion der Gentranskription der Tyrosinhydroxylase (TH) und des Adrenomedullins (ADM) und somit eine mögliche Beteiligung der SDH am Sauerstoffsensormechanismus von PC12-Zellen zu untersuchen. Als Modell zur Erforschung des Hypoxie-sensitiven Mechanismus von chemosensitiven Paraganglien eignet sich die aus dem Nebennierenmark der Ratte isolierte Tumorzelllinie PC12. Die PC12-Zellen reagieren auf Hypoxie mit Membrandepolarisation, Katecholaminfreisetzung, erhöhter Bildung von ROS und verstärkter Genexpression der TH und des ADM. Versuche an Thiamphenicol-behandelten PC12-Zellen (T-PC12) zeigten, dass der Elektronenfluss innerhalb der intakten mitochondrialen Atmungskette für die vermehrte ROS-Bildung unter Hypoxie benötigt wird. Thiamphenicol hemmt die Translation der mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette. In T-PC12-Zellen bleibt der rein nukleär kodierte Komplex II demnach intakt. Daher konnte durch diese Versuche eine Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion und Gentranskription nicht ausgeschlossen werden.

Die PC12-Zellen wurden für die ROS-Messung in Gegenwart des redox-sensitiven Fluoreszenzindikators 2'7'-Dichlorofluorescein Diazetat (DCFH-DA) über einen Zeitraum von einer Stunde und nach Zugabe von Diphenyliodonium (DPI), 2'-Thenoyltrifluoroazeton (TTFA), 3'-Nitropropionsäure (3-NPA) und des Radikalfängers Nitrobluetetrazolium (NBT) sowie Succinat unter Normoxie (20% O₂) oder Hypoxie (5% O₂) inkubiert. Anhand der Fluoreszenzintensität des gebildeten 2'7'-Dichlorofluorescein (DCF) konnte am Fluoreszenzmikroskop die intrazelluläre ROS-Bildung gemessen werden. Der Hypoxie-bedingte Anstieg der TH- und ADM-Gentranskription wurde anhand der Echtzeit-RT-PCR untersucht. Die PC12-Zellen wurden dazu sechs Stunden unter

normoxischen oder hypoxischen Bedingungen und in Gegenwart der spezifischen Komplex II-Inhibitoren TTFA und 3-NPA, nach Zugabe von Succinat und DPI inkubiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Hypoxie-bedingte Zunahme der ROS-Produktion in PC12-Zellen festgestellt werden. Der Flavoproteinhemmer DPI und der Komplex II-Inhibitor TTFA hemmten den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg nicht. Nach Inkubation mit 3-NPA konnte eine Verringerung der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung gemessen werden. Succinat führte zu einer signifikanten Abnahme der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion. NBT verhinderte den Hypoxie-induzierten Anstieg von ROS. Anhand der Echtzeit-RT-PCR konnte ein Hypoxie-induzierter Anstieg der TH- und ADM-mRNA gezeigt werden. DPI blockte den Hypoxie-induzierten Anstieg der mRNA. TTFA, 3-NPA und Succinat unterdrückten die Hypoxie-bedingte Zunahme der TH- und ADM-mRNA hingegen nicht. Die Inkubation mit spezifischen Komplex II-Inhibitoren führte zu gleichen Resultaten in der TH- und ADM-Genexpression, so dass ähnliche Mechanismen der Hypoxie-bedingten TH- und ADM-Genexpression in PC12-Zellen angenommen werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen in PC12-Zellen für eine partielle Beteiligung von Komplex II in der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion sowie für einen Hypoxie-bedingten „Switch“ der SDH zur Fumaratreduktase, der partiell zur Hypoxie-bedingten ROS-Produktion beiträgt, diese jedoch nicht dominiert. Hypoxie induziert in PC12-Zellen eine Zunahme der ROS-Produktion und einen Anstieg der TH- und ADM-mRNA, wobei diese vermutlich über separate Wege reguliert werden.

7 Summary

The O₂-sensor mechanism of mammalian chemosensitive paraganglia is not fully resolved yet. An important role of complex II in oxygen sensing was demonstrated in pulmonary vasculature and sensory neurons of rats. Under hypoxia in both cells complex II switches its function from succinate dehydrogenase (SDH) activity to fumarate reductase. Partially, electrons generated at complex I are now flowing to complex II and are used for the reduction of fumarate to succinate.

The aim of the present study was to investigate the role of SDH in hypoxia-induced production of reactive oxygen species (ROS) as well as in hypoxic induction of tyrosine hydroxylase (TH) and adrenomedullin (ADM) gene transcription to test a possible involvement of SDH in the oxygen sensing mechanism of PC12 cells. A suitable model to study the hypoxia sensitive mechanism in chemosensitive paraganglia is the tumor cell line PC12 derived from a rat adrenal medullary tumor. PC12 cells respond to hypoxia with membrane depolarisation, release of catecholamines, enhanced production of ROS and increased TH and ADM gene expression. Experiments with PC12 cells that had been treated with thiamphenicol had previously demonstrated that the hypoxia-induced increased ROS production by PC12 cells requires the electron flow in the intact respiratory chain. Thiamphenicol inhibits the translation of mitochondrially encoded proteins of the respiratory chain. Hence, the purely nuclear encoded complex II in PC12 cells remains intact. From these previous experiments, an involvement of complex II in hypoxia-induced ROS generation and gene transcription could, hence, not be excluded.

ROS production by PC12 cells was investigated. Cells were exposed for 1 h using the fluorescent indicator 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) to normoxia (20% O₂) or hypoxia (5% O₂) and treated with diphenyleneiodonium (DPI), 2'-thenoyltrifluoroacetone (TTFA), 3'-nitropropionic acid (3-NPA), the superoxid scavenger nitroblue tetrazolium (NBT) and succinate. The hypoxia-induced increase in intracellular ROS production was measured by the fluorescence intensity of the reaction product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) using a laser scanning microscope. The hypoxia-induced increase of TH and ADM gene transcription was investigated by real-time RT-PCR. PC12 cells were incubated for 6 h at normoxic or hypoxic conditions alone or in presence of the specific complex II inhibitors TTFA and 3-NPA, as well as in presence of either succinate or DPI.

The present study demonstrated a hypoxia-induced increase in ROS generation by PC12

cells. This hypoxia-induced increase in ROS production was neither inhibited by the flavoprotein inhibitor DPI nor by the complex II inhibitor TTFA. In contrast, hypoxic ROS generation was reduced with 3'-NPA. A significant decrease in hypoxic ROS production was observed after incubation with succinate. NBT inhibited ROS production completely. Real-time RT-PCR showed a hypoxia-induced increase in TH and ADM mRNA. DPI blocked the hypoxia-induced increase of mRNA. TTFA, 3-NPA and succinate had no effect on hypoxic increase of TH and ADM mRNA. Incubation with specific complex II inhibitors showed similar results in TH and ADM gene expression, so that similar mechanisms in hypoxic TH and ADM gene expression by PC12 cells can be assumed.

The present results provide evidence for a partial involvement of complex II in hypoxic ROS production by PC12 cells. They are consistent with the assumption of a hypoxic switch from SDH to fumarate reductase, which is partially involved in hypoxia-induced ROS generation, but does not dominate it. In PC12 cells, hypoxia induces an increased ROS production and an increase of TH and ADM mRNA, which are likely to be regulated via separate pathways.

8 Literaturverzeichnis

Abramson J, Svensson-Ek M, Byrne B & Iwata S (2001)

Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes.

Biochim Biophys Acta; 1544: 1-9

Acker T & Acker H (2004)

Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications.

J Exp Biol; 207: 3171-3188

Ackrell BAC (2000)

Progress in understanding structure function relationship in respiratory chain complex II.

FEBS Lett; 406: 1-5

Agani FH, Pichiule P, Chavez JC & LaManna JC (2000)

The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia.

J Biol Chem; 275; 46: 35863-35867

Allaker RP, Zihni C & Kapas S (1999)

An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of skin, oral, respiratory tract and gut microflora.

FEMS Immunol Med Microbiol; 23: 289-293

Allen MA & Ferguson AV (1996)

In vitro recordings from area postrema neurons demonstrate responsiveness to adrenomedullin.

Am J Physiol; 270: R920-925

Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO & del Peso L (2001)

Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis.

J Biol Chem; 276: 22368-22374

Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Albers DW, Klivenyi P, Carlson EJ, Epstein CJ & Beal MF (2001)

Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP.

Exp Neurol; 167: 189-195

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF & Livingston DM (1996)

An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia.

Proc Natl Acad Sci USA; 93: 12969-12973

Arias-Stella J (1969)

Human carotid body at high altitudes.

Am J Pathol; 55: 82a-83a

Arita DY, Di Marco GS, Schor N & Cesarini DE (2002)

Purification and characterization of the active form of tyrosine hydroxylase from mesangial cells in culture.

J Cellular Biochem; 87: 58-64

Astuti D, Douglas F, Lennard TW et al. (2001)

Germline SDH mutation in familial pheochromocytoma.

Lancet; 357: 1181-1182

Astuti D, Hart-Holden N, Latif F, Laloo F, Black GC, Lim C, Moran A, Grossmann AB, Hodgson SV, Freemont A, Ramsden R, Eng C, Evans DGR & Maher ER (2003)

Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and pheochromocytoma susceptibility.

Clin Endocrinol; 59: 728-733

- Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Ciotti MT, Marra E & Calissano P (1997)
Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation.
J Neurochem; 68: 2033-2045
- Baginsky ML & Hatefi Y (1969)
Reconstitution of succinate-coenzyme Q reductase (complex II) and succinate oxidase activities by a highly purified, reactivated succinate dehydrogenase.
J Biol Chem; 244: 5313-5319
- Baldin V, Lukas J, Marcote M, Pagano M & Draetta G (1993)
Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.
Genes Dev; 7: 812-821
- Bangoura G, Yang L-Y, Huang G-W & Wang W (2004)
Expression of HIF-2 α /EPAS1 in hepatocellular carcinoma.
World J Gastroenterol; 10: 525-530
- 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
- Batandier C, Leverage X & Fontaine E (2004)
Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I.
J Biol Chem; 279: 17197-17204
- Baysal BE, Ferrel RE, Willett-Brozick, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, Van der Mey A, Taschner PEM, Rubinstein WS, Myers EN, Richard III CW, Cornelisse CJ, Devilee P & Devlin B (2000)
Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma.
Science; 287: 848-851

Baysal BE, Rubinstein WS & Taschner PEM (2001)

Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders.

J Mol Med; 79: 495-503

Baysal BE (2003)

On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma.

TRENDS in Endocrinol and Metabolism; 14; 10: 453-459

Beasley NJP, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S & Harris AL (2002)

Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients.

Cancer Res; 62: 2493-2497

Biscoe TJ, Duchon MR, Eisner DA, O'Neill SC & Valdeolmillos M (1989)

Measurements of intracellular Ca²⁺ in dissociated type I cells of the rabbit carotid body.

J Physiol; 416: 421-434

Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S & Harris AL (2000)

Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines.

Cancer Res; 60: 7106-7113

Blancher C, Moore JW, Robertson N & Harris AL (2001)

Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signaling pathway.

Cancer Res; 61: 7349-7355

Braun S, Riemann K, Pusch CM, Sotlar K, Pfister M & Kupka S (2004)

Paragangliome der Kopf-Hals-Region.

HNO; 1: 11-17

Breitner-Johnson D & Millhorn DE (1998)

Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism.

J Biol Chem; 273: 19834-19839

Bruick RK & Mc Knight SL (2001)

A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.

Science; 294: 1337-1340

Buckler KJ (1997)

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

J Physiol (Lond); 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

Buckler KJ, Williams BA & Honore E (2000)

An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells.

J Physiol; 15: 135-142

Burkitt MJ & Wardmann P (2001)

Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis.

Biochem Biophys Res Comm; 282: 329-333

Burow S & Valet G (1987)

Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2'7'-dichlorofluorescein (DCF).

Eur J Cell Biol; 48: 128-133

Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M & Wenger RH (2001)

Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression.

Pflügers Arch-Eur J Physiol; 443: 240-249

Capaldi RA (1982)

Arrangements of proteins in the mitochondrial inner membrane.

Biochim Biophys Acta; 694: 291-306

Capaldi RA, Halphen DG, Zhang Y-Z & Yanamura W (1988)

Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain.

J Bioenerg Biomembr; 20: 291-311

Chahine R, Huet MP, Olivia L & Nadeau R (1997)

Free radicals generated by electrolysis reduces nitrobluetetrazolium in isolated rat heart.

Exp Toxicol Pathol; 49: 91-95

Chan SI & Li PM (1990)

Cytochrome c oxidase: Understanding nature's design of a proton pump.

Biochem; 29: 1-12

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 & Schumacker PT (1999)

Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) 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

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

Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia.

J Biol Chem; 275: 25130-25138

Chen Q, Vazquez J, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnefsky EJ (2003)

Production of reactive oxygen species by mitochondria.

J Biol Chem; 278: 36027-36031

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

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang G-W, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Maxwell PH (2000)

Hypoxia-inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.

J Biol Chem; 275: 25733-25741

Coles CJ, Edmondson DE & Singer TP (1979)

Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate.

J Biol Chem; 254: 5161-5167

Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D & Carmeliet P (2002)

Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fetal respiratory distress in premature mice.

Nat Med; 8: 702-710

Conforti L & Millhorn DE (1997)

Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia.

J Physiol; 502: 293-305

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

Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D & Millhorn DE (1999)
EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK.
J Biol Chem; 274: 33709-33713

Conrad PW, Conforti L, Kobayashi K, Breitner-Johnson D, Rust RT, Yuan Y, Kim H-W, Kim RH, Seta K & Millhorn DE (2001)
The molecular basis of O₂-sensing and hypoxia tolerance in pheochromocytoma cells.
Comp Biochem Physiol Part B Comp Physiol; 128: 187-204

Cormier-Regard S, Nguyen SV & Claycomb WC (1998)
Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes.
J Biol Chem; 273: 17787-17792

Cross AR & Jones OTG (1986)
The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils.
Biochem; 237: 111-116

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

Cuttita F, Pio R, Garayoa M, Zudaire E & Elsasser TH (2002)
Adrenomedullin functions as a important tumor survival factor in human carcinogenesis.
Microsc Res Tech; 57: 110-119

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, Dominski Z, Kole R & Millhorn DE (1994a)

Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells.

J Biol Chem; 269;1: 760-764

Czyzyk-Krzeska MF, Dominski Z, Kole R & Millhorn DE (1994b)

Hypoxia stimulates binding of a cytoplasmic protein to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of rat tyrosine hydroxylase mRNA.

J Biol Chem; 269; 13: 9940-9945

Czyzyk-Krzeska MF (1997)

Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia.

Respir Physiol; 110: 99-111

Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C (1999)

Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*.

Proc Natl Acad Sci USA; 97: 958-959

Davis KA & Hatefi Y (1971)

Succinate dehydrogenase. I. Purification, molecular properties, and structure.

Biochem; 10: 2509-2516

Douwes Dekker PB, Hogendoorn PC, Kuipers-Dijkshoorn N, Prins FA, van Duinen SG, Taschner PE, van der Mey AG & Cornelisse CJ (2003)

SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology.

J Pathol; 201: 480-486

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

Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes.

J Biol Chem; 273: 11619-11624

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

Rat sensory neurons contain cytochrome b558 large subunit immunoreactivity.

NeuroReport; 10: 2615-2617

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

Macrophages: a major source of cytochrome b558 in the rat carotid body.

Brain Res; 852: 349-354

Ebert BL & Bunn HF (1998)

Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein.

Mol Cell Biol; 18: 4089-4096

Edström E, Mahlamaki E, Nord B, Kjellman M, Karhu R, Hoog A, Goncharov N, Teh BT, Backdahl M & Larsson C (2000)

Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology.

Am J Pathol; 156: 651-659

Ema M, Taya S, Yokotani K, Sogawa Y, Matsuda Y & Fujii-Kuriyama Y (1997)

A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.

Proc Natl Acad Sci USA; 94: 4273-4278

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L & Fujii-Kuriyama Y (1999)

Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300.

EMBO; 18: 1905-1914

Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA & Smith CW (1992)
Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system
requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence.

J Clin Invest; 90: 1335-45

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

C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that
regulate HIF by prolyl hydroxylation.

Cell; 107: 43-54

Fandrey J, Frede S & Jelkmann W (1994)

Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production.

Biochem; 303: 507-510

Fandrey J (2004)

Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 286: R977-988

Favier J, Kempf H, Corvol P & Gase JM (1999)

Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with
tyrosine hydroxylase.

FEBS Lett; 462: 19-24

Fearnley IM & Walker JE (1992)

Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationship
with other proteins.

Biochim Biophys Acta; 1140: 105-135

Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE & Hirst J (2001)

GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial
NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I).

J Biol Chem; 276: 38345-38348

- Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G & Peers C (1999)
Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel alpha subunits by redox agents and hypoxia.
J Physiol; 514: 629-637
- Fedele AO, Whitelaw ML & Peet DJ (2002)
Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors.
Mol Interv; 2: 229-243
- Flemming D, Schlitt A, Spehr V, Bischof T, Friedrich T (2003)
Iron-sulfur cluster N2 of the Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is located on subunit NuoB.
J Biol Chem; 278: 47602-47609
- Friedrich T, Strohdeicher M, Hofhaus G, Preis D, Sahm H & Weiss H (1990)
The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase.
FEBS Lett; 265: 37-40
- Fukumura D, Kurose I, Miura S, Tsuchiya M & Ishii H (1995)
Oxidative stress in gastric mucosal injury: role of platelet-activating factor-activated granulocytes.
J Gastroenterol; 30: 565-71
- Gabriel C, Camins A, Sureda FX, Aquirre L, Escubedo E, Pallas M & Camarasa J (1997)
Determination of nitric oxide generation in mammalian neurons using dichlorofluorescein diacetate and flow cytometry.
J Pharmacol Toxicol Methods; 38: 93-98
- Gassmann M, Henlet T & Bauer C (1998)
Transgene Mäuse in der Grundlagenforschung.
Schweiz Arch Tierheilk; 140: 198-204

Gilles-Gonzales MA, Gonzales G & Perutz MF (1995)

Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the heme state of its heme iron.

Biochem; 34: 232-236

Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad J-J, Plouin P-F, Corvol P, Rötig A & Jeunemaitre X (2001a)

The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway.

Am J Hum Genet; 69: 1186-1197

Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, & Rustin P (2001b)

The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway.

Am J Hum Genet; 69: 1186-1197

Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, Van Kien PK, Corvol P, Plouin P-F & Jeunemaitre X (2003)

Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas.

Cancer Res; 63: 5615-5621

Gimm O, Armanios M, Dziema H, Neumann HP & Eng C (2000)

Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma.

Cancer Res; 60: 6822-6825

Gleadle JM, Ebert BL & Ratcliffe PJ (1995)

Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia.

Eur J Biochem; 243: 92-99

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

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

Studies Erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin.
Blood; 13: 55-60

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Deghani F & Busse R (2000)

A gp91phox containing NADPH-oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall.

Circ Res; 87: 26-32

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

Gorman A, McGowan A & Cotter TG (1997)

Role of peroxide and superoxide anion during tumor cell apoptosis.
FEBS Lett; 404: 27-33

Greenberg HE, Sica AL, Scharf SM & Ruggiero DA (1999)

Expression of c-fos in the rat brainstem after chronic intermittent hypoxia.
Brain Res; 816: 638-645

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

Gross J, Leclere N, Heldt J, Müller I, Kietzmann T & Andreeva N (2000)

Differential effects of hypoxia on untreated and NGF treated PC12 cells.
Life Sci; 67: 2595-2603

- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L & Bradfield CA (2000)
Molecular characterization and chromosomal localization of third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 α .
Gene Expr; 7: 205-213
- Gunasekar PG, Sun PW, Kanthasamy AG, Borowitz JL & Isom GE (1996)
Cyanide-induced neurotoxicity involves nitric oxide and reactive oxygen species generation after N-methyl-D-aspartate receptor activation.
J Pharmacol Exp Ther; 277: 150-5
- Hägerhall C (1997)
Succinate: quinone oxidoreductase.
Variations on a conserved theme.
Biochim Biophys Acta; 1320: 107-141
- Halliwell B & Gutteridge JM (1990)
Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.
Methods Enzymol; 186: 1-85
- Han J, Lee J, Bibbs L & Ulevitch R (1994)
A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.
Science; 265: 808-811
- Hanstein WG, Davis KA, Ghalambor MA & Hatefi Y (1971)
Succinate dehydrogenase. II. Enzymatic properties.
Biochem; 10: 2517-2524
- Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y & Imura N (2001)
Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α .
Biochem Biophys Res Comm; 287: 808-813
- Hatefi Y (1985)
The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.
Ann Rev Biochem; 54:1015-1069

Hederstedt L (2002)

Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*.

Biochim Biophys Acta; 1553: 74-83

Hederstedt L (2003)

Complex II is complex too.

Science; 299: 671-672

Heinicke K, Hofer T, Wenger RH & Gassmann M (2002)

Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel.

Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin; 53: 270-276

Henrich M, Paddenberg R, Haberberger RV, Scholz A, Gruss M, Hempelmann G & Kummer W (2004)

Hypoxic increase in nitric oxide generation of rat sensory neurons requires activation of mitochondrial complex II and voltage-gated calcium channels.

Neurosci; 128: 337-345

Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ, Hogendoorn PC, Taschner PE, van der Mey AG, Devilee P & Cornelisse CJ (2004)

Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-or dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families.

Oncogene; 23: 4076-4083

Heutink P, van der Mey AG, Sandkuijl LA, van Gils AP, Bardoel A, Breedveld GJ, van Vliet M, van Ommen GJ, Cornelisse CJ & Oostra BA (1992)

A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter.

Hum Mol Genet; 1: 7-10

Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian Y-M, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW & Schofield CJ (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family.

J Biol Chem; 277: 26351-26355

Hinson JP, Kapas S & Smith DM (2000)

Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide.

Endocrin Rev; 21: 138-167

Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Amino H, Tomitsuka E, Kita K (1999)

Characterization of the human SDHD gene encoding the small subunit of cytochrome b (cybS) in mitochondrial succinate-ubiquinone oxidoreductase.

Biochim Biophys Acta; 1412: 295-300

Hirsilä M, Koivunen P, Günzlers V, Kivirikko KI & Myllyharju J (2003)

Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor.

J Biol Chem; 278; 33: 30772-30780

Hofer T, Wenger RH & Gassmann M (2002)

Oxygen sensing, HIF-1 α stabilization and potential therapeutic strategies.

Pflügers Arch-Eur J Physiol; 443: 503-507

Hoffmann J, Krober SM, Hahn U, Ernemann U & Reinert S (2000)

Polytopic manifestations of paragangliomas. Diagnosis, differential diagnosis and indications for therapy.

Mund Kiefer Gesichtschir; 4: 53-56

Hogenesch JB, Chan CW, Jackiw VH, Brown RC, Gu Y-Z, Pray-Grant M, Perdew GH & Bradfield CW (1997)

Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway.

J Biol Chem; 272: 8581-8593

Hohl C, Oestreich R, Rosen P, Wiesner R & Grieshaber M (1987)

Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells.

Arch Biochem Biophys; 295: 527-535

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 transcription is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species.

FEBS Lett; 457: 53-56

Huang LE, Gu J, Schau M & Bunn HF (1998)

Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.

Biochem; 95: 7987-7992

Iborra FJ, Kimura H & Cook PR (2004)

The functional organization of mitochondrial genomes in human cells.

BMC Biol; 2: 9

Iliopoulos O, Kible A, Gray S & Kaelin WG (1995)

Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product.

Nat Med; 1: 822-826

IngledeW WJ & Onishi T (1975)

Properties of the S-3 iron sulphur centre of succinate dehydrogenase in the intact respiratory chain of beef heart mitochondria.

FEBS Lett; 54: 167-171

Isumi Y, Minamino N, Katafuchi T, Yoshioka M, Tsuji T, Kangawa K & Eto T (1998)

Adrenomedullin production in fibroblasts: its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells.

Endocrin; 139: 2552-2563

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

HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂-sensing.

Science; 292: 464-467

Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G & Rees DC (1999)

Structure of the Escherichia coli fumarate reductase respiratory complex.

Science; 284: 1961-1966

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM & Semenza GL (1998)

Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α .

Genes Dev; 12: 149-162

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

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

Science; 292: 468-472

Jakubowski W & Bartosz G (2000)

2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?

Cell Biol Int; 24: 757-760

Jougasaki M & Burnett JC (2000)

Adrenomedullin as a renal regulator peptide.

Nephrol Dial Transplant; 15: 293-295

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H & Poellinger L (1998)

Signal transduction in hypoxic cells. Inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible-factor-1 α .

EMBO; 17: 6573-6586

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y & Poellinger L (1999)

Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.

J Biol Chem; 274: 6519-6525

Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Kudoh S, Kawaguchi T & Takeda T (1994)

Adrenomedullin, a newly discovered hypotensive peptide, is a potent bronchodilator.

Biochem Biophys Res Commun; 205: 251-254

Karnovsky MJ (1994)

Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective.

Biochem; 102: 15-27

Keston AS & Brandt R (1965)

The fluometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide.

Anal Biochem; 11: 1-5

Kita K, Hirawake H, Miyadera H, Amino H & Takeo S (2002)

Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*.

Biochem Biophys Acta; 1553: 123-139

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H & Eto T (1993)

Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.

Biochem Biophys Res Comm; 192: 553-560

Koerber S, Santos AN, Tetens F, Küchenhoff A & Fischer B (1998)

Increased expression of NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (ND2) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration.

Mol Reprod Dev; 49: 394-399

Kooy NW, Royall JA & Ischiropoulos H (1997)

Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite.

Free Radic Res; 27: 245-254

Kroll SL & Czyzyk-Krzeska MF (1998)

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

Am J Physiol; 274: C167-C174

Kumar GK, Kim DK, Lee MS, Ramachandran R & Prabhakar NR (2003)

Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: Involvement of serine phosphorylation.

J Appl Physiol; 95: 536-544

Kummer W & Acker H (1995)

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

J Appl Physiol; 78: 1904-1909

Kummer W (1996) in:

Autonomic-endocrine interactions

(Unsicker K, Ed.), Haarwood Academic Publishers, Chur.: 315-356

Kummer W, König P & Höhler B (1999)

Cytochrome b558 (p22phox) in the guinea-pig adrenal medulla.

Microsc Res Tech; 47: 215-220

Kummer W, Höhler B, Goldenberg A & Lange B (2000)

Subcellular localization and function of B-type cytochromes in carotid body and other paraganglionic cells.

Adv Exp Med Biol; 475: 371-375

Kummer W & Yamamoto Y (2002)

Cellular distribution of oxygen sensor candidates -oxidases, cytochromes, K⁺channels- in the carotid body.

Microsc Res Tech; 59: 234-242

Kummer W, Höhler B, Sell A, Hänze J, Pfeil U & Goldenberg A (2003)

Role of ROS and NO in hypoxia-induced increase in tyrosine hydroxylase-messenger RNA in PC12 cells.

Adv Exp Med Biol; 536: 193-199

Kuzela S, Mutvei A & Nelson BD (1988)

Inhibition of mitochondrial protein synthesis in regenerating rat liver stimulates mitochondrial transcription.

Biochim Biophys Acta; 936: 372-376

Lack EE, Cubilla AL & Woodruff JM (1979)

Paragangliomas of the head and neck region. A pathologic study of tumors from 71 patients.

Hum Pathol; 10: 191-218

Ladoux A & Frelin C (2000)

Coordinated upregulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier.

J Biol Chem; 275: 39914-39919

Lagercrantz H (1996)

Stress, arousal, and gene activation at birth.

New Physiol Sci; 11: 214-218

Lahiri S, Ehleben W & Acker H (1999)

Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the rat carotid body: role of heme ligands.

Proc Natl Acad Sci USA; 96: 9427-9432

Laidler P & Kay JM (1975)

A quantitative morphological study of the carotid bodies of rats living at a stimulated altitude of 4300 meters.

J Pathol; 117: 183-191

Lancaster CRD & Kröger A (2000)

Succinate: quinone oxidoreductase: new insights from X-ray crystal structures.

Biochem Biophys Acta; 1459: 422-431

Lando D, Pongratz I, Poellinger L & Whitelaw ML (2000)

A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia inducible factor (HIF) 1 α and HIF-like-factor.

J Biol Chem; 275: 4618-4627

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ & Whitelaw ML (2002)

Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch.

Science; 295: 858-295

Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML & Peet DJ (2003)

Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation.

Eur J Biochem.; 270: 781-790

LeBel CP, Ischiropoulos H & Bondy SC (1992)

Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.

Chem Res Toxicol; 5: 227-231

Lee H-C & Wei Y-H (2000)

Mitochondrial role in life and death of the cell.

Biom Sci; 7: 2-15

Lee I, Bender E, Arnold S & Kadenbach B (2001)

New control of mitochondrial membrane potential and ROS formation – a hypothesis.

Biol Chem; 382: 1629-1636

Leif H, Weidner U, Berger A, Spehr V, Braun M, van Heek P, Friedrich T, Ohnishi T & Weiss H (1993)

Escherichia coli NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I.

Biochem Soc Trans; 21: 998-1001

Lewis-Tuffin LJ, Quinn PG & Chikaraishi DM (2004)

Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus.

Mol Cell Neurosci; 25: 536-547

Li Y and Trush MA (1998)

Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production.

Biochem Biophys Res Commun; 253: 295-299

Liochev SI & Fridovich I (2003)

Reversal of the superoxide dismutase reaction revisited.

Free Radic Biol Med; 34: 908-10

Liu YZ, Thomas NS & Latchmann DS (1999)

CBP associates with the p42/p44 MAPK enzymes and is phosphorylated following NGF treatment.

NeuroReport; 10: 1239-1243

Lloreta-Trull J & Serrano S (1998)

Biology and pathology of the mitochondrion.

Ultrastruct Pathol; 2: 357-367

Lombardo A, Carine K & Scheffler IE (1990)

Cloning and characterization of the iron-sulfur subunit gene of succinate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem; 265: 10419-10423

Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J & Gonzalez C (1988)

Chemotransduction in the carotid body: K⁺-current modulated by pO₂ in type I chemoreceptor cells.

Science; 241: 580-582

Lopez-Barneo J (1996)

Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions.

Trends Neurosci; 19: 435-440

Lopez-Barneo J, Ortega-Sanez P, Mokina A, Franco-Obregon A, Urena J & Castellano A. (1997)

Oxygen sensing by ion channels.

Kidney Int; 51: 454-461

Lopez PS, Castillo CH, Pastelin GH, Hernández MR, Suárez MJ, Sánchez ML & Escalante BA (1997)

Characterization of 3-nitropropionic acid-induced bradycardia in isolated atria.

Toxicol Appl Pharmacol; 148: 1-6

Loschen G, Flohe L & Chance B (1971)

Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria.

FEBS Lett; 18: 261-264

Majander A, Finel M & Wikström M (1994)

Diphenyleneiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-Ubiquinone oxidoreductase (complex I).

J Biol Chem; 269: 21037-21042

Makino Y, Cao R, Svensson K, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A & Poellinger L (2001)

Inhibitory PAS domain protein is negative regulator of hypoxia-inducible gene expression.

Nature; 414: 550-554

Maneg O, Ludwig B & Malatesta F (2003)

Different interaction modes of two cytochrom-c Oxidase soluble CuA fragments with their substrates.

J Biol Chem; 278: 46734-46740

Marchesi E, Rota C, Fann YC, Chignell CF & Mason RP (1999)

Photoreduction of the fluorescent dye 2-7-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements.

Free Radic Biol Med; 26: 148-161

Martinez A, Miller MJ, Unsworth EJ, Siegfried JM & Cuttitta F (1995)

Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors.

Endocrinology; 136: 4099-4105

Martinez A, Weaver C, Lopez J, Bhathena SJ, Elsasser TH, Miller MJ, Moody TW, Unsworth EJ & Cuttitta F (1996)

Regulation of insulin secretion and blood glucose metabolism by adrenomedullin.

Endocrinology; 137: 2626-2632

Martinez A, Vos M, Guédez L, Kaur G, Chen Z, Garayoa M, Pio R, Moody T, Stetler-Stevenson WG, Kleinmann HK & Cuttitta F (2002)

The effect of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells.

J Natl Cancer Inst; 94: 1226-1237

Martinez A, Saldise L, Ramirez MJ, Belzunegui S, Zudaire E, Luquin MR & Cuttitta F (2003)

Adrenomedullin expression and function in the rat carotid body.

Endocrinology; 176: 95-102

Masson N, William C, Maxwell PH, Pugh CW & Ratcliffe PJ (2001)

Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation.

EMBO; 20: 5197-5206

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

Maynard MA, Qi H, chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW & Ohh M (2003)

Multiple splice variants of the human HIF-3 α locus targets of the VHL E3 ubiquitin ligase complex.

J Biol Chem; 278: 11032-11040

McCord JM & Fridovich I (1969)

Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).

J Biol Chem, 244: 6049-55

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze , Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H & Fandrey J (2003)

Intracellular localization of human HIF-1 α hydroxylases implications for oxygen sensing.

J Cell Sci; 116: 1319-1326

Miller MJ, Martinez A, Unsworth EJ, Thiele CJ, Moody TW & Cuttita F (1996)

Adrenomedullin expression in human cancer tumor cell lines: its potential role as autocrine growth factor.

J Biol Chem; 271: 23345-23351

Millhorn DE, Raymond R, Conforti L, Breitner-Johnson D, Filisko T, Genter MB, Kobayashi S & Peng M (1997)

Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia.

Kidney Intern; 51: 527-535

Milunsky JM, Maher TA, Michels VV & Milunsky A (2001)

Novel mutations and the emergence of a common mutation in the SDHD gene causing familial paraganglioma.

Am J Med Genet; 100: 311-314

Mishra RR, Adhikary G, Simonson MS, Cherniack NS & Prabhakar NR. (1998)

Role of c-fos in hypoxia-induced AP-1 cis-element activity and tyrosine hydroxylase gene expression.

Brain Res Mol Brain Res; 59: 74-83

Miyadera H, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K & Omura S (2003)

Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase).

Proc Natl Acad Sci USA; 100: 473-477

Monson EK, Weinstein M, Datta GS, Helinski DR (1992)

The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain.

Proc Natl Acad Sci USA; 89: 4280-4284

Morgan-Hughes JA, Schapira AHV, Cooper JM & Clark JB (1988)

Molecular defects of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in mitochondrial diseases.

J Bioenerg Biomembr; 20: 365-382

Mulligan E & Lahiri S (1982)

Separation of carotid body chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ by oligomycin and by antimycin A.

Am J Physiol Cell Physiol; 242: C200-C206

Myhre O, Andersen JM, Aarnes H & Fonnum F (2003)

Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation.

Biochem Pharmacol; 65: 1575-1582

Nagata D, Hirata Y, Suzuki E, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Ishimitsu T, Minamino N, Ono Y, Kangawa K, Matsuo H & Omata M (1999)

Hypoxia-induced adrenomedullin production in the kidney.

Kidney Int; 55: 1259-1267

Nagatsu T, Levitt M & Udenfriend S (1964)

Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis.

J Biol Chem; 239: 2910-2917

Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Sasaki H, Shirato K & Shibahara S (1999)
Production and secretion of adrenomedullin in cultured human alveolar macrophages.
Peptides; 20: 1123-1125

Nguyen SV & Claycomb WC (1999)
Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1
cardiomyocytes.
Biochem Biophys Res Comm; 265: 382-386

Niemann S & Muller U (2000)
Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3.
Nat Genet; 26: 268-270

Nohl H, Gille L & Staniek K (2004)
The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration.
Acta Biochim Pol; 51: 223-229

Norris ML & Millhorn DE (1995)
Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase
gene.
J Biol Chem; 270: 23774-23779.

Nuki C, Kawasaki H, Kitamura H, Takenaga M, Kangawa K, Eto T & Wada A (1993)
Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene related peptide receptors in rat
mesenteric vascular beds.
Biochem Biophys Res Commun; 196: 245-251

Onishi T (1976)
Thermodynamic and EPR characteristics of a HiPIP-type iron-sulfur center in the
succinate dehydrogenase of the respiratory chain.
J Biol Chem; 251: 2105-2109

Oostveen FG, Au HC, Meijer P-J & Scheffler IE (1995)

A chinese hamster mutant cell line with a defect in the integral membrane protein C of complex II of the mitochondrial electron transport chain.

J Biol Chem; 270: 26104-26108

O'Rourke JF, Tian Y-M, Ratcliffe PJ & Pugh CW (1999)

Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 alpha.

J Biol Chem; 274: 2060-2071

Oyedotun KS & Lemire BD (2001)

The quinone-binding sites of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase.

J Biol Chem; 276: 16936-16943

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

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

Patel AJ & Honore E (2001)

Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels.

Trends Neurosci; 24: 339-346

Paulding WR, Schnell PO, Bauer AL, Striet JB, Nash JA, Kuznetsova AV & Czyzyk-Krzeska MF (2002)

Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells.

Micros Res Tech; 59: 178-187

Peers C & Kemp PJ (2001)

Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors.

Respir Res; 2: 145-149

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

Kv β 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to shaker channels.

Gen Physiol; 113: 897-907

Petersen LC (1977)

The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase.

Biochem Biophys Acta; 460: 299-307

Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML & Schägger H (2003)

Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes.

J Biol Chem; 278: 52873-52880

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

2',7'-Dihydrochlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation.

FEBS Lett; 416: 175-178

Poyton RO & McEwen JE (1996)

Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes.

Annu Rev Biochem; 65: 563-607

Prabhakar NR, Shenoy BC, Simonson MS & Cherniack NS (1995)

Cell selective induction and transcriptional activation of immediate early genes by hypoxia.

Brain Res; 697: 266-270

Prabhakar NR (1999)

NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body.

Respir Physiol; 115: 161-168

Prabhakar NR (2000)

Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors.

J Appl Physiol; 88: 2287-2295

Raymond R & Millhorn D (1997)

Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during hypoxia: role of Ca²⁺ and PKC.

Kidney Int; 51: 536-541

Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L & West MS (1992)

Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro.

J Appl Physiol; 73: 1797-1804

Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D & Pouyssegur J (1999)

p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1.

J Biol Chem; 274: 32631-32637

Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A & Ghigo D (2004)

Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress.

J Biol Chem; 279: 47726-47731

Riemann K, Sotlar K, Kupka S, Braun S, Zenner HP, Preyer S, Pfister M, Pusch CM & Blin N (2004)

Chromosome 11 monosomy in conjunction with a mutated S1 initiation codon in nonfamilial paraganglioma cases.

Cancer Genet Cytogenet; 150: 128-135

Riepe M, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO, Spencer PS & Allen CN (1992)

Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels.

Brain Res; 586: 61-66

Rota C, Fann YC and Mason RP (1999)

Phenoxy free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2'7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequence for oxidative stress measurements.

J Biol Chem; 274: 28161-26168

Rothe G & Valet G (1990)

Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2'7'-dichlorofluorescein.

J Leukoc Biol; 47: 440-448

Royall JA & Ischiropoulos H (1993)

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

Arch Biochem Biophys; 302: 348-355

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

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

Biosci Rep; 19: 89-98

Ryan HE, Lo J & Johnson RS (1998)

HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.

EMBO; 17: 3005-3015

Sabban EL (1997)

Control of tyrosine hydroxylase gene expression in chromaffin and PC12 cells.

Cell & Developmental Biology; 8: 101-111

Salceda S & Caro J (1997)

Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions.

J Biol Chem; 272: 22642-22647

Sandner P, Hofbauer KH, Tinel H, Kurtz A, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Skott O & Jensen BL (2004)

Expression of adrenomedullin in hypoxic and ischemic rat kidneys and human kidneys with arterial stenosis.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 286: R942-951

Saruta F, Kuramochi T, Nakamura K, Takamiya S, Yu Y, Aoki T, Sekimizu K, Kojima S & Kita K (1995)

Stage-specific isoforms of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in mitochondria from the parasitic nematode, *Ascaris suum*.

J Biol Chem; 270: 928-932

Sarvazyan N (1996)

Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes.

Am J Heart Circ Physiol; 271: H2079-2085

Scott JA, Homcy CJ, Khaw BA & Rabito CA (1988)

Quantitation of intracellular oxidation in a renal epithel cell line.

Free Radic Biol Med; 4: 79-83

Sell A (2001)

Differenzierung mitochondrialer und nicht-mitochondrialer Quellen von reaktiven Sauerstoffspezies in PC12-Zellen unter Hypoxie.

Thesis; Justus-Liebig-Universität

Semenza GL, Jiang B-H, Leung SW, Passantino R, Concorde J-P, Maire P & Giallongo A (1996)

Hypoxia response elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactat Dehydrogenase A gene promoter contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.

J Biol Chem; 271: 32529-32537

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

Semenza GL (2001)

HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing.

Curr Opin Cell Biol; 13: 167-171

Shen HM, Shi CY, Shen Y & Ong CN (1996)

Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1.

Free Radic Biol Med; 21: 139-46

Spicer Z & Millhorn DE (2003)

Oxygen sensing in neuroendocrine cells and other cell types: Pheochromocytoma (PC12) cells as an experimental model.

Endocrine Pathol; 14: 277-292

Stiller D, Katenkamp D & Kuttner K (1975)

Jugular body tumors: hyperplasias or neoplasms? Light and electron microscopical investigations.

Virchows Arch A Pathol Anat Histol; 365: 163-177

Streller T, Huckstorf C, Pfeiffer C & Acker H (2002)

Unusual cytochrome a592 with low PO₂ affinity correlates as putative oxygen sensor with rat carotid body chemoreceptor discharge.

FASEB; 16:1277-1279

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

Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) is a non-heme iron protein.

J Biol Chem; 273: 18019-18022

- Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A & Caro J (2001)
Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway.
J Biol Chem; 276: 21995-21998.
- Su B & Karin M (1996)
Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression.
Curr Opin Immunol; 8: 402-411
- Summers BA, Overholdt JL & Prabhakar NR (1999)
Nitric oxide inhibits L-type Ca²⁺ current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism.
J Neurophysiol; 81: 1449-1457
- Suzuki H, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T & Akahane K (1999)
Mitochondrial regulation of cell death: Mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death.
Mol Cell Biol; 19: 3842-3847
- Swift LM & Sarvazyan N (2000)
Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress.
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 287: H982-H990
- Takahashi R, Kobayashi C, Kondo Y, Nakatani Y, Kudo I, Kunimoto M, Imura N & Hara S (2004)
Subcellular localization and regulation of hypoxia-inducible factor-2alpha in vascular endothelial cells.
Biochem Biophys Res Comm; 317: 84-91
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T & Poellinger L (2000)
Mechanism of regulation of the hypoxia inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.
EMBO; 19: 4298-4309

Taschner PE, Jansen JC, Baysal BE, Bosch A, Rosenberg EH, Brocker-Vriend AH, van der Mey AG, van Ommen GJ, Cornelisse CJ & Devilee P (2001)

Nearly all hereditary paragangliomas in the netherlands are caused by two founder mutations in the SDHD gene.

Genes Chromosomes Cancer; 31: 274-281

Tew DG (1993)

Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications.

Biochem; 32: 10209-10215

Tian H, McKnight SL & Russell DW (1997)

Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells.

Genes Dev; 11: 72-82

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW & McKnight SL (1998)

The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development.

Genes Dev; 12: 3320-3324

Tielens AG & Van Hellmond JJ (1998)

The electron transport chain in anarobically functioning eucaryotes.

Biochim Biophys Acta; 1365: 71-78

Tomitsuka E, Hirawake H, Goto Y, Taniwaki M, Harada S & Kita K (2003)

Direct evidence for two distinct forms of the flavoprotein subunit of human mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase).

Biochem; 134: 191-195

Tomoda Y, Isumi Y, Katafuchi T, Tanaka K & Shibahara S (2000)

Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells.

Peptides; 22: 1783-1794

Trumpower BL (1990)

The protonmotive Q Cycle.

J Biol Chem; 265: 11409-11412

Tuomisto TT, Rissanen TT, Vajanto I, Korkeela A, Rutanen J & Yia-Herttula S (2004)

HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischemia as studied with DNA array.

Atherosclerosis; 174: 111-120

Wang DC, Meinhardt SW, Sackmann U, Weiss H & Onishi T (1991)

The iron-sulfur clusters in the two related forms of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*.

Eur J Biochem; 197: 257-264

Wang GL & Semenza GL (1995)

Purification and characterization of the hypoxia-inducible factor 1.

J Biol Chem; 270: 1230-1237

Wang JF, Jerrelsand TR & Spitzer JJ (1996)

Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes.

Free Radic Biol Med; 20: 533-542

Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M & Eckardt KU (2004)

Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells.

FASEB; 18: 1462-1464 Epub

Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J & Sauer H (2003)

Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species.

FASEB; 17: 503-505

Wax SD, Rosenfeld CL & Taubman MB (1994)

Identification of a novel growth factor-responsive gene in vascular smooth muscle cells.

J Biol Chem; 269: 13041-13047

Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G & Preis D (1991)

The respiratory chain NADH-dehydrogenase (complex I) of mitochondria.

Eur J Biochem; 197: 563-576

Weissmann N, Ebert N, Ahrens M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Hänze J, Fink L, Rose F, Conzen J, Seeger W & Grimminger F (2003)

Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs.

Am J Respir Cell Mol Biol; 29: 721-732

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

Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: Oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide dinucleotide phosphatase oxidase.

Blood; 87: 756-761

Wenger RH & Gassmann M (1997)

Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor 1.

Biol Chem; 378: 609-616

Wenger RH (2002)

Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing proteinhydroxylases, hypoxia-inducible factors, and O₂-regulated gene expression.

FASEB; 10: 1151-1162

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Williams C, Eckardt K-U, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Maxwell PH (1998)

Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha.

Blood; 92: 2260-2268

- Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hakinson O & Ratcliffe PJ (1996)
The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells.
J Biol Chem; 271: 15117-15123
- Xing J, Kornhauser J, Xia Z, Thiele E & Greenberg M (1998)
Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation.
Mol Cell Biol; 18: 1946-1955
- Yanagihara N, Tank AW & Weiner N (1984)
Relationship between activation and phosphorylation of tyrosine hydroxylase by 56 mM K⁺ in PC12 cells in culture.
Mol Pharmacol; 26: 141-147
- Yang CF, Shen HM, Shen Y, Zhuang ZX & Ong CN (1997)
Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells).
Environ Health Perspect; 105: 712-6
- Yang Y, Xu JX & Zhou H-M (1998)
Inactivation of succinate-ubiquinone reductase in substrate mixture.
Intern J Biochem & Cell Biol 30: 1147-1152
- Yang C, Kim H-S, Seo H & Kim K-S (1998a)
Identification and characterization of potential cis-regulatory elements governing transcriptional activation of the rat tyrosine hydroxylase gene.
J. Neurochem; 71: 1358-1368
- Yankovskaya V, Horsefield R, Tonröth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G & Iwata S (2003)
Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation.
Science; 299: 700-704

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Curnutte JT, Vollmer C, Wong V & Cutz E (1997)
Immunocytochemical localization on O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells.

Microsc Res Tech; 37: 101-106

Yu L, Xu J-X, Haley PE & Yu C-A (1987)

Properties of bovine heart mitochondrial cytochrome b560.

J Biol Chem; 262: 1137-1143

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

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

Proc Natl Acad Sci USA 98; 17: 9630-9635

Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK & Prabhakar NR (2004)

Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells.

J Physiol; 557.3: 773-783

Zhang H, Ahardh E & Agardh CD (1993)

Nitrobluetetrazolium staining: a morphological demonstration of superoxide in the rat retina.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; 23: 178-183

Zhang JG & Fariss MW (2002)

Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity.

Biochem Pharmacol; 63: 751-4

Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P & Shertzer HG (1994)

Oxidation pathways for the intracellular probe 2'7'-dichlorofluorescein.

Arch Toxicol; 68: 582-587

Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P & Shertzer HG (1996)

Effects of glutathione and pH on the oxidation of biomarkers of cellular oxidative stress.

Arch Toxicol; 70: 628-634

Zudaire E, Martinez A & Cuttitta F (2003)
Adrenomedullin and cancer.
Regul Pept; 112: 175-183

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kummer für die Überlassung des Themas und die intensive und hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

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

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. U. Pfeil für die ausgezeichnete Betreuung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit, sowie bei Frau Silke Wiegand und Frau Anna Goldenberg für ihre ständige und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. R. Paddenberg, Herrn Martin Bodenbenner, Frau Petra Faulhammer, Frau Karola Michael und Frau Claudia Tag bedanken, die mir jederzeit zur Beantwortung sämtlicher Fragen zur Verfügung standen.

Ausserdem bedanke ich mich bei Frau Patricia Berger für die aufmunternde Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Ich danke dem gesamten Team des Instituts der Anatomie und Zellbiologie für die freundliche Aufnahme und die nette Atmosphäre.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Freundinnen Cindy Draganic für die Korrektur der „Summary“ und Meike Haupt, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die finanzielle Unterstützung des Studiums und für die fortwährende moralische Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann, der in allen Lebenslagen für mich da ist und der mir sehr bei der Lösung sämtlicher computertechnischer Probleme sowie bei der Anfertigung der Grafiken geholfen hat.

ISBN 3-938026-42-1



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