

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Aktivierung der Fas (Apo-1/CD95) Signaltransduktion durch
Hyperoxie im neonatalen Gehirn von Nagetieren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Vinzenz Boos

aus Friedrichshafen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser
2. Priv.-Doz. Dr. med. Petra Bittigau
3. Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Höhn

Datum der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Fortschritte und Probleme der neonatalen Intensivmedizin	1
1.2 Die Rolle von Sauerstoff	1
1.3 Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums	3
1.4 Der programmierte Zelltod	4
1.5 Der Fas-Signalweg	6
1.5.1 Fas-Ligand	7
1.5.2 Fas-Rezeptor	8
1.5.3 FADD	9
1.5.4 Caspase-8	10
1.5.5 FLIP	11
1.5.6 JNK	12
1.6 Caspase-3	12
2 Zentrale Fragestellung	14
3 Methodik	15
3.1 Tierversuche	15
3.1.1 Tierschutz	15
3.1.2 Tierhaltung	15
3.1.3 Ratten	15
3.1.4 Mäuse	16
3.1.5 Behandlung	17
3.2 Präparation der Hirngewebe	17
3.2.1 Präparation für histologische Untersuchungen	17
3.2.2 Präparation für molekularbiologische Untersuchungen	18
3.3 Histologische Verfahren	19
3.3.1 Immunhistochemische Färbung des Fas-Rezeptors	19
3.3.2 Fluoro-Jade-B-Färbung	20
3.3.3 Stereologisch-optische Dissektionsmethode	20
3.3.4 Statistische Auswertung der histologischen Versuche	21
3.4 Untersuchung der Genexpression	22

3.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Hirngewebe	23
3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	23
3.4.3 Behandlung der RNA mit DNase I	23
3.4.4 Überprüfung der RNA-Integrität	24
3.4.5 Reverse Transkription	25
3.4.6 Semiquantitative PCR	26
3.4.7 Polyacrylamidgelelektrophorese	28
3.4.8 Silberfärbung der Polyacrylamidgele	29
3.4.9 Densitometrische Auswertung	30
3.5 Untersuchung der Proteinexpression	31
3.5.1 Proteinextraktion	32
3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.5.3 Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen	32
3.5.4 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	33
3.5.5 Immundetektion filtergebundener Proteine	34
3.5.6 Densitometrische Auswertung	35
3.6 Zellkultur	36
3.6.1 Kultivierung	36
3.6.2 Fixierung	37
3.6.3 Inkubation	37
3.6.4 Morphologische Auswertung	38
3.7 Material	39
3.7.1 Versuchstiere	39
3.7.2 Zellen	39
3.7.3 Chemikalien und Reagenzien	39
3.7.4 Lösungen und Puffer	42
3.7.5 Kits	45
3.7.6 Enzyme	45
3.7.7 Antikörper	45
3.7.8 Oligonukleotide	46
3.7.9 Molekulargewichtsstandards	46
3.7.10 Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial	46
3.7.11 Software	48

4 Ergebnisse	49
4.1 Physiologische Parameter	49
4.2 Immunhistochemischer Nachweis von Fas	49
4.3 Integrität der RNA	49
4.4 Fas mRNA- und Proteinexpression unter Hyperoxie	50
4.5 Fas-Ligand mRNA und Proteinexpression unter Hyperoxie	52
4.6 Expression der DISC-Proteine FADD und Caspase-8 unter Hyperoxie	53
4.7 Expression von FLIP unter Hyperoxie	54
4.8 Expression von Caspase-3 unter Hyperoxie	57
4.9 Expression und Phosphorylierung von JNK unter Hyperoxie	58
4.10 Einfluss von Caspase-8 Inhibitor auf Caspase-3 unter Hyperoxie	58
4.11 Ausmaß Hyperoxie-induzierter Apoptose bei Mäusen ohne Fas-Rezeptor	58
4.12 Ausmaß Hyperoxie-induzierter Apoptose bei Mäusen ohne Fas-Liganden	61
4.13 Einfluss von JNK Inhibitor auf PC12 Zellen unter Hyperoxie	62
5 Diskussion	64
5.1 Allgemeine Betrachtung	64
5.2 Die Rolle des Fas-Rezeptors unter Hyperoxie	65
5.3 Die Rolle des Fas-Liganden unter Hyperoxie	66
5.4 Die Rolle der Caspasen-8 und -3 unter Hyperoxie	67
5.5 Die Rolle von FLIP unter Hyperoxie	68
5.6 Die Rolle von JNK unter Hyperoxie	69
6 Zusammenfassung	70
7 Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen	71
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	72
8.1 Abbildungen	72
8.2 Tabellen	73
9 Literaturverzeichnis	74

1 Einleitung

1.1 Fortschritte und Probleme der neonatalen Intensivmedizin

In den letzten Jahren hat sich die Rate von lebend geborenen Kindern mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1500 g erhöht, außerdem haben neue Erkenntnisse und medizinische Fortschritte, insbesondere die Surfactantsubstitution, zu einer Verbesserung der Überlebenschancen von sehr kleinen Frühgeborenen geführt. Dies betrifft Kinder mit einem Geburtsgewicht von weniger als 500 g, zwischen 501 und 1000 g (ELBW, *extremely low birth weight infants*) sowie zwischen 1001 und 1500 g (VLBW, *very low birth weight infants*)^{1,2}. Die sinkende Mortalität geht jedoch mit einer hohen Morbidität bzw. Rate von Behinderungen bei Frühgeborenen einher³. Dabei bilden sich bei diesen Kindern besonders häufig neurologische Defizite aus, vor allem motorische Beeinträchtigungen, neurosensorische Veränderungen der visuellen oder akustischen Empfindung, geringere kognitive Leistungsfähigkeiten und geistige Behinderungen. Teilweise zeigen sich diese Defizite erst im Schulalter im Vergleich zu termingerecht Geborenen^{4,5}. Um diese Spätfolgen der Frühgeburtlichkeit zu reduzieren, ist weitere Forschung auf dem Gebiet der neonatalen Neurologie zwingend notwendig.

1.2 Die Rolle von Sauerstoff

Frühgeborene sind nach der Geburt zu früh der normalen Atmosphäre ausgesetzt und kommen dadurch in Kontakt mit einem für ihr Reifealter unphysiologisch hohen Sauerstoffpartialdruck. Dieser beträgt intrauterin ca. 25 mmHg, nach der Geburt steigt er sprunghaft auf ca. 70 mmHg, wodurch die Umstellung des kardiovaskulären auf den postnatalen Kreislauf stimuliert wird⁶. Durch eine eventuell erforderliche Sauerstoffs substitution beispielsweise im Rahmen einer maschinellen Beatmung kann dieser Effekt noch verstärkt werden¹. Solche hyperoxischen Bedingungen spielen in der Pathogenese diverser Erkrankungen von Neugeborenen eine Rolle. Nachgewiesen wurde dies bei der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) sowie der Frühgeborenenretinopathie (*retinopathy of prematurity*, ROP). Diskutiert wird eine pathogenetische Rolle von Sauerstoff unter anderem bei der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) und dem persistierenden Ductus Arteriosus (PDA)⁷⁻⁹. Der Sauerstoff kann dabei auf direktem oder auf indirektem Wege toxisch auf den Körper wirken¹⁰. Im ersten Fall wird die Toxizität durch freie

O₂-Radikale vermittelt, die als Nebenprodukte bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoff im aeroben mitochondrialen Stoffwechsel entstehen¹¹. Freie Radikale sind dabei Sauerstoffmoleküle mit einem oder mehreren unpaarigen Elektronen, die über eine Reaktion mit Membranlipiden oder direkt an der DNS Schäden verursachen können. So kommt es bei der Entstehung der bronchopulmonalen Dysplasie durch freie Radikale zu einer Schädigung der Alveolar- und Kapillarendothelien, in der Folge zur Ödembildung und einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Diese produzieren nach ihrer Aktivierung große Mengen *reaktive oxygen intermediates*, einer Form freier Radikale, die den Schaden am Lungenparenchym weiter verstärken und letztlich zu einer interstitiellen Fibrosierung der Lunge führen^{10,12}. Auf indirektem Wege wird die Toxizität über eine maladaptive physiologische Antwort auf den Sauerstoff vermittelt, hier am Beispiel der Frühgeborenenretinopathie dargestellt: Hyperoxie verursacht eine Vasokonstriktion, die bei längerer Dauer zu Gefäßobliterationen führt. Durch die so hervorgerufene regionale Hypoxie wird die Produktion von Wachstumsfaktoren wie dem VEGF (*vascular endothelial growth factor*) eingeleitet und es kommt zu einer Neovaskularisierung. Diese abnormalen Gefäße sind brüchig, neigen zu Blutungen und ziehen Vernarbungen nach sich^{10,13,14}. Neuronale Schäden am Frühgeborenen durch Sauerstoff werden besonders dadurch begünstigt, dass das unreife Gehirn über nicht vollständig, sondern erst unzureichend entwickelte antioxidative Systeme verfügt und protektive antioxidative Wirkstoffe wie β -Carotin, Vitamin E nur unzureichend vorhanden sind bzw. nicht schnell genug gebildet werden können¹⁵⁻¹⁷. Studien zeigen auch, dass oxidativer Stress mitunter ursächlich für die durch den physiologischen Alterungsprozess verursachten Verminderungen der kognitiven Leistung sowie die Verschlechterung der motorischen Koordination ist¹⁸. So spielen freie Radikale eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), M. Alzheimer, M. Huntington und M. Parkinson¹⁹⁻²³. In einer neueren Publikation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass durch den für Frühgeborene unphysiologisch hohen Sauerstoffpartialdruck Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn der Ratte ausgelöst wird. Genauere Mechanismen und Signalwege, die den durch Hyperoxie ausgelösten Zelluntergang induzieren und regulieren, sind bisher unbekannt²⁴.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird Sauerstoff inzwischen als therapeutisches Mittel in der Neonatologie zurückhaltender eingesetzt und kritisch überdacht²⁵. Es besteht noch Bedarf nach einem genaueren Verständnis über die toxische Wirkung von Sauerstoff, insbesondere auf dem Gebiet der bislang wenig erforschten Neurotoxizität.

1.3 Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums

Die Entwicklung des Gehirns läuft in der Zeit vor und nach der Geburt nicht kontinuierlich ab, sondern ist bestimmten Schwankungen unterworfen. Charakteristisch für Säugetiere ist eine Phase des beschleunigten Wachstums, auch als *brain growth rapid spurt* bekannt, die je nach Tierart vor, um oder nach dem optimalen Geburtszeitpunkt terminiert sein kann (Abb. 1.1). Sie ist durch verstärkte Zelldifferenzierung, Ausbildung von Dendriten, Synaptogenese und physiologische Apoptose charakterisiert. In dieser Zeit reagiert das Gehirn außerdem sehr sensibel auf exogene Einflüsse^{26,27}. Inzwischen sind die Hypoxie/Ischämie, Schädeltraumata und pharmakologische Wirkstoffe wie Anästhetika und Antikonvulsiva als potentielle Faktoren für einen erhöhten Neuronenuntergang während der *brain growth spurt period* bekannt²⁸⁻³⁰. Beim Menschen ist die Phase des beschleunigten Hirnwachstums auf den Zeitraum vom sechsten

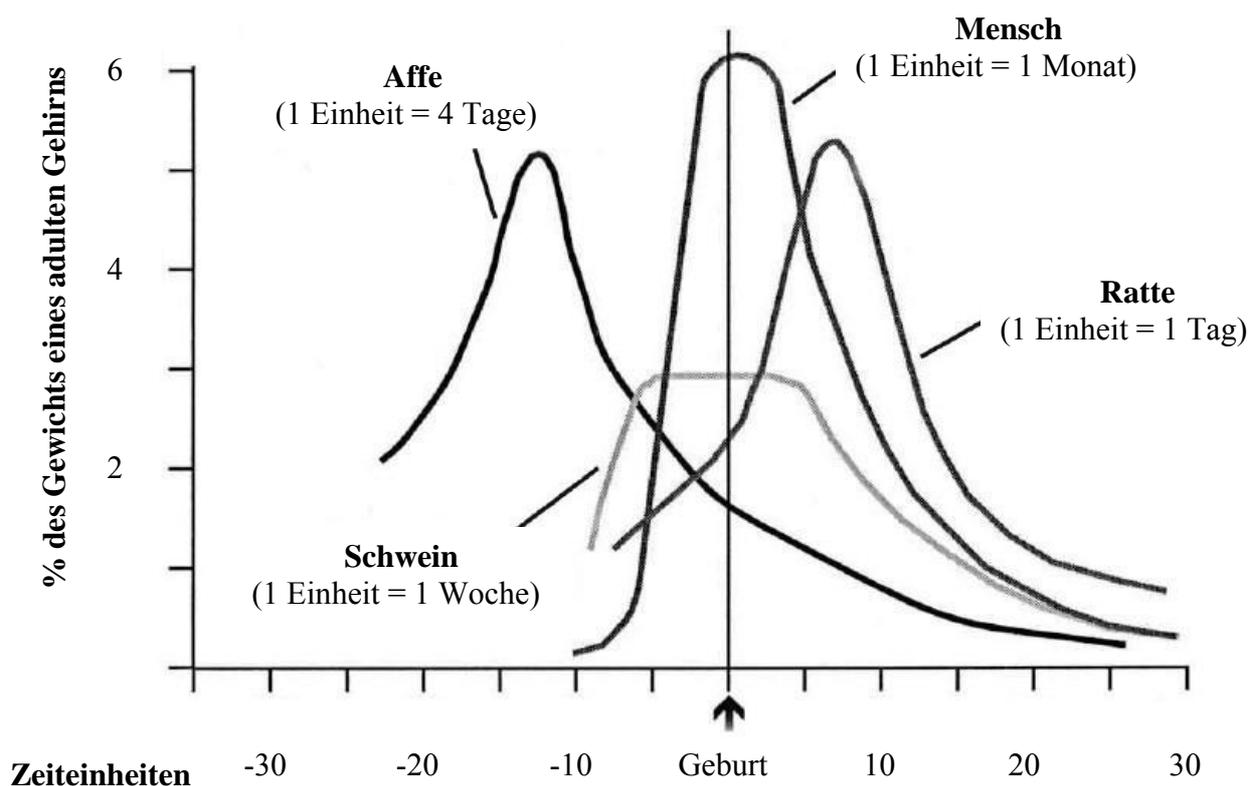


Abb. 1.1 Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums

Geschwindigkeit der Hirnentwicklung während der *brain growth spurt period* als Gewichtszunahme in Prozent des Erwachsenengewichts pro Zeiteinheit in Abhängigkeit vom Alter bei Affe, Mensch, Ratte und Schwein (modifiziert nach²⁷).

Schwangerschaftsmonat bis zum dritten Lebensmonat terminiert. Der Höhepunkt und damit auch die höchste Vulnerabilität wird dabei um den optimalen Geburtstermin erreicht. Bei Ratten und Mäusen findet diese Phase in den ersten drei Lebenswochen statt, mit einem Maximum zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag³¹. Um Phänomene im menschlichen Gehirn, die während der *brain growth spurt period* stattfinden, an geeigneten Tiermodellen zu erforschen, müssen sich diese Tiere in der vergleichbaren ontogenetischen Phase befinden^{26,27}.

1.4 Der programmierte Zelltod

Die einzelne Zelle hat vier Möglichkeiten der weiteren Existenz: Proliferation, Differenzierung, Aufrechterhaltung der gegenwärtigen Funktion oder Tod. Beim Zelltod unterscheidet man den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, von der Nekrose. Eine apoptotische Zelle ist durch nukleäre Verdichtung, Fragmentierung der DNS, Abbau der Zellstruktur und Reduzierung des Zellvolumens charakterisiert, im Gegensatz zur Nekrose, die sich hauptsächlich durch eine Ruptur der Zellmembran und durch ein Auslaufen des Zellplasmas darstellt und welche meist eine akute Entzündungsreaktion auslöst^{32,33}. Die genaue Kenntnis des Ablaufs und der Regulation der Apoptose ist von großer Bedeutung für das Verstehen vieler Krankheitsbilder, bei denen die Regulation der Apoptose fehlerhaft ist. So ist beispielsweise eine verstärkte Apoptose in Neuronen wichtiger Bestandteil in der Pathogenese des M. Parkinson, während die Unfähigkeit einer Zelle, bei schweren DNS-Schäden eine Apoptose einzuleiten, in der Tumorentstehung eine ursächliche Rolle spielt³⁴. Die genaue Fähigkeit zur Regulation einzelner Zellen ist für jeden mehrzelligen Organismus unentbehrlich, da er sich nur so vor vermeintlich überflüssigen, fehlerhaft funktionierenden oder entarteten Zellen trennen kann³⁵. Die Initialisierung der Apoptose kann dabei auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen (Abb. 1.2). Der extrinsische Aktivierungsweg wird eingeleitet durch die Bindung eines Liganden an einen entsprechenden Rezeptor an der Zellmembran. Dieser gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und ist durch einen extrazellulären Bestandteil sowie eine intrazelluläre, sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD) charakterisiert. Diese Todesdomänen aktivieren durch Bindung an eine weitere Todesdomäne (TRADD, FADD) die intrazellulär ablaufende Apoptose entlang einer Signalkaskade, welche in die Effektorphase mündet, in der Effektorcaspasen die eigentlich für den Zelltod ursächlichen Schädigungen einleiten^{36,37}. Die durch die Todesdomänen initialisierte Aktivierung der Caspasen kann letztlich zum Tod der Zelle führen, die Todesdomänen können aber auch Funktionen vermitteln, die der Apoptose entgegenwirken³⁶. Der intrinsische Signal-

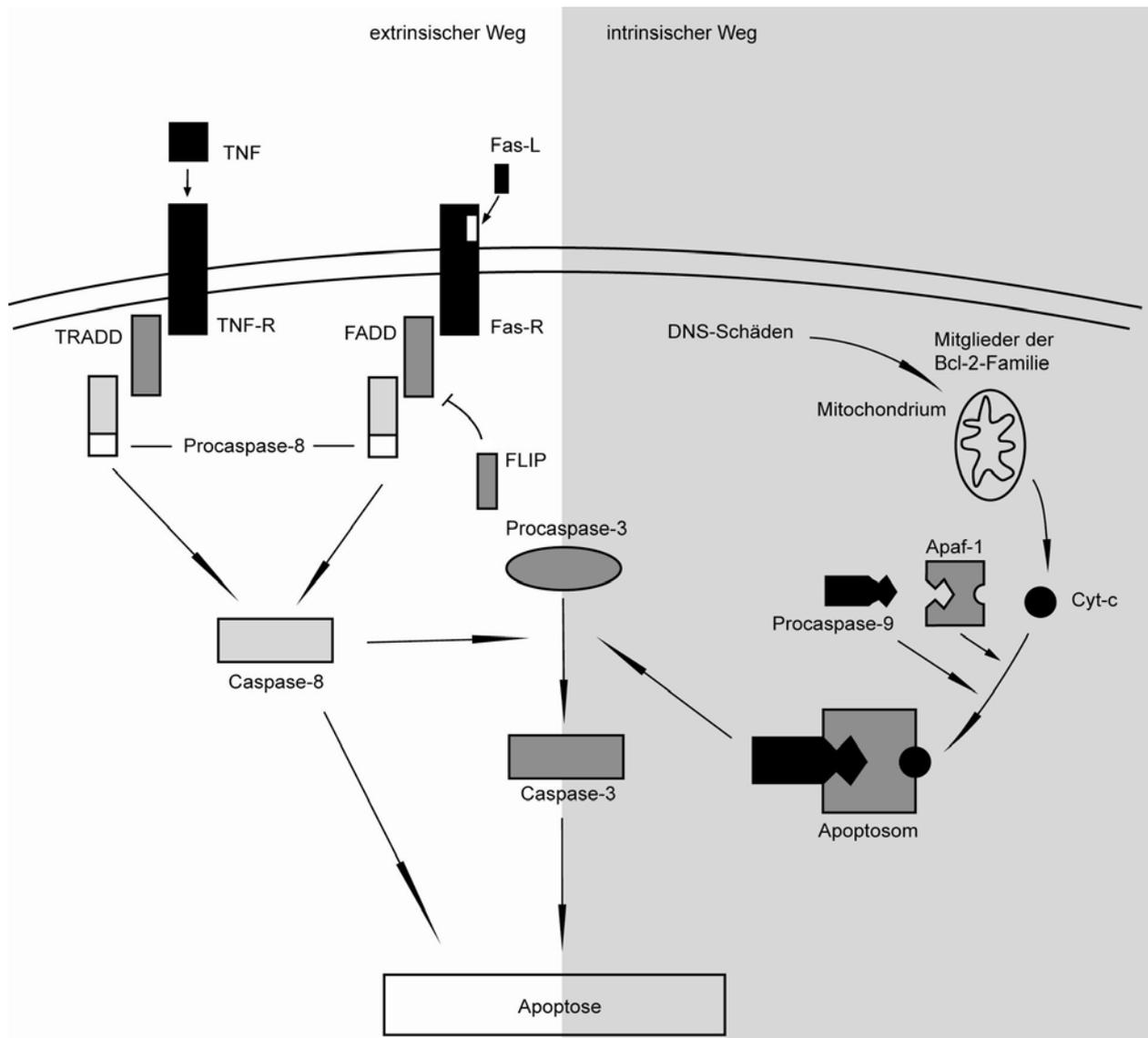


Abb. 1.2 Zwei Wege in den programmierten Zelltod

Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose führen in die gemeinsame Effektorphase.

weg kann auf verschiedene Arten eingeleitet werden. Bei Schädigungen der DNS wird das Protein p53, ein Transkriptionsfaktor, aktiviert, der seinerseits die Expression pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie stimuliert. Diese regulieren die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien, welches an Apaf-1 bindet und somit zu einer Konformationsänderung des Moleküls führt. Dieses bildet ein Heterodimer mit der Procaspase-9, welches fortan Apoptosom genannt. Die so aktivierte Caspase-9 dissoziiert und aktiviert den gemeinsamen Weg der extrinsischen und intrinsischen Apoptose, die Effektorphase, in die bereits eingeführt wurde^{33, 38, 39}. Der apoptotische Signalweg, der durch den Rezeptor Fas (Apo-1/CD95) eingeleitet wird,

gehört zu den bisher am genauesten untersuchten der TNF-Rezeptorfamilie³². Er soll im folgenden genauer betrachtet werden.

1.5 Der Fas-Signalweg

In den 1990er Jahren konnten Fas-Rezeptor- und Fas-Liganden-Proteine im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden, speziell in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen⁴⁰⁻⁴². Ebenso konnte eine Rolle von Fas bei der hypoxisch/ischämischen Neurodegeneration und nach Trauma im sich entwickelnden Gehirn an Tiermodellen gezeigt werden^{43,44}, weshalb eine genauere Untersuchung der Rolle des Fas Signalweges bei der Apoptose nach Hyperoxie sinnvoll erscheint. Der Fas-Rezeptor, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, wurde erstmals 1989 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen in Deutschland und Japan beschrieben^{45,46}. Sechs Jahre später folgte die Entdeckung der Interaktion zwischen dem membrangebundenen Fas-Liganden und dem Fas-Rezeptor, durch welche an einer einzelnen Zelle Apoptose eingeleitet werden kann⁴⁷. Das durch die Interaktion entstandene Signal wird über den transmembranen Teil des Fas-Rezeptors ins Zellinnere zur dortigen DD geleitet, an welche vier verschiedene Moleküle binden können: Daxx, FADD, FAP-1 und RIP⁴⁸⁻⁵¹. Im Gegensatz zu Daxx, FADD und RIP, die eine jeweils eigene weiterführende, intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen (Abb. 1.3), vermittelt FAP-1 eine Hemmung pro-apoptotischer Signalwege durch die Bindung an die negativ-regulatorische, 15 Aminosäuren große Domäne am C-terminalen Ende des Fas-Rezeptors (Abb. 1.4)⁵⁰. Außerdem hemmt FAP-1 durch eben diese Interaktion den Transport von inaktivem Fas aus dem Zytoplasma an die Zelloberfläche und somit die dortige Expression von Fas. So ist in Tumoren mit übermäßiger FAP-1-Expression die durch den Fas-Liganden vermittelte Fas-induzierte Apoptose nicht aktiv⁵². Wie aus Abbildung 1.3, die eine Übersicht der durch Fas induzierten Signalwege darstellt, ersichtlich, sind für die Fas-vermittelte Apoptose vor allem der durch FADD induzierte Signalweg, sowie das Protein JNK, das sowohl durch Daxx, als auch durch RIP aktiviert wird, von Bedeutung. Die Aktivierung von Fas führt jedoch nicht ausschliesslich zum Zelltod. Neben der durch Fas induzierten Apoptose werden durch Bindung der Proteine Daxx bzw. RIP an Fas auch Signalwege in Gang gesetzt, die eine Differenzierung oder Proliferation der Zelle anstossen⁵³.

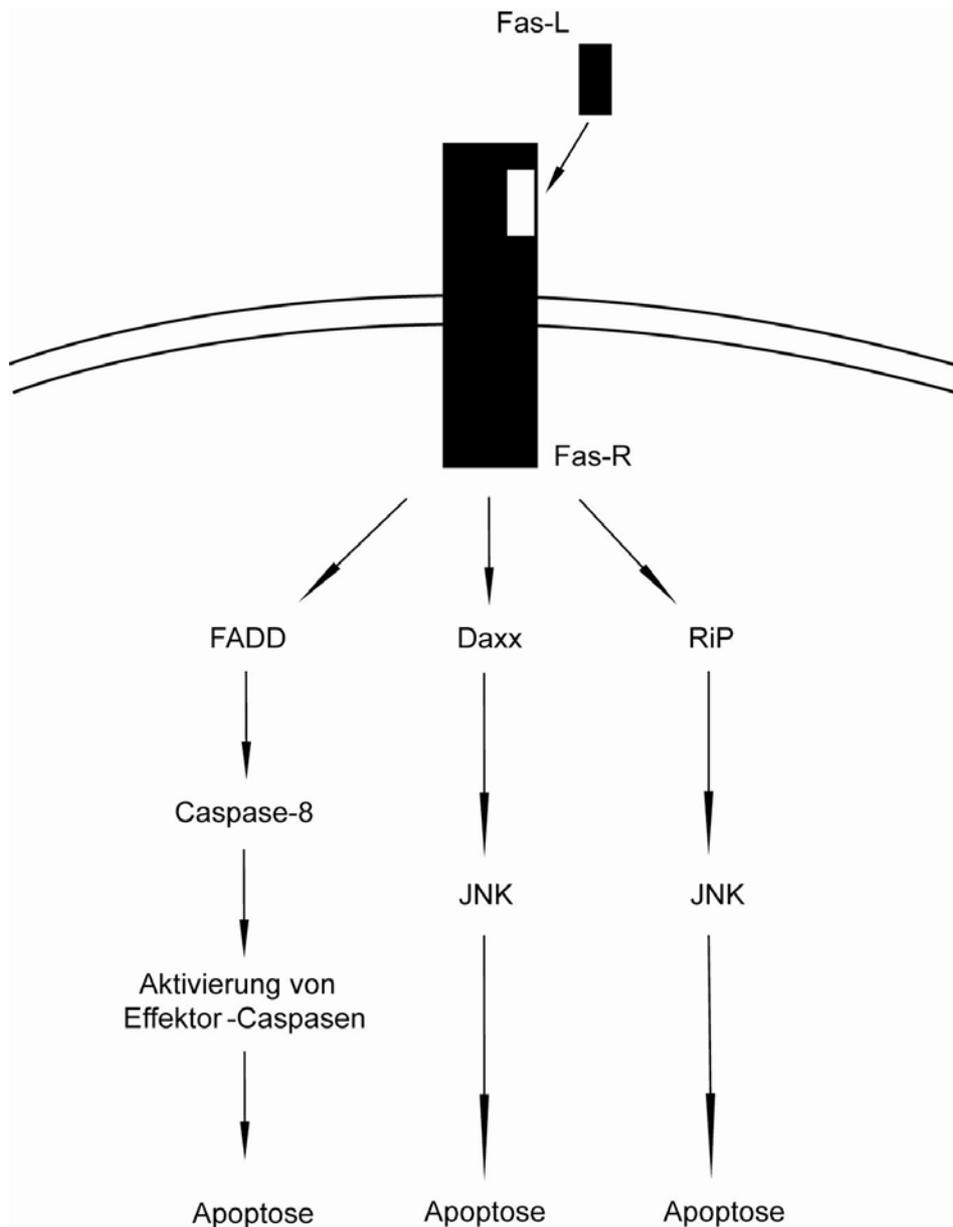


Abb. 1.3 Fas-Signalwege zur Apoptose

Vereinfachte Darstellung der durch die Interaktion mit dem Fas-Rezeptor induzierten, zur Apoptose führenden Signalwege von Daxx, FADD und RiP.

1.5.1 Fas-Ligand

Der Fas-Ligand (FasL) ist ein Protein der TNF-Familie⁵⁴. Wie auch andere Proteine dieser Familie kann FasL sowohl als transmembrane Form (*membrane-bound, mFasL*), also gebunden an Zelloberflächen und mit einem Molekulargewicht von circa 40 kDa, als auch als ungebun-

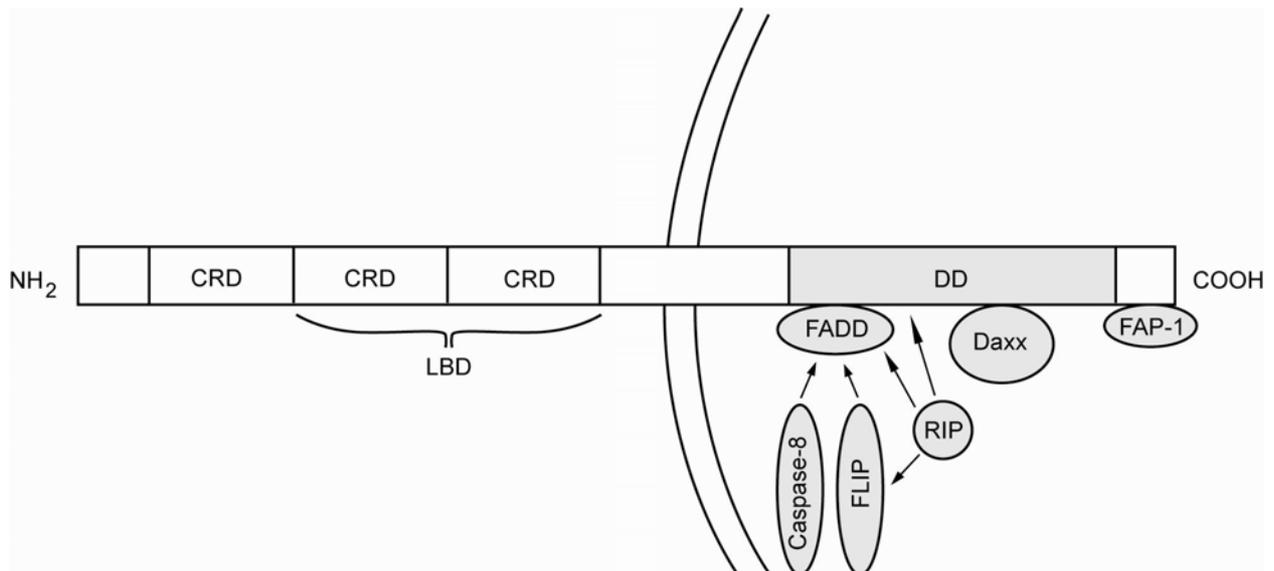


Abb. 1.4 Lineare Darstellung des molekularen Aufbaus des Fas-Rezeptors

denes Protein (*soluble*, *sFasL*, 26-29 kDa) vorkommen⁵⁵. Nur die membrangebundene Form kann selbsttätig durch Bindung an den Fas-Rezeptor eine Apoptose induzieren, die lösliche Form muss zur Bindung an den Rezeptor als Trimer oder Hexamer vorliegen, eine Apoptose induziert sie nur als Hexamer⁵⁶. Desweiteren hemmt die lösliche Form die Interaktion zwischen dem Fas-Rezeptor und membrangebundenem Fas-Liganden und ist somit eine wichtige regulatorische Komponente der Apoptose. So löste die Injektion von *sFasL* bei Mäusen Autoimmunreaktionen aus⁵⁷.

1.5.2 Fas-Rezeptor

Wie alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie besitzt auch der Fas-Rezeptor (Abb. 1.4) die drei typischen extrazellulären Cystein-reichen Domänen (*cysteine-rich domains*, CRD) CRD1, CRD2 und CRD3, wobei die Fas-Liganden an die beiden proximal gelegenen CRDs binden^{58, 59}. Am intrazellulären Teil des Fas-Rezeptors befindet sich die DD und das C-terminale Ende, das wie bereits beschrieben eine negativ-regulatorische Rolle spielt. Die Todesdomäne setzt sich aus einer Serie von sechs α -Helices zusammen, die gemeinsam mit den dazwischen liegenden, hydrophoben Resten den Kern des eigentlichen Proteins bildet. Von der dreidimensionalen Struktur vergleichbare Formationen finden sich auch in anderen Rezeptoren der TNF-Familie, so auch dem TNF-R1^{60, 61}. Der durch die α -Helices gebildete Teil des Fas-Rezeptors stellt die Bindungsstelle für Interaktionen mit Proteinen dar, die ebenfalls eine DD besitzen, so dass durch

eine Interaktion zwischen zwei DDs die eigentliche Verbindung zwischen dem Fas-Rezeptor und den intrazellulären Signalkaskaden hergestellt wird. Nach Aktivierung des Fas-Rezeptors durch Fas-Liganden-Bindung bildet sich aus Fas, FADD und Caspase-8 ein Komplex aus, der die Apoptose vermittelt (*death-inducing signaling complex*, DISC)³². Da Fas wie bereits beschrieben nicht nur apoptotische Signalwege induziert ist der eigentliche Begriff „Todesdomäne“ als Name der Proteininteraktions-Bindungsstelle des Fas-Rezeptors irreführend (am ehesten historisch begründet und dann beibehalten), da an der DD von Fas auch die Proteine Daxx und RIP binden, die nicht ausschliesslich apoptotische Prozesse einleiten^{53, 60}.

1.5.3 FADD

FADD (*Fas-associated death domain*) ist ein aus 208 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 23.3 kDa. Die Todesdomäne von FADD, die sich nahe des C-terminalen Endes des Proteins befindet, zeigt auf der Länge von 80 Aminosäuren eine komplette Übereinstimmung mit der intrazellulären Todesdomäne des Fas-Rezeptors, mit der sie interagiert, so dass die eigentliche Verbindung zwischen den beiden Proteinen eine Verbindung zwischen zwei nahezu homologen DDs darstellt⁶². Nach Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor rekrutiert letzterer intrazellulär FADD, in der Folge wiederum rekrutiert FADD die Procaspase-8. Dies geschieht über eine zweite Todesdomäne von FADD, die sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet und auch *death effector domain* (DED) genannt wird. Die Tatsache, dass FADD auch an freie Fas-Rezeptoren bindet, daraufhin jedoch keine Verbindung mit der Procaspase-8 eingeht, läßt darauf schließen, dass die Bindung an einen durch Fas-Liganden aktivierten Rezeptor mit einer Konformationsänderung des FADD-Proteins einhergeht, die für die Rekrutierung der Procaspase-8 notwendig ist⁶³. Zwar bestehen beide Todesdomänen von FADD aus sechs α -Helices, jedoch sind in der DD mehr hydrophile Anteile enthalten. Gerade diese hydrophilen Abschnitte könnten aufgrund ihrer kritischen Rolle im Rahmen der Proteininteraktion für die Konformationsänderung von FADD ursächlich sein⁶⁴. Außerdem können zwei FADD-Proteine miteinander ein Dimer bilden. Es wurde gezeigt, dass ohne Rezeptor-Stimulation durch den Liganden keine spontane Apoptose durch FasR-FADD- oder FADD-FADD-Interaktionen zustande kommt, trotz Präsenz der Procaspase-8. Zur kompletten Ausbildung eines DISC ist somit ein aktivierter, an der Zellmembran lokalisierter Rezeptor erforderlich⁶⁵. Die Tatsache, dass Apoptose in Zellen, die über kein FADD verfügen, stark vermindert ist oder gar nicht stattfindet, stellt einen weiteren Beweis für die Wichtigkeit von

FADD bei Fas-induzierter Apoptose dar⁶⁶. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass FADD außer im Signalweg von Fas auch bei der durch TNF-R1, einem weiteren Rezeptor der TNF-Superfamilie, induzierten Apoptose involviert wird, ebenso bei Apoptose durch den Rezeptor DR3 (*death receptor 3*)^{36, 49}. Ohne die Stimulierung durch eine übergeordnete Instanz wie dem Fas-Rezeptor kann FADD in *in vitro* Modellen auch selbstständig in hohen Konzentrationen, so auch im Rahmen einer unphysiologisch hohen Expression, Apoptose induzieren⁶².

1.5.4 Caspase-8

Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten (*cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*)⁶⁷. Nach der Erstbeschreibung der Caspase-16 bis -18 im Jahr 2008 besteht die Familie der Caspasen aus nun 18 Mitgliedern⁶⁸. Dabei können Initiator-Caspasen von Effektor-Caspasen im apoptotischen Prozess unterschieden werden, einige wenige Caspasen sind darüber hinaus an der Entstehung von Entzündungen beteiligt⁶⁹. Die Caspase-8 (FLICE, *FADD-like interleukin-1 β converting enzyme*) spielt eine Rolle bei der Initiierung der Apoptose, gemeinsam bildet sie mit dem Fas-Rezeptor und FADD den bereits beschriebenen DISC. Sie liegt als Procaspase-8 im Zytosol vor und wird durch die Interaktion zwischen ihrer eigenen DED und der DED von FADD aktiviert. FADD ist somit der notwendige Co-Faktor zur Aktivierung der Caspase-8. Dabei konkurriert das Protein direkt mit FLIPs, das von der Struktur her ähnlich ist, jedoch über keine katalytischen Eigenschaften verfügt und somit die Apoptose hemmt, um die Bindungsstelle von FADD⁷⁰. Durch die Vervollständigung und Aktivierung des DISC kommt es zu einer Anordnung von Fas-Rezeptoren in Aggregaten an der Zellmembran, die wiederum die DISC-Aktivität erhöhen. In der Folge kommt es zu einer endosomalen Internalisierung des gesamten Komplexes ins Zellinnere (Abb. 1.5) und einer Freisetzung der aktivierten Caspase-8 ins Zytoplasma. Dort werden auch die eigentlich apoptotischen Prozesse in Gang gesetzt, bei dem weitere *interleukin-1 β converting enzyme* (ICE)-ähnliche Proteine bis hin zu den Effektorcaspasen, darunter die Caspase-3, durch proteolytische Spaltung aktiviert werden⁷¹. Der Caspase-8 fällt außerdem eine wesentliche regulatorische Rolle bei der Kumulation der Fas-Rezeptor-Komplexe zu⁷².

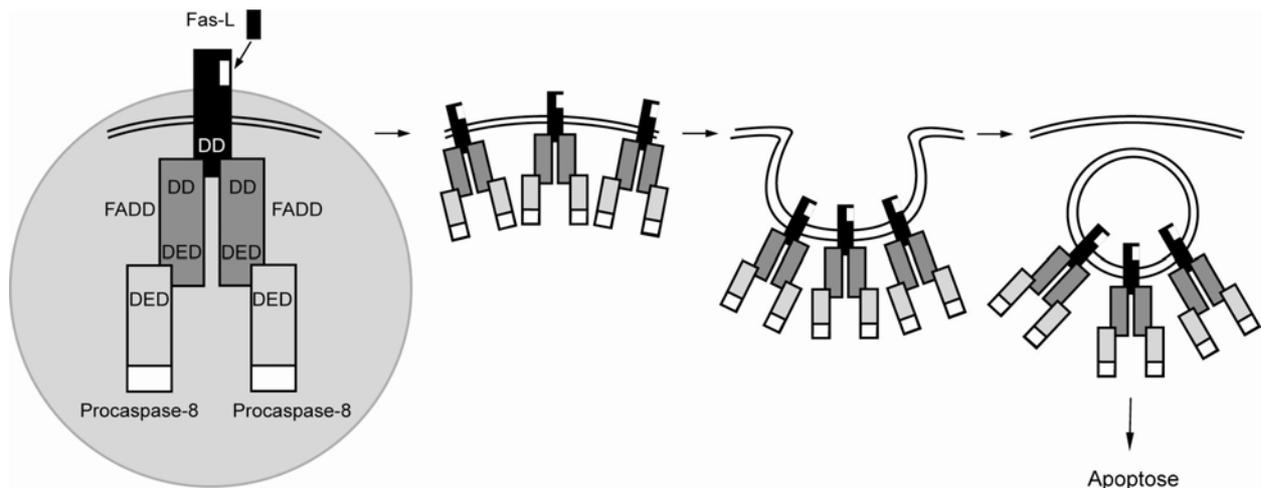


Abb. 1.5 Aktivierung und Internalisierung des DISC

Aktivierung des DISC durch Ligandenbindung, Anordnung von Fas-Rezeptoren in Aggregaten an der Zellmembran und endosomale Internalisierung des Komplexes ins Zellinnere.

1.5.5 FLIP

FLIP (FLICE-inhibitory protein) ist ein Inhibitor der Fas-induzierten Apoptose, von dem zwei Spaltprodukte existieren: FLIP_S (FLIP_{short}), das zwei DEDs besitzt und FLIP_L (FLIP_{long}), das zusätzlich zu den beiden DEDs ein Caspase-ähnliches aktives Zentrum enthält, in dem das Cystein jedoch durch ein Tyrosin ersetzt ist, das folglich strukturell der Procaspase-8 entspricht, jedoch keine Caspase-Aktivität vermittelt^{70,73}. Der genaue Prozess der Hemmung der Signaltransduktion durch die kurze Isoform von FLIP ist noch nicht vollkommen geklärt, es gibt aber Hinweise, dass bei FLIP_S die Anlagerung der DEDs von FLIP_S an die DEDs von FADD bzw. Caspase-8 eine Störung der Interaktionen zwischen diesen beiden Proteinen hervorruft und daraus eine Abschwächung bzw. Unterbrechung der Signalkaskade resultiert⁷⁴. Die lange Isoform von FLIP, FLIP_L, bildet ein Heterodimer mit der Caspase-8, das einen Verbleib der Caspase-8 an der Membran sicherstellt, somit die Caspase-8 nicht vollständig aktiviert, nicht in ihrer aktiven Form ins Zytosol entlässt und folglich zu keiner Apoptose führt. Stattdessen wird durch eine proteolytische Restaktivität des FLIP_L-Caspase-8-Heterodimers ein aktives Zwischenprodukt der Caspase-8 gebildet, das am DISC verbleibt und andere, nicht-apoptotische Signalwege induziert^{75,76}.

1.5.6 JNK

JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*) gehört zur Gruppe der MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), einer Gruppe wichtiger Mediatoren bei der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern. JNK phosphoryliert den Transkriptionsfaktor c-Jun am N-terminalen Ende und wird selbst durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin und Tyrosin aktiviert^{77, 78}. Von JNK existieren drei Unterformen, JNK1, JNK2 (beide essentiell für Cytochrom-c vermittelte Apoptose) und JNK3, alle drei Formen spielen eine Rolle beim programmierten Zelltod^{79, 80}. Wie aus Abbildung 1.3 schematisch ersichtlich, kann JNK sowohl durch die Interaktion von Fas mit Daxx, als auch durch die Bindung von Fas an RIP aktiviert werden^{81, 82}, jedoch sind dies nicht die einzigen Wege. JNK ist ein wichtiger Mediator der durch zellulären Stress verursachten Apoptose, JNK kann dabei durch die MAPKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) MKK4 und MKK7 aktiviert werden, diese werden wiederum durch eine ganze Reihe von MAPKKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) induziert: ASK, MEKK, MLK, TAK1, TPL-2^{81, 82}. Außer Apoptose reguliert JNK auch physiologische Prozesse wie Proliferation oder Differenzierung bzw. Morphogenese von Zellen⁸³. Durch die Erkenntnis, dass durch Aktivierung von JNK auch die Transkription des Fas-Liganden verstärkt wird, schließt sich ein regulatorischer Kreis⁸⁴. Auch die Tatsache, dass FADD-vermittelte Apoptose und Daxx-induzierte JNK-Aktivierung bei der Apoptose zwar zwei getrennte Signalwege sind, sich jedoch ergänzen, ist nach diesen Erkenntnissen von besonderer Bedeutung⁴⁸. Das genaue Verständnis des Einflusses der Induktion durch Fas auf die Aktivierung und umgekehrt, sowie die Abgrenzung der apoptotischen von der physiologischen Rolle von JNK stellt somit eine besondere Herausforderung der heutigen Forschung dar.

1.6 Caspase-3

Die Caspase-3, die einzige in dieser Arbeit untersuchte Effektorcaspase, ist ein verlässlicher Biomarker für den apoptotischen Zelltod⁸⁵. Durch die aktivierte Caspase-8 wird die inaktive Form Procaspase-3 im Zytosol auf direktem Wege und ohne erforderliche Co-Faktoren gespalten⁸⁶. Dabei scheint die Überschreitung einer Schwellenkonzentration der Procaspase-3 im Zytoplasma erforderlich damit diese wirksam durch die im DISC aktivierte und freigesetzte Caspase-8 gespalten wird. Jedoch kann ein Teil der pro-apoptotischen Funktionen der Caspase-3 (s.u.) in Abwesenheit dieser durch die ebenfalls durch Caspase-8 aktivierte Caspase-7 übernommen

werden. Die eigentliche Apoptose wird über mehrere durch die aktivierte Caspase-3 induzierte Ereignisse vermittelt. Dies sind auf direktem Wege die Aktivierung und Prozessierung der Procaspase-6 zur Caspase-6, welche wiederum eine wichtige Rolle beim nukleären Zelltod hat, sowie die Spaltung des nukleären Strukturproteins NuMA und des Proteins PAK2. Letzteres nimmt dabei durch die extranukleäre Bildung von Apoptosekörperchen Einfluß auf den Zelltod. Außerdem induziert die aktivierte Caspase-3 auch auf indirektem Wege DNS-Fragmentierungen und Chromatinkondensationen als Bestandteil der Apoptose im Nukleus^{87,88}. Aktuelle Veröffentlichungen weisen zunehmend darauf hin, dass die aktivierte Caspase-3 nicht ausschließlich zum Zelltod führt, sondern auch eine wichtige Rolle bei physiologischen Zellfunktionen, also der Regulation des Zellzyklus, der Migration und Differenzierung einnimmt⁸⁹, speziell auch im zentralen Nervensystem^{90,91}.

2 Zentrale Fragestellung

Die Pathogenese für sowohl neurokognitive Beeinträchtigungen als auch motorische Defizite bei ehemals frühgeborenen Kindern ist noch unklar. Neuere Publikationen zeigen, dass der unphysiologisch hohe Sauerstoffpartialdruck, dem Frühgeborene ausgesetzt sind, zu einer Neurodegeneration im Gehirn während der vulnerablen Phase führt²⁴. Die Mechanismen dieser durch Hyperoxie ausgelösten Apoptose sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwiefern der sogenannte Todesrezeptor Fas und die ihm folgenden Signalkaskaden am erhöhten Zelltod nach Hyperoxie beteiligt sind, mit dem Ziel neuroprotektive Angriffspunkte zu identifizieren. Die Arbeit konzentriert sich dabei auf die Gehirnregionen Cortex und Thalamus, in denen bereits durch Hyperoxie ausgelöste erhöhte Zelltodraten am verwendeten Tiermodell der sechs Tage alten Ratte beschrieben worden sind²⁴.

Im speziellen bedeutet dies, dass in dieser Arbeit nach Klärung, ob das Fas-Rezeptorprotein auch nach Hyperoxie exprimiert wird, die Expressionen der Gene und Proteine Fas und Fas-Ligand, sowie der an den nachfolgenden, zur Apoptose führenden Signalkaskaden beteiligten Proteine FADD, FLIP, Caspase-8 und Caspase-3, sowie JNK nach unterschiedlich langen Phasen von Hyperoxie untersucht werden. Desweiteren soll durch Quantifizierung des durch Sauerstofftoxizität ausgelösten Zelltods im Gehirn von Mäusen, denen der funktionelle Fas-Rezeptor bzw. der Fas-Ligand fehlt, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine Beteiligung von Fas an der Apoptose untersucht werden. Ebenso soll mit Hilfe eines pharmakologischen, selektiven Caspase-8 Inhibitors die direkte Beteiligung eines bedeutenden Teils der durch Fas induzierten Signalkaskade am Zelltod nach Hyperoxie nachgewiesen werden. Zuletzt beschäftigt sich die Arbeit anhand eines Modells mit PC12-Zellen mit der Frage, ob sich bei einem möglichen Einfluss von Hyperoxie auf die Proteinexpression bzw. Aktivierung von JNK, das sowohl Apoptose, also auch Zelldifferenzierung vermittelt, ein weiterer, nicht zur Apoptose führender Einfluss von JNK auf die Zellen nach Hyperoxie zeigen lässt.

3 Methodik

3.1 Tierversuche

3.1.1 Tierschutz

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Die behördliche Genehmigung durch das Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz wurde erteilt (Aktenzeichen G 232/00 und 140/07).

3.1.2 Tierhaltung

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung des Forschungshauses der Charité am Campus Virchow-Klinikum. Alle Mäuse und Ratten wurden in vollklimatisierten Tierställen bei einer Temperatur von 20 °C (± 2 °C) und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % (± 10 %) gehalten und erlebten den normalen Tag-Nacht-Rhythmus. Sie lebten in Makrolen-Käfigen mit Weichholzfaser als Einstreu. Zur Ernährung stand den Tieren handelsübliches Alleinfutter zur Haltung von Ratten und Mäusen und Wasser ad libitum zur Verfügung. Um einer Hypothermie bei den Jungtieren vorzubeugen, wurden diese während des gesamten Versuchs nicht von ihren ausgewachsenen Müttern getrennt.

3.1.3 Ratten

Es wurden sechs Tage alte Ratten (Han Wistar) verwendet. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 10 bis 15 g schwer. Die Ratten wurden in einen ehemaligen Transportinkubator (Abb. 3.1) gesetzt, in dem eine Sauerstoffkonzentration von 80 % herrschte, dort verblieben diese dem Versuchsaufbau entsprechend für unterschiedliche Zeitintervalle (2, 6, 12, 24, 48, 72 Stunden), während die Kontrolltiere nur 21 % Sauerstoff ausgesetzt wurden. Für die immunhistochemische

Färbung wurden 6 Tage alte Ratten verwendet, die über den gesamten Zeitraum unter normoxischen Bedingungen bzw. für 24 Stunden unter 80 % Sauerstoff gehalten wurden.

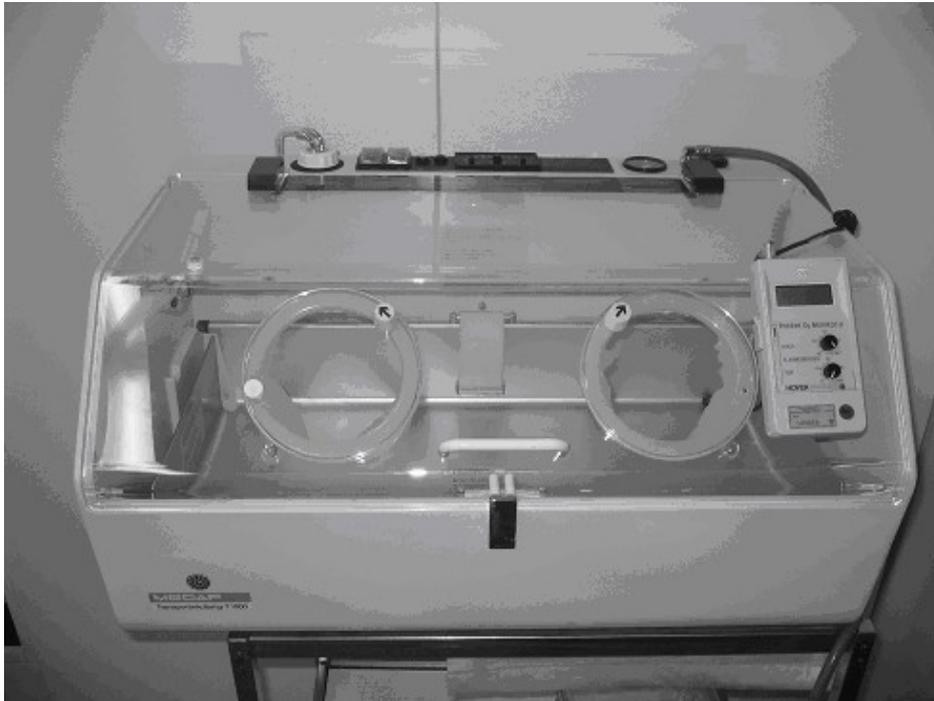


Abb. 3.1 Inkubator mit Sauerstoffkonzentrations-Messgerät

3.1.4 Mäuse

B6.MRL-Tnfrsf6lpr Mäuse haben homozygote Mutationen im Fas-Rezeptorprotein. Homozygote Mutationen im Protein des Fas-Liganden besitzen die entsprechenden *B6Smn.C3-FasLgld* Mäuse^{92, 93}. Diese Tiere können als knock-out Mäuse zur Untersuchung der Rolle des Fas-Rezeptors bzw. des Fas-Liganden herangezogen werden und sind ein seit vielen Jahren etabliertes Modell⁹⁴. So konnte anhand dieses Modells bereits eine weitere, nicht-apoptotische, proliferative Rolle von Fas nachgewiesen werden, wobei Neuronen des unreifen Gehirns während der Phase der Synaptogenese in *B6.MRL-Tnfrsf6lpr* und *B6Smn.C3-FasLgld* Mäusen weniger dendritische Äste ausbilden als dies in Wildtyp Kontrolltieren der Fall ist und Fas-Ligand in embryonalen, kortikalen Neuronen *in vivo* und *in vitro* keine Apoptose induziert⁹⁵. Als Fas-Rezeptor knock-out Mäuse wurden *B6.MRL-Tnfrsf6lpr*, als Fas-Ligand knock-out Mäuse wurden *B6Smn.C3-FasLgld* Tiere verwendet, zur Kontrolle wurden *C57BL/6* Mäuse herangezogen, die zu Versuchsbeginn 6 Tage alt und zwischen 3.4 und 6.6 g schwer waren. Zur Aussetzung der Tiere in einer hyperoxischen Atmosphäre wurden diese wie die Ratten in einen ehemaligen

Transportinkubator (Abb. 3.1) überführt und dort für 24 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 80 % bei normobaren Druckverhältnissen und einer Temperatur von 21 °C ausgesetzt. Kontrolltiere wurden während dieses Zeitraumes in normaler Atmosphäre mit 21 % Sauerstoffanteil gehalten.

3.1.5 Behandlung

Dieser Versuchsteil fand lediglich an Han Wistar Ratten statt. Die Tiere wurden randomisiert, ein Teil bekam im Alter von sechs Tagen 0.1 ml pro 10 g Körpergewicht des selektiven Caspase-8 Inhibitors TRP801 verdünnt in 0.9 % NaCl intraperitoneal appliziert. Die anderen Tiere, die als Kontrollgruppe dienten, erhielten eine intraperitoneale Applikation von Kochsalzlösung in Höhe des gleichen Volumens. Alle Tiere wurden dann für 24 Stunden einer Atmosphäre mit 80 % Sauerstoffgehalt ausgesetzt.

3.2 Präparation der Hirngewebe

3.2.1 Präparation für histologische Untersuchungen

Die Tiere wurden direkt nach Versuchsende mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet, sodann folgte die Eröffnung des Thorax und eine Kanüle wurde transkardial über den linken Ventrikel in die Aorta vorgeschoben. Über diese wurden 2 ml eines 4 °C kalten, mit Heparin versehenen 0.1 M Phosphatpuffers als Bolus appliziert, es folgte ein Bolus und eine Tropfinfusion mit gekühlter 4 %-iger Paraformaldehydlösung für 10 Minuten. Anschließend wurde die Kalotte der Tiere mit chirurgischem Besteck eröffnet, das Gehirn als ganzes mit einem Spatel herausgelöst sowie Cerebellum und Riechhirn abgetrennt. Die Gehirne wurden gewogen (0.22 - 0.28 g) und zur weiteren Fixierung für drei bis vier Tage bei 4 °C in 4 %-iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt. Nachfolgend wurden die Gehirne in je einen rostralen und kaudalen Anteil unterteilt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tab. 3.1).

Komponente(n)	Inkubationsdauer/Temperatur
Ethanol 70 %	3.5 h / Raumtemperatur
Ethanol 80 %	über Nacht / Raumtemperatur
Ethanol 96 %	1 h / 40 °C
Ethanol 100 %	1 h / 40 °C
Ethanol 100 %	1 h / 40 °C
Ethanol 100 % / Chloroform (1:1)	1 h / 40 °C
Chloroform	1 h / 40 °C
Chloroform	1 h / 40 °C

Tab. 3.1 Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratation

Zum Abschluss erfolgte die Imprägnierung in flüssigem Paraffin für eine Stunde bei 60 °C und eine zweite Einbettung (mit vorgewärmter Form und Pinzette) für 12 Stunden bei 60 °C.

3.2.2 Präparation für molekularbiologische Untersuchungen

Sowohl die Tiere, die der erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren, als auch die Kontrolltiere in Normoxie wurden in nicht narkotisiertem Zustand schnell dekapitiert, die Kalotte wurde aufpräpariert und das Gehirn vollständig entnommen. Die Gehirne der Ratten wurden dann, nach Abtrennung des gesamten Cerebellums in einem, mit einer Rasierklinge und kleinen Spateln, jeweils links- und rechtsseitig getrennt und in folgende Hirnregionen unterteilt:

- Cortex frontalis
- Cortex retrosplanialis
- Thalamus

Alle Gewebeproben wurden nach der Präparation unmittelbar in 2 ml Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.3 Histologische Verfahren

3.3.1 Immunhistochemische Färbung des Fas-Rezeptors

Für die immunhistochemische Färbung wurde das in Paraffin eingebettete Gehirn am Mikrotom koronar in 5 µm große Scheiben geschnitten, welche auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger aufgebracht wurden. Diese wurden nach der bei Raumtemperatur stattgefundenen Entparaffinisierung (Tab. 3.2) in 10 mM Zitratpuffer (pH 6.0) für 12 Minuten

Komponente	Inkubationsgänge / -dauer
Xylol	3 x 5 Minuten
Ethanol 100 %	2 x 5 Minuten
Ethanol 95 %	2 x 3 Minuten
Ethanol 70 %	3 Minuten
Ethanol 40 %	3 Minuten
ddH ₂ O	3 - 40 Minuten

Tab. 3.2 Entparaffinisierung der Proben

bei 600 Watt in der Mikrowelle inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte eine 15 Minuten lange Inkubation in Wasserstoffperoxid (0.6 %) bei Raumtemperatur, nach erneutem Waschen in PBS dann eine einstündige Inkubation in 10 % FCS, ebenfalls bei Raumtemperatur. Es folgten nochmals zwei Waschschritte in PBS und schließlich die Inkubation mit dem polyklonalen anti-Fas-Antikörper (Verdünnung 1 : 2.000) über Nacht bei 4 °C. Die Schnitte wurden dann erneut zweimal in PBS gewaschen und mit dem Spezies-spezifischen und Peroxidase-gekoppeltem, sekundären Antikörper (Verdünnung 1 : 200) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte, die als Negativkontrollen dienen, wurden lediglich mit dem sekundären Antikörper inkubiert, um positive Ergebnisse von unspezifischen Proteinbindungen oder anderen unerwünschten Phänomenen zu unterscheiden. Es folgte erneutes zweimaliges Waschen in PBS, die Behandlung mit dem ABC-Kit und die Färbung mit 0.05 % Diaminobenzidin-Wasserstoffperoxid-Lösung. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte nach dem Waschen mit destilliertem Wasser mit Mayers Hämalaun für 30 Sekunden, danach erneutes waschen. Die Ausdifferenzierung der Schnitte geschah mit Hilfe von 0.09 % HCl (v/v in 70 %

Ethanol). Nach einem letzten Waschgang folgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und das Einbetten der Schnitte mit Permout Mounting Medium. Die Schnitte konnten nun mit einem Lichtmikroskop ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert werden.

3.3.2 Fluoro-Jade-B-Färbung

Fluoro-Jade-B, ein anionisches saures Fluorescein-Derivat, bindet spezifisch an degenerierende Neurone⁹⁶. Nekrotische und apoptotische Nervenzellen, eine Unterscheidung zwischen diesen beiden ist mit der Färbung nicht möglich, erscheinen heller als ihre nicht-degenerierenden Nachbarzellen.

Das in die Paraffinblöcke gebettete Gewebe wurde am Mikrotom in 10 µm dicke Scheiben geschnitten und diese auf Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Entparaffinisierung der Schnitte (Tab. 3.2) und eine Inkubation derselben für 15 Minuten in 0.06 %-iger Kaliumpermanganatlösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach zwei Waschstufen in ddH₂O wurden die Schnitte für 20 Minuten in Fluoro-Jade-B-Lösung unter lichtundurchlässiger Abdeckung inkubiert. Nach erneutem Spülen in ddH₂O wurden die Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und nachfolgend mit D.P.X. nicht-fluoreszierendem Mounting-Medium eingebettet.

3.3.3 Stereologisch-optische Dissektionsmethode

Zur Beurteilung des Ausmaßes der Apoptose nach Hyperoxie bzw. Normoxie und zur genauen Quantifizierung der degenerierten Zellen wurde die stereologische Dissektionsmethode verwendet (*unbiased stereological dissector method*)⁹⁷. Dabei wird die eigentlich auszuzählende Region in zufällig ausgewählte Untereinheiten geteilt, diese werden mit Hilfe eines fixen Zählrahmens ausgezählt. Dieser Zählrahmen mit einer Größe von 0.05 x 0.05 mm begrenzt die Ausdehnung der auszuzählenden Untereinheit in zwei Dimensionen, die Dicke der Schnitte begrenzt das Areal in der dritten Dimension.

Anhand der Größe des Zählrasters, der Schnittdicke, des Vergrößerungsfaktors bei der Betrachtung der Schnitte und der Anzahl der degenerierten Zellen innerhalb des Rasters konnte wie folgt die Anzahl der untergegangenen Zellen in einem Kubikmillimeter Gewebe (numerische Dichte) berechnet werden:

$$k = 1 \text{ mm} / N$$

$$V = k^2 \times d$$

$$D = n / V$$

k = Kantenlänge des Zählrasters [mm]

N = Vergrößerungsfaktor des Mikroskops

V = Volumen des zu zählenden Gewebeabschnitts [mm³]

d = Schnittdicke [mm]

D = Dichte [n / mm³]

n = Anzahl degenerierter Zellen

Bei den mit Fluoro-Jade-B gefärbten Schnitten der Mäuse wurden aufgrund der geringen Größe des Gehirns keine Apoptosewerte für einzelne Regionen ausgezählt und berechnet, sondern jeweils für eine Hemisphäre als ganzes. Die Auswertung der Schnitte erfolgte dabei mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops bei blauem Licht mit einer Extinktion von 450 - 490 nm und einer Emission von 515 - 565 nm. Degenerierte Zellen (positiv gefärbt) erschienen dabei als hellgrün leuchtende Zellen vor einem dunklen Hintergrund. Die Schnitte selbst wurden bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt.

3.3.4 Statistische Auswertung der histologischen Versuche

Die Auszählung der Schnitte erfolgte geblindet. Das Ergebnis wurde als numerischer Dichtewert (degenerierte Neurone pro Kubikmillimeter Gewebe) angegeben. Aus den Werten der einzelnen Tiere wurde dann der Gesamtwert pro Gruppe berechnet. Für die Darstellung der Abweichung der Mittelwerte zwischen den Versuchsgruppen wurden der Standardfehler und die Standardabweichung berechnet. Entsprechend dem *Student's t-Test* wurden unter zu Hilfenahme der Software GraphPad Prism 4.0 die Werte auf Signifikanz geprüft, um signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen darstellen zu können.

3.4 Untersuchung der Genexpression

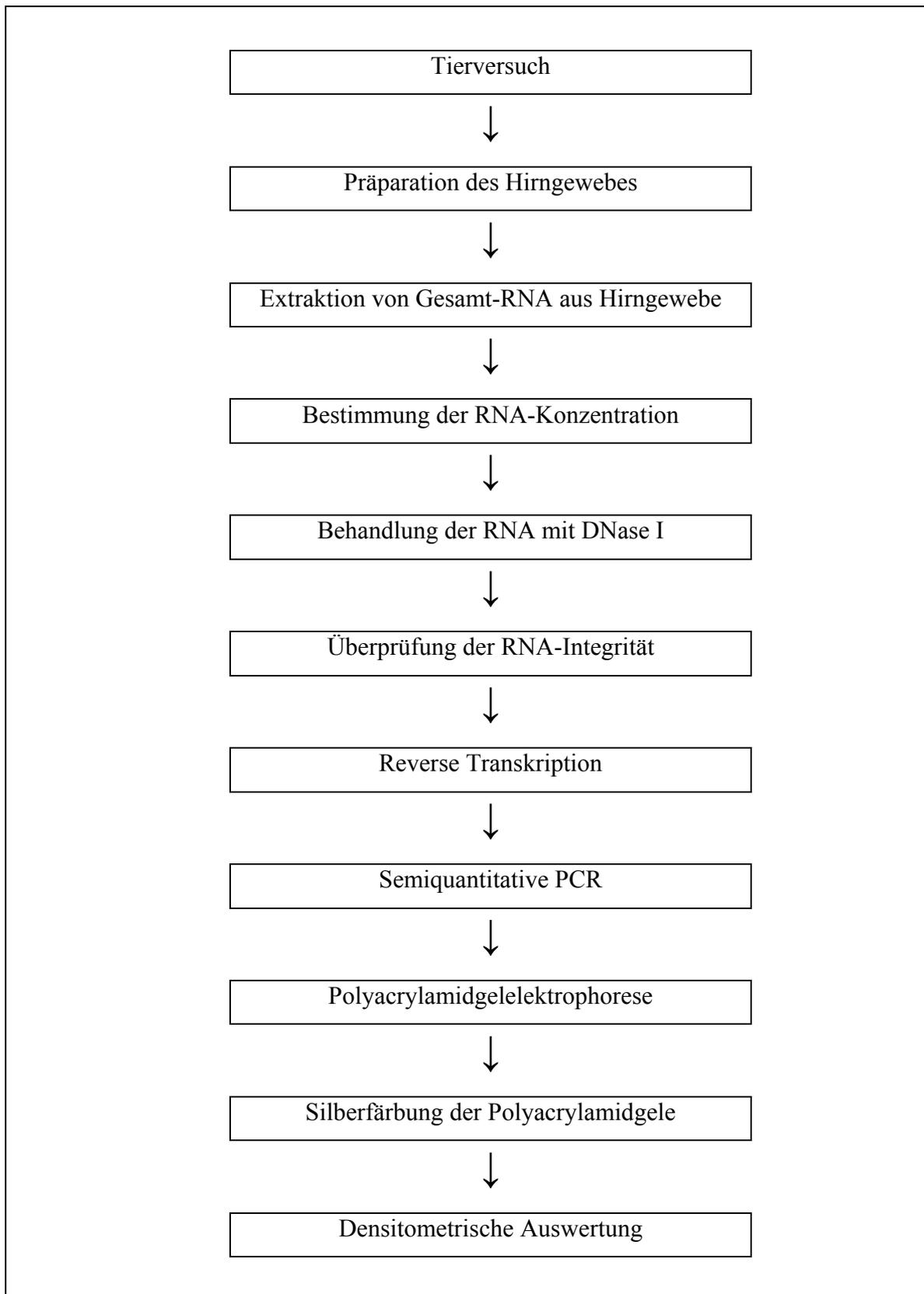


Abb. 3.2 Flussdiagramm zur Darstellung der Untersuchung der Genexpression

3.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Hirngewebe

Die Isolierung der RNA wurde gemäß der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode durchgeführt⁹⁸. Zunächst wurden zwischen 20 und 50 mg des tiefgefrorenen Gewebes je einer Hirnregion in 0.5 ml peqGold RNAPure™ verdünnt, homogenisiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden zu den Ansätzen 100 µl Chloroform zugegeben und die Probe nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 12.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Gefäß überführt und es wurden 250 µl Isopropanol zugefügt. Durch erneute Zentrifugation der Ansätze mit 12.000 Upm für 10 Minuten bei 4 °C wurde die RNA sedimentiert. Die Präzipitate wurden zweimalig in eiskaltem 75 %-igen Ethanol gewaschen, dann für 30 Minuten luftgetrocknet und in 60 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNAs wurde durch Messung eines Aliquots bei 260 und 280 nm im UV-Spektrometer überprüft. Die weitere Lagerung der extrahierten RNAs erfolgte bei -80 °C.

3.4.3 Behandlung der RNA mit DNase I

Um sicherzustellen, dass die gemäß Abschnitt 3.4.1 gewonnenen Proben keine DNA mehr enthielten, wurden die Proben einer Behandlung mit DNase I unterzogen. Hierzu wurde ein Ansatz (Tab. 3.3) vorbereitet, welcher nach Fertigstellung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Nun erfolgte die Zugabe von einem Volumen Roti®-Phenol/Chloroform-Lösung zu dem Ansatz und Zentrifugation des Gemischs mit 14.000 Upm für 2 Minuten bei Raumtemperatur, wonach die wässrige Oberphase in ein neues Gefäß pipettiert wurde. Hierzu wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2), 0.5 µl Glykogen (20 mg/ml) und ein dreifaches Volumen an 96 %-igen Ethanol gegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Sedimentation der gefällten RNA durch Zentrifugation mit 12.000 Upm für 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde diese zweimalig in eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen und 30 Minuten lang luftgetrocknet. Das RNA-Sediment wurde sodann in 35 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Zur erneuten Überprüfung

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Gesamt-RNA	x μ l	1 μ g
DNase I (10 U/ μ l)	2 μ l	0.8 U/ μ l
5x Reaktions-Puffer	5 μ l	1x
ddH ₂ O	ad 25 μ l	-
Gesamt	25 μ l	-

Tab. 3.3 Ansatz zur DNase I-Behandlung

der RNA-Konzentration nach DNase I Behandlung und zur Sicherstellung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese wurden zwei Aliquote bereitgestellt. Die Lagerung der eigentlichen Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

3.4.4 Überprüfung der RNA-Integrität

Die in einem nicht denaturierenden, horizontalen Agarosegel erfolgte gelelektrophoretische Auftrennung eines Aliquots der erhaltenen RNAs erlaubt eine Überprüfung der Integrität der ribosomalen RNA. Zur Herstellung des Gels wurden 0.8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (pH 7.7) in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend in eine Kammer gegossen. Sodann wurden 250 ng des RNA-Aliquots mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 9 μ l verdünnt und 1 μ l Auftragspuffer A hinzugefügt. Kurz vor dem Auftragen der Proben auf das Agarosegel wurden diese zur Aufhebung der Sekundärstrukturen für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis gelagert. Die Auftrennung im Gel erfolge anschließend in 1x TAE-Puffer (pH 7.7) für 60 Minuten bei 10 V/cm. Durch die Färbung der Gele für 20 Minuten in 0.0001%-iger Ethidiumbromidlösung konnte die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert werden.

3.4.5 Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription wird die zu untersuchende RNA-Matrize durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in eine cDNA umgeschrieben, die dann in der folgenden Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe auch Kap. 3.4.6) mit Hilfe der Taq DNA Polymerase amplifiziert werden kann. Für die Reverse Transkription wurde das Enzym *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)-Reverse Transkriptase* verwendet.

Der folgende Probenansatz (Tab. 3.4) wurde hergestellt, für 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis gelagert.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNase I behandelte RNA	x µl	500 ng
50 µM Oligo(dT) ₁₅ Primer	1 µl	1.4 µM
ddH ₂ O	ad 25.4 µl	-
Gesamt	25.4 µl	-

Tab. 3.4 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Sodann wurden jeder Probe 9.6 µl des Master Mix (Tab. 3.5) zugefügt und das Ergebnis für 60 Minuten bei 42 °C im Thermocycler inkubiert.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 mM dNTPs	1.1 µl	0.3 mM
RNasin (40 U/µl)	0.5 µl	20 U
M-MLV RT (200 U/µl)	1.0 µl	200 U
5x Reaktions-Puffer	7.0 µl	1 x
Gesamt	9.6 µl	-

Tab. 3.5 Master Mix der Reversen Transkription

Nach Abschluss der Inkubation im Thermocycler wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 5 Minuten inaktiviert und die Proben für mindestens 5 Minuten auf Eis gelagert, bis sich mit der PCR direkt der nächste Schritt anschloss.

3.4.6 Semiquantitative PCR

Zur Quantifizierung der Expression einer spezifischen mRNA (bzw. dem cDNA-Äquivalent) wurde die semiquantitative PCR mit endogener, interner Standardisierung verwendet. Dabei erfolgte eine Coamplifikation eines sogenannten Housekeeping-Gens, welches immer und in jeder Zelle in gleichem Maße vorhanden ist, zusätzlich zu dem zu untersuchenden Gen. Als interner Standard wurde β -Aktin herangezogen. Zur Verhinderung unspezifischer Primeranlagerungen und Primeroligomerisierungen und zur Steigerung der Effektivität, Präzision und Spezifität der Amplifizierung wurde die Heißstart-Methode („hot start“) verwendet. Die Abschnitte der PCR selbst sind wie folgt: Denaturierung der Matritze, Hybridisierung der Primer mit der Matritze, die im Einzelstrang vorliegt („Annealing“) und

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 Minuten	94 °C	1
Zyklische Denaturierung	30 Sekunden	94 °C	primerspezifisch
Primerannealing	45 Sekunden	primerspezifisch	
Primerextension	45 Sekunden	72 °C	
Finale Elongation	7 Minuten	72 °C	1

Tab. 3.6 Allgemeines Verlaufsschema der PCR

Fas (30 Zyklen, 55 °C Annealingtemperatur)		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1.0 μ l	14.3 ng
10x Taq DNA Polymerase Puffer	5.0 μ l	1x
2 mM dNTPs	5 μ l	0.20 mM
10 μ M sense Primer (Fas)	2.5 μ l	0.50 μ M
10 μ M antisense Primer (Fas)	2.5 μ l	0.50 μ M
2 μ M sense Primer (β -Aktin)	1 μ l	0.04 μ M
2 μ M antisense Primer (β -Aktin)	1 μ l	0.04 μ M
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.3 μ l	1.5 U
ddH ₂ O	31.7 μ l	-
Gesamt	50.0 μ l	

Tab. 3.7 PCR-Ansatz für Fas-Rezeptor

Fas-Ligand (32 Zyklen, 58 °C Annealingtemperatur)		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1.0 µl	14.3 ng
10x Taq DNA Polymerase Puffer	5.0 µl	1x
2 mM dNTPs	5 µl	0.20 mM
10 µM sense Primer (Fas-Ligand)	2.5 µl	0.50 µM
10 µM antisense Primer (Fas-Ligand)	2.5 µl	0.50 µM
2 µM sense Primer (β-Aktin)	1 µl	0.04 µM
2 µM antisense Primer (β-Aktin)	1 µl	0.04 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.3 µl	1.5 U
ddH ₂ O	31.7 µl	-
Gesamt	50.0 µl	

Tab. 3.8 PCR-Ansatz für Fas-Ligand

Verlängerung (Elongation) der Primer mit der Taq-Polymerase („Extension“). Während der Temperatur- und Zeitverlauf der PCR nach einem festen Protokoll stattfand (Tab. 3.6), variierte die Primerannealing-Temperatur und die Zyklenzahl in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Gen (Tab. 3.7 und 3.8). Zuerst wurde ein PCR-Master Mix auf Eis vorbereitet, welcher in 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert wurde und folgende Komponenten enthielt: 10x Taq DNA Polymerase-Puffer, Taq DNA Polymerase, dNTPs, Primer (Tab. 3.9) und ddH₂O. Zu den PCR-Ansätzen wurde dann die cDNA gegeben und die PCR bei einer erreichten Temperatur von 94 °C im Thermocycler gestartet.

Gen / Primer	Primersequenz 5'-3'	Primer-Start	Genbank-Nummer
Fas / sense	5'-CCGACAACAACCTGCTCAGA-3'	174 nt	
Fas / antisense	5'-GCACCTGCACTTGGTATTC-3'	430 nt	D26112
Fas-Ligand / sense	5'-GAGAGGAGGAAACCCTTTCCTGG-3'	40 nt	
Fas-Ligand / antisense	5'-CTCCAGAGATCAAAGCAGTTCCA -3'	562 nt	NM_012908
β-Aktin / sense	5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3'	1663 nt	
β-Aktin / antisense	5'-GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG-3'	2559 nt	V01217

Tab. 3.9 Eingesetzte Primer

3.4.7 Polyacrylamidgelelektrophorese

Da Polyacrylamidgele eine feinere Auftrennung der kleinen Nukleinsäurefragmente ermöglichen, als dies bei Agarosegelen der Fall ist, wurden erstere in Form von 1 mm dicken horizontalen Gelen verwendet, die wie folgt hergestellt wurden: Alle verwendeten Glasplatten wurden zuerst mit Ethanol gereinigt, die Spacerplatte wurde dann mit einigen Tropfen Silanlösung benetzt und der Spacer aufgesetzt. Auf die andere Glasplatte wurde nach befeuchten mit einigen Tropfen ddH₂O eine Gelfilmträgerfolie luftblasenfrei aufgebracht. Beide Platten wurden mit Hilfe von Metallklammern zusammengehalten und in den Spalt zwischen Spacerplatte und Gelfilmträgerfolie wurde die vorbereitete Gellösung (Tab. 3.10) gegeben, welche nach 45 Minuten auspolymerisierte.

Komponente	Volumen
5 % PAGE-Lösung	50 ml
TEMED	45 µl
30 % APS	100 µl

Tab. 3.10 Polyacrylamid-Gellösung

Die Elektrophorese mit dem auspolymerisierten Gel erfolgte in einem TGGE-Elektrophorese-system mit zwei Pufferreservoirs und einer horizontalen Kühlplatte, welche die Temperatur konstant auf 15 °C regulierte. Auf die Kühlplatte wurde 0.1 %-ige Tritonlösung gegeben und sodann das auf der Gelfilmträgerfolie befindliche Polyacrylamidgel aufgelegt. Zur Gewährleistung der elektrischen Leitung zwischen den Pufferreservoirs und dem Gel wurden puffergetränkte Baumwolltücher verwendet, als Verdunstungsschutz wurde zudem eine Glasplatte über das System gesetzt. Nun erfolgte eine Präelektrophorese bei 10 Watt für 10 Minuten.

Nach dem Ende der PCR wurden zur Analyse des PCR-Produktes 9 µl jedes Ansatzes mit 1 µl Auftragspuffer P versetzt, das Produkt für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis gelagert. Nach der Präelektrophorese wurden nun 5 µl jedes Ansatzes in je eine Geltasche pipettiert, in eine weitere freie Geltasche wurde ein Molekulargewichtsstandard (Tab. 3.11) gegeben, um eine Größenabschätzung der PCR-Produkte zu ermöglichen.

Nach dem Auftragen aller Ansätze wurde das System wieder mit der Glasplatte abgedeckt und eine Elektrophorese unter den Bedingungen der Präelektrophorese (s.o) gestartet, wobei die

Komponente	Volumen
20 ng/μl phiX174 DNA/Hae III	5 μl
Auftragspuffer P	5 μl
Gesamt	10 μl

Tab. 3.11 Molekulargewichtsstandard für Polyacrylamidgel

Leistung nach 15 Minuten jedoch auf 35 Watt erhöht und diese für weitere 60 - 80 Minuten beibehalten wurde.

3.4.8 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Da sich durch ein verändertes Redoxpotenzial der Nukleinsäuren elementares Silber abscheidet, ist eine Silberfärbung der Polyacrylamidgele eine der sensitivsten Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren mit einer Nachweisgrenze von 0.03 ng/mm² ⁹⁹.

Nach dem Ende der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel aus dem System entnommen und in einer Plastikschiene einer Silberfärbung nach dem folgenden Schema unterzogen (Tab. 3.12).

Komponente	Inkubationsdauer
dH ₂ O	3 x 2 Minuten
2 % Salpetersäure	3 Minuten
dH ₂ O	2 x 2 Minuten
Färbelösung A	20 Minuten
dH ₂ O	3 x 2 Minuten
Färbelösung B	2 x 3 Minuten
dH ₂ O	3 x 2 Minuten
1 % Essigsäure	3 Minuten
dH ₂ O	2 x 2 Minuten
2 % Glycerol	5 Minuten

Tab. 3.12 Schema der Silberfärbung

Mit einem weichen, dH₂O-getränkten Schwamm wurden überschüssige Silberniederschläge vorsichtig von dem Gel entfernt, das Gel anschließend für 30 Minuten bei 70 °C getrocknet und die Banden densitometrisch ausgewertet.

3.4.9 Densitometrische Auswertung

Die Banden wurden mittels einer Digitalkamera unter UV-Licht fotografiert und auf einem Computer mit dem Programm BioDocAnalyze 2.0 densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse der Auswertung der Banden des Housekeeping-Gens wurden dann zur Normalisierung der Ziel-RNA bzw. -cDNA herangezogen. Diese erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Excel. Zur statistischen Auswertung der so berechneten Nukleinsäurekonzentrationen bzw. derer möglicher Unterschiede zueinander wurde eine Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) durchgeführt. Bei signifikanten Mittelwertabweichungen erfolgte der statistische Vergleich einzelner Gruppen zueinander mit Hilfe des *Tukey-Kramer post-hoc* Tests. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 4.0.

3.5 Untersuchung der Proteinexpression

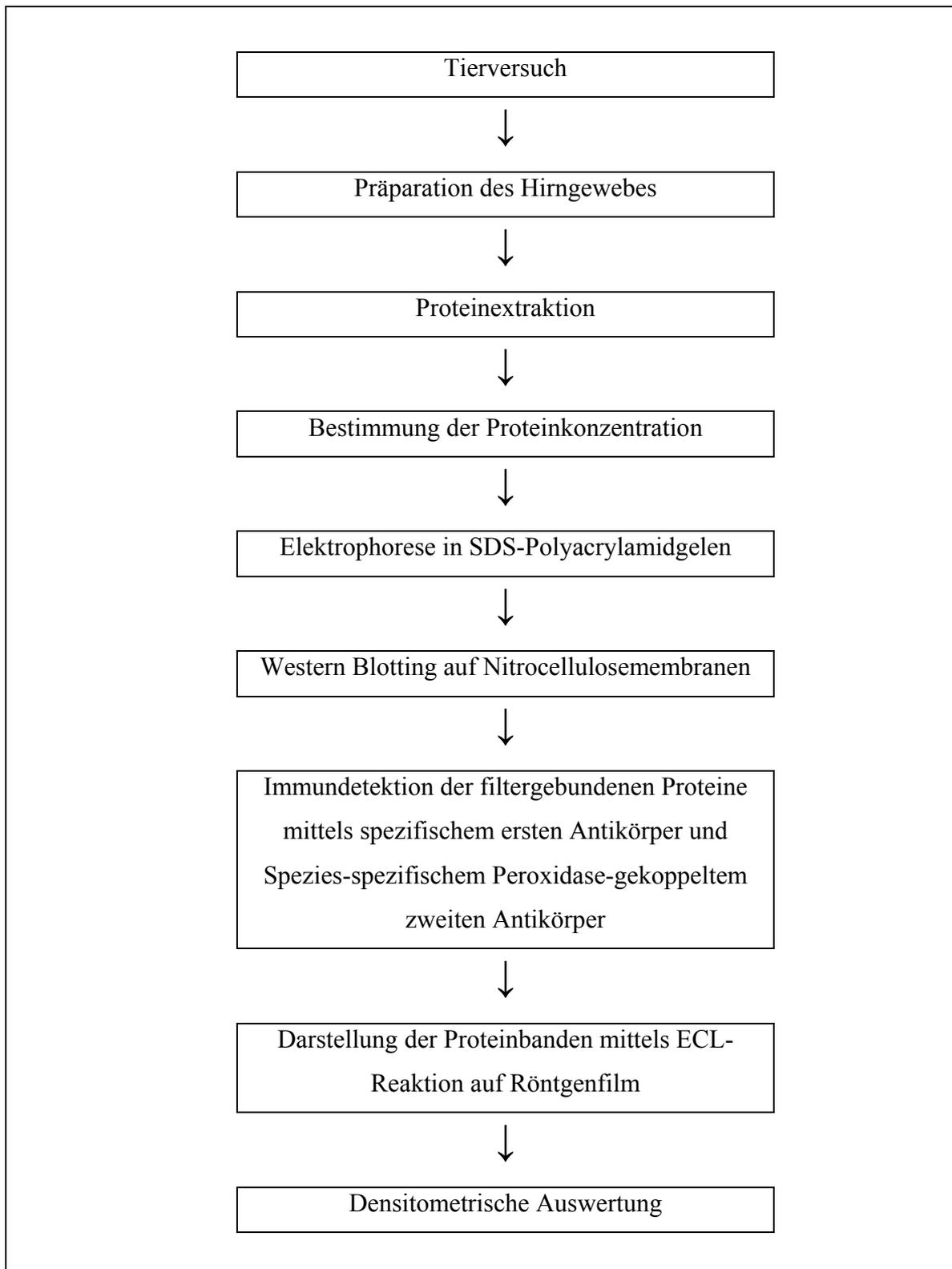


Abb. 3.3 Flussdiagramm zur Darstellung der Untersuchung der Proteinexpression

3.5.1 Proteinextraktion

Das Gehirngewebe wurde in ein Glasröhrchen überführt, dazu wurden 300 µl RIPA-Puffer gegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Röhrchens bei 4 °C in Richtung eines Homogenisierungsstabes wurde das Gewebe homogenisiert. Das Homogenat wurde nun für 10 Minuten mit 3.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die mitochondriale und die zytosolische Proteinfraction enthielt, wurde erneut für 20 Minuten mit 17.000 g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand der zweiten Zentrifugation enthielt dann die zytosolische Fraction, die in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Die Sedimente der ersten und zweiten Zentrifugation, die die nukleäre bzw. mitochondriale Proteinfraction enthielten, wurden mit 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert, wobei nur die zytosolischen Fractionen weiter verwendet wurden.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels eines BCA-Protein-Assays. Als Standard wurde eine mit PBS verdünnte BSA-Proteinstandardreihe mit den Konzentrationen 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml und 0.6 mg/ml verwendet. Je 20 µl jedes Standards und jeder zytosolischen Probe wurden vierfach bzw. dreifach auf eine 96-Loch-Platte pipettiert, zu allen Proben wurde 150 µl BCA-Reagenz gegeben. Die gesamte Platte wurde zum Vermischen der aufgetragenen Standards bzw. Proben mit dem BCA-Reagenz in einem Plattenreader geschüttelt, es folgte die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Absorption der Ansätze bei 570 nm in einem Mikroplattenreader gemessen (Leerwert: PBS ± BCA-Reagenz) und anhand der BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration der zytosolischen Fractionen bestimmt.

3.5.3 Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen

Zwischen zwei Glasplatten, in einem Mini-Protean System eingespannt, wurde bis 2.5 cm unterhalb der oberen Kante ein 12.5 %-iges Trenngel gegossen. Direkt nach dem Einfüllen des Trenngels wurde eine 5 mm hohe Schicht 50 %-iges Isopropanol obenauf gegeben. Nach 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und das auspolymerisierte Trenngel mit einem 4.5

%-igen Sammelgel überschichtet. Unmittelbar nach Eingießen des Sammelgels wurde ein Probenkamm für zehn Taschen in die Sammelgelschicht gesetzt. Nach weiteren 30 Minuten war das Sammelgel auspolymerisiert. Zwei Polyacrylamidgele wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Probenkämme entfernt. Die vorbereiteten Probenansätze (Tab. 3.13) kamen zur Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten in einen Thermomixer, wurden anschließend auf Eis gekühlt und mit einer Pipette in die Geltaschen überführt.

Bestandteil	Volumen
20 µg Protein	x µl
Laemmli-Puffer	10 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 3.13 Proben für die Gelelektrophorese

Als Molekulargewichtsmarker wurden auf jedes Gel in je eine Geltasche sichtbarer Proteinmarker bzw. biotinylierter Proteinmarker pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zuerst bei 100 V und 30 mA, bis das deutlich sichtbare Bromphenolblau des Laemmli-Puffers die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel nach etwa 30 Minuten erreichte, danach bei 160 V und 30 mA, bis sich der Farbstoff nach circa 90 Minuten knapp 1 cm oberhalb des Gelrandes befand. Nach Abschluss der Proteinauftrennung mittels Elektrophorese wurde die Trenngelschicht für den weiteren Gebrauch vorsichtig von den Glasplatten gelöst und die Sammelgelschicht entfernt.

3.5.4 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Die Proteine der Trenngelschicht wurden mittels des Semidry-Blotverfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die von den Glasplatten entfernten Gele wurden zunächst für 20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, die Filterpapiere sowie die Membran sodann kurz mit Transferpuffer benetzt. Das erste feuchte Filterpapier wurde auf die Anode des Blot-Systems gelegt, darauf kam die ebenfalls feuchte Nitrocellulosemembran, ebenfalls mit Transferpuffer benetzt. Nun folgte das luftblasenfrei aufgelegte Trenngel und daraufhin das zweite feuchte Filterpapier. Das Schliessen des Blot-Systems erfolgte durch Auflegen einer Edelstahlplatte

(Kathode). Der Transfer wurde für 45 Minuten bei 400 mA und 25 V vollzogen. Nach anschließendem Waschen der Membran in ddH₂O erfolgte die Kontrolle des Proteintransfers durch Darstellung der Proteinbanden mittels Anfärbung mit Ponceau S-Rot. Durch zweimaliges Abspülen mit ddH₂O und dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in TBS/T wurden die Membranen wieder entfärbt.

3.5.5 Immundetektion filtergebundener Proteine

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungen wurden die Membranen für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5 %-iger Magermilchlösung inkubiert und danach viermal je 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Zur Bestimmung der Proteine erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4 °C in mit TBS/T im jeweiligen Verhältnis verdünnten primärem Antikörper (Tab. 3.14).

Zielprotein	Verwendeter primärer AK	Verdünnung	Herkunft
Caspase-3	polyklonaler Caspase-3 (gespaltene Form) Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
Caspase-8	polyklonaler Caspase-8 Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
Caspase-9	polyklonaler Caspase-9 Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
FADD	polyklonaler FADD Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
Fas	polyklonaler Fas Antikörper	1 : 2.000	Kaninchen
Fas-Ligand	polyklonaler Fas-Ligand Antikörper	1 : 200	Kaninchen
FLIP	polyklonaler FLIP Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
JNK	polyklonaler SAPK/JNK Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
p-JNK	polyklonaler phospho-SAPK/JNK Antikörper	1 : 1.000	Kaninchen
β-Aktin	monoklonaler β-Aktin Antikörper	1 : 5.000	Maus

Tab. 3.14 Verwendete primäre Antikörper

Dazu wurden Glasgefäße mit einem Volumen von 15 ml verwendet. Nach Abschluss der Inkubationszeit und viermaligem Waschen der Membranen für je 5 Minuten in TBS/T erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur die Inkubation in einem neuen Glasgefäß mit dem jeweiligen Spezies-spezifischen und Peroxidase-gekoppelten, sekundärem Antikörper, verdünnt

in TBS/T (Tab. 3.15). Zusätzlich wurden 5 µl eines HRP-konjugierten Anti-Biotin Antikörpers zugegeben.

Zielspezies	Verwendeter sekundärer AK	Verdünnung	Herkunft
Kaninchen	polyklonaler anti-Kaninchen IgG-HRP Antikörper	1.000	Ziege
Maus	polyklonaler anti-Maus Ig/HRP Antikörper	10.000	Kaninchen

Tab. 3.15 Verwendete sekundäre Antikörper

Jede Membran wurde erneut viermal in TBS/T gewaschen und anschließend mit 2 ml kurz zuvor gemischter ECL Detektionsreagenz I und II im Verhältnis 1 : 1 benetzt. Nach einminütiger Reaktionsdauer im Dunkeln wurde das Gemisch entfernt und die Membran in Plastikfolie gewickelt. Der Transport der Membranen erfolgte in einer Filmkassette, in einer Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm auf die Membranen gelegt und dort während der Expositionszeit (je nach nachzuweisendem Protein zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten) belassen. Direkt danach wurde der Röntgenfilm in einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

Um die Membranen nochmals zu verwenden, wurden sie von der Folie entfernt und zweimal je 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Danach erfolgte die Entfernung der an die Membran gebundenen Antikörper durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Strippingpuffer („stripping“). Zur Normierung der Proteinwerte erfolgte nun die Immundetektion des Standardproteins β -Aktin nach oben beschriebenem Schema: Die erneute Blockierung mit 5 %-iger Magermilch und die Inkubation mit primärem anti- β -Aktin- (Tab. 3.14) bzw. sekundärem anti-Maus- (Tab. 3.15) Antikörper, verdünnt in TBS/T. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug hier zwischen einer und drei Minuten.

3.5.6 Densitometrische Auswertung

Die entwickelten Filme wurden mittels Digitalkamera im Gegenlicht auf einem Weißlichttisch abfotografiert und am Computer mit dem Programm BioDocAnalyze 2.0 densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse der Auswertung des Proteins β -Aktin dienten der Normalisierung der Zielproteine. Diese erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Excel, zur statistischen Auswertung wurde eine Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit nachfolgendem *Tukey-Kramer post-hoc* Test mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt (s.a. Kap. 3.4.9).

3.6 Zellkultur

PC12-Zellen, isoliert aus Phäochromozytomen der Ratte, sind ein lange bekanntes und etabliertes Model zur *in vitro* Untersuchung von neurochemischen und neurotoxischen Prozessen sowie der neuronalen Differenzierung. Durch Behandlung mit *nerve growth factor* (NGF) endet die Proliferationsphase der Zellen, sie differenzieren sich und bilden ein charakteristisches, neuritenartiges Netzwerk aus¹⁰⁰. In diversen Schädigungsmodellen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression des Proteins JNK bzw. dessen verstärkter Phosphorylierung und Apoptose von PC12-Zellen gezeigt werden^{101, 102}, ebenso im Rahmen der physiologischen Apoptose in bestimmten Regionen des sich entwickelnden Gehirns¹⁰³. JNK ist auch für die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen und die Ausbildung von Mikrotubuli im Gehirn unabdingbar^{104, 105}. Auch unter hyperoxischen Bedingungen bei einem Sauerstoffgehalt von 50 % konnte eine neuronale Differenzierung von PC12-Zellen, morphologisch ähnlich der nach NGF-Applikation, beobachtet werden¹⁰⁶. PC12-Zellen eignen sich somit zur Untersuchung, welche Rolle das Protein JNK unter Hyperoxie in der Apoptose und Differenzierung innehat.

3.6.1 Kultivierung

Phäochromozytom-Zellen aus Ratten, eingefroren bei -80 °C in flüssigem Stickstoff, wurden auf Zimmertemperatur erwärmt und in Zellkulturflaschen überführt. Dort wuchsen die Zellen im Medium (Tab. 3.16) bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ für maximal vier Wochen.

Bestandteil	Volumen
DMEM/HAM's F-12	500 ml
HS	75 ml
FCS	12.5 ml
L-Glutamin	5 ml
Gesamt	592.5 ml

Tab. 3.16 Zellkulturmedium für PC12-Zellen

Während der Kultivierungszeit wurde mehrmals je ein Teil der Zellen für die nachfolgenden Versuchsabschnitte entnommen.

3.6.2 Fixierung

Um die Differenzierung in Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen (Normoxie, Behandlung mit NGF, Hyperoxie) zu untersuchen, wurden die Vertiefungen von 6-Loch-Platten zur Adhärenz der Zellen mit 0.5 ml einer Kollagenlösung befüllt, welche 30 Minuten einwirken konnte. Danach wurde der Überstand abgesaugt, reduziertes Medium (Tab. 3.17) hinzugegeben und je 50.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät, die 6-Loch-Platten wurden dann für 48 Stunden bei 37 °C im Inkubationsschrank belassen.

Bestandteil	Volumen
RPMI 16400	500 ml
HS	2.5 ml
FCS	1.25 ml
Glucose 40 %	3 ml
Gesamt	506.75 ml

Tab. 3.17 Reduziertes Zellkulturmedium für PC12-Zellen

3.6.3 Inkubation

Nach der Fixierung wurden die kollagenbeschichteten Vertiefungen der 6-Loch-Platten mit PBS gewaschen und nach folgendem Schema (Tab 3.18) befüllt.

Ansatz	1	2	3	4	5
Medium	+	+	+	+	+
NGF		50 ng	50 ng		
DMSO		2 µl		2 µl	
SP600125			20 µM		20 µM
O ₂ -Atmosphäre	21 %	21 %	21 %	50 %	50 %

Tab. 3.18 Versuchsaufbau

Dabei wurde ein Ansatz [1] lediglich mit Medium befüllt und in Normoxie belassen, ein weiterer Ansatz [2] enthielt neben dem Medium die eine Differenzierung auslösende Dosierung von NGF

und eine Konzentration von DMSO, dem Vehikel des JNK-Inhibitors SP600125, die der Konzentration entspricht, die nach Zugabe einer inhibitorisch wirksamen Konzentration von SP600125 im Medium entsteht. Auch dieser Ansatz wurde in Normoxie belassen¹⁰⁷. Ein weiterer, unter normoxischen Verhältnissen gehaltener Ansatz [3] enthielt neben dem Medium und NGF auch den JNK-Inhibitor SP600125 in inhibitorisch wirksamer Konzentration. Als Kontrolle eines möglichen hyperoxischen Einflusses auf die PC12-Zellen enthielt ein weiterer Ansatz [4] neben dem Medium lediglich DMSO, ein letzter Ansatz [5] enthielt das Medium und SP600125 - die Ansätze [4] und [5] wurden in einer Atmosphäre mit einer Sauerstoffkonzentration in Höhe von 50 % inkubiert.

3.6.4 Morphologische Auswertung

Zur morphologischen Begutachtung der PC12-Zellen, wurden erstmals nach 48 Stunden, danach alle 24 Stunden, sämtliche Ansätze unter einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und mit einer Digitalkamera bis zu einer maximalen Inkubationsdauer von vier Tagen fotografiert. Die Fotos wurden mit der Software Photostudio bearbeitet und im JPEG-Format abgespeichert.

3.7 Material

3.7.1 Versuchstiere

Bezeichnung	Bezugsquelle
B6.MRL-Fas(lpr)/J Mäuse	Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld
B6Smn.C3-FasL(gld)/J Mäuse	Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld
C57BL/6 Mäuse	Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld
Han Wistar Ratten	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin

3.7.2 Zellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
PC12 (Lot. 3330208)	LGC Promochem, Wesel

3.7.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid	Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK
Agarose	Qbiogene, Straßburg, Frankreich
APS	Serva, Heidelberg
BCA D _C Protein Assay Reagent I	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
BCA D _C Protein Assay Reagent II	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Bisacrylamid	Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK
Borsäure	Merck, Darmstadt

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D.P.X. Mounting-Medium	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM/HAM's F12	Biochrom, Berlin
DMSO	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
dNTPs	Promega, Mannheim
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Detektionsreagenz I	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
ECL Detektionsreagenz II	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	Biochrom, Berlin
Fluoro-Jade-B	Histo-Chem, Jefferson, USA
Formaldehyd 37 %	Riedel-de Haën, Schweiz
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	ICN Biochemicals, Aurora, USA
HCl	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HS	Biochrom, Berlin
Isopropanol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
Kollagen A	Biochrom, Berlin
Kollagen G	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt

Methanol	J. T. Baker, Deventer, Holland
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdeoxycholat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumphosphat (mono/dibasisch)	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NP40	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco, Paisley, UK
Permunt Mounting Medium	EMS, Fort Washington, USA
PMSF	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti®-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Salpetersäure 65 %	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
SP600125	Biomol, Plymouth Meeting, USA
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Serva, Heidelberg
Triton x-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRP801	Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Etienne Jacotot, Theraptosis, Paris, Frankreich
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Calbiochem, San Diego, USA

3.7.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acrylamid-Lösung	29 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) Bisacrylamid
Auftragspuffer A	0.1 % (w/v) Bromhenolblau, 10 mM EDTA (pH 8.0), 60 % (v/v) Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
Auftragspuffer P	0.1 % (w/v) Bromhenolblau, 10 mM EDTA (pH 8.0), 60 % (v/v) Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 % (w/v) Xylencyanol
DEPC-H ₂ O	0.1 % (v/v) DEPC in ddH ₂ O
Elektrophorese-Puffer (Westernblot)	0.25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
Färbelösung A	0.2 % (w/v) Silbernitrat
Färbelösung B	0.05 % (v/v) Formaldehyd, 0.28 mM Natriumcarbonat
FCS (10 %)	10 % (v/v) in PBS
Fluoro-Jade-B Arbeitslösung (0.001 %)	4 % (v/v) Fluoro-Jade-B Stammlösung, 0.096 % (v/v) Essigsäure
Fluoro-Jade-B Stammlösung	50 % (v/v) Fluoro-Jade-B
Kaliumpermanganatlösung	60 % (v/v) Kaliumpermanganat
Kollagenlösung	80 % (v/v) Kollagen G, 10 % (v/v) Kollagen A, 10 % (v/v) Zellkulturmedium (10x)

Laemmli-Puffer	0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 1 % (w/v) Bromphenolblau
Magermilchlösung	5 % (w/v) Magermilch in TBS/T
PAGE-Lösung (5 %)	0.5 % (w/v) Acrylamid, 5 % (v/v) Glycerin, 0.9 x TBE-Puffer
Paraformaldehydlösung (4 %)	2 Tabletten 20 M NaOH, 4 % (w/v) Paraformaldehyd, 1.9 % (w/v) monobasisches Natriumphosphat, 8.1 % (w/v) dibasisches Natriumphosphat
Phosphatpuffer (pH 7.5)	0.06 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.06 M Natriumpyrophosphat
Reaktions-Puffer	50 mM DTT, 0.375 M Kaliumchlorid, 15 mM Magnesiumchlorid, 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)
RIPA-Puffer	1 % (w/v) NP40, 0.5 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 0.1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natrium-Orthovanadat, 20 mM Natriumfluorid, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, PBS ad 100 ml

Sammelgellösung	25 % (v/v) Sammelgelpuffer (4 x), 0.1 % (w/v) SDS, 15 % (v/v) Acrylamid-Lösung, 0.04 % (w/v) APS, 0.02 % (v/v) TEMED
Sammelgelpuffer (4 x)	0.5 M Tris, 0.4 % SDS
Stripping-Puffer	50 % (v/v) 125 mM Tris-HCl (pH 6.7), 0.7 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS
TAE-Puffer (10 x, pH 7.7)	10 mM EDTA (pH 8.0), 2,3 % (v/v) Essigsäure, 0.5 M Tris
TBE-Puffer (10 x, pH 8.3)	1 M Borsäure, 20 mM EDTA, 1 M Tris
TBS (10 x)	10 % (v/v) Tris-HCl (pH 7.4), 8.8 % (w/v) Natriumchlorid
TBS/T	10 % (v/v) TBS (10x), 0.05 % (v/v) Tween-20
Transferpuffer	0.05 M Tris, 0.05 M Glycin, 0.37 g SDS, 200 % (v/v) MeOH
Trenngellösung	24 % (v/v) Trenngelpuffer (4x), 0.1 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Acrylamid-Lösung, 0.05 % (w/v) APS, 0.05 % (v/v) TEMED
Trenngelpuffer (4 x)	1.5 M Tris, 0.4 % SDS
Zitratpuffer (pH 6.0)	10 mM Citronensäure-Monohydrat

3.7.5 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABC-Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
peqGold RNAPure™	Peqlab, Erlangen
Taq Core Kit	Qbiogene, Straßburg, Frankreich

3.7.6 Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase I	Boehringer, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim

3.7.7 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Biotin Antibody HRP-gekoppelt	Cell Signaling, NEB, Frankfurt (# 7727)
monoklonaler β -Aktin Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim (# A5316)
polyklonaler anti-Maus Ig/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark (# P0260)
Antikörper	
polyklonaler Caspase-3 (gespaltene Form) Antikörper	Cell Signaling, NEB, Frankfurt (# 9661)
polyklonaler Caspase-8 Antikörper	Chemicon, Billerica, USA (# AB3641)
polyklonaler Caspase-9 Antikörper	Calbiochem, San Diego, USA (# 218794)
polyklonaler FADD Antikörper	Neomarkers, Fremont, USA (# RB-1683-P)
polyklonaler Fas Antikörper	Transduction Laboratories, San Jose, USA (# F22120)

polyklonaler Fas Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg (# sc-716)
polyklonaler Fas-Ligand Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg (# sc-834)
polyklonaler FLIP Antikörper	Chemicon, Billerica, USA (# AB16516)
polyklonaler IgG-HRP Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg (# sc-2004)
polyklonaler phospho-SAPK/JNK Antikörper	Cell Signaling, NEB, Frankfurt (# 9251)
polyklonaler SAPK/JNK Antikörper	Cell Signaling, NEB, Frankfurt (# 9252)

3.7.8 Oligonukleotide

Bezeichnung	Bezugsquelle
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
Oligonukleotide für PCR (Tab. 3.9)	Biochemisch-Technologisches Zentrum Berlin-Buch

3.7.9 Molekulargewichtsstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling, NEB, Frankfurt (# 7727)
phiX174 DNA/Hae III Marker	Promega, Mannheim
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA

3.7.10 Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Butterfly Injektionskanüle	B. Braun, Melsungen

Chirurgische Instrumente	EMS, Fort Washington, USA
Digitalkamera Canon PowerShot G6	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Dunkelhaube BDR 1	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Easypet	Eppendorf, Hamburg
Extra Thick Blot Paper, Mini Blot Size	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Glasplatten	Diagen, Hilden
Glasplatten Outer Glass Plate 3/1	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Glasröhrchen	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Glaswaren	Roth GmbH, Karlsruhe
Hyperkassette	Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK
Kimwipes Präzisionstücher	Kimberly-Clark, Mainz
Kodak X-Omat 5000 RA	Kodak GmbH, Stuttgart
Kodak X-Omat LS Film 13x18cm	Kodak GmbH, Stuttgart
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Kühlzentrifuge Laborfuge 400 R	Heraeus, Berlin
Mikroplattenreader	Perkin Elmer, Weiterstadt
Mikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Mini-Protean 3 Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Mini-Protean System	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Nitrocellulosemembran Hybond-ECL	Amersham Biosciences Ltd., Little Chalfont, UK
pH-Meter Portamess	Knick Messgeräte, Berlin
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen Falcon Pipets (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen, sonstige (< 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PowerPac	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Präzisionswaage BL 150	Sartorius, Göttingen
Rex-Leuchtplatte	Rex Meßinstrumente GmbH, Babenhausen
Safelock 2.0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät Unimax	Heidolph, Kelheim
Spacer	Diagen, Hilden
TGGE-Kammer für Polyacrylamidgele	Diagen, Hilden

Thermocycler Gene Amp PCR 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Semi-Dry System	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, USA
Transportinkubator T1500	MEDAP GmbH, Usingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

3.7.11 Software

Bezeichnung

Bezugsquelle

BioDocAnalyze 2.0	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Excel 9.0.2812	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Photo Studio 4.1.2c	ArcSoft Inc., Fremont, USA
Prism 4.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

4 Ergebnisse

4.1 Physiologische Parameter

Zwischen den Tieren, die der Hyperoxie (80 % Sauerstoff) ausgesetzt waren und den Kontrolltieren in Normoxie gab es keine Unterschiede im Körpergewicht. Es wurden keine körperlichen Beeinträchtigungen festgestellt und die Mortalität war in beiden Gruppe nicht erhöht.

4.2 Immunhistochemischer Nachweis von Fas

Bei der immunhistochemischen Auswertung werden spezifische und unspezifische Farbtensitäten unbekannter Proben verglichen und interpretiert. Die Intensität der Färbung ist dabei abhängig von der Menge des Antikörpers und proportional zur Menge des vorhandenen Antigens. Außerdem ergeben sich innerhalb einer Probe unterschiedliche Intensitäten, da nicht alle Zellen einer Probe die gleiche Menge Antigen enthalten.

Immunhistochemisch gelingt der Nachweis des Fas-Rezeptors in den untersuchten Regionen Cortex und Thalamus nach Normoxie ebenso wie nach 24 Stunden andauernder Hyperoxie.

4.3 Integrität der RNA

Mittels der Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung wurde die Unversehrtheit der aus dem Gewebe isolierten RNA überprüft. Durch Vorhandensein der ribosomalen Banden 18S und 28S konnte die Integrität der RNA gesichert werden (Abb. 4.1).

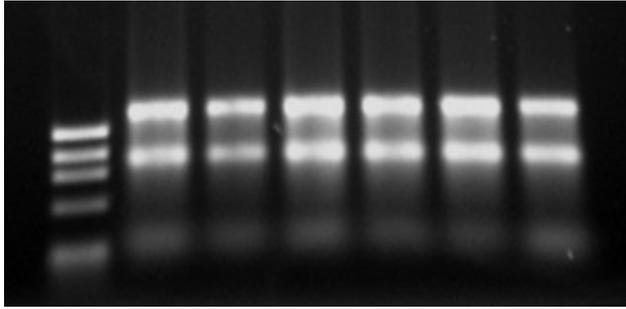


Abb. 4.1 Nachweis der Integrität der RNA

Die beiden hell leuchtenden, ribosomalen Banden 18S (unten) und 28S (oben) bestätigen die Integrität der RNA. Die linke Spur zeigt den Molekulargewichtsmarker, die weiteren Spuren enthalten RNA-Proben.

4.4 Fas mRNA- und Proteinexpression unter Hyperoxie

Der Einfluss von Hyperoxie in Höhe einer Konzentration von 80 % auf die mRNA von Fas wurde im Cortex und im Thalamus von 6 Tage alten Ratten untersucht, ebenso der Einfluss auf

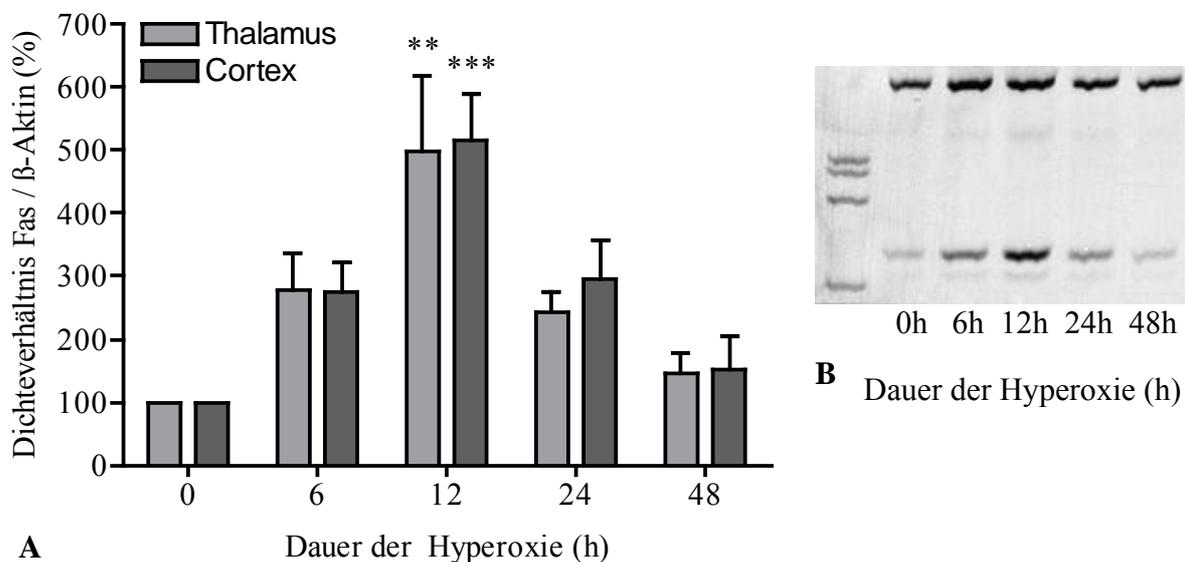


Abb. 4.2 Hyperoxie verstärkt die Expression von Fas mRNA

(A) Die densitometrische Auswertung der Fas mRNA in Cortex (n = 3 - 4 pro Zeiteinheit) und Thalamus (n = 5 pro Zeiteinheit) zeigt eine deutliche Erhöhung der Expression. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt den internen Standard β -Aktin, die untere Fas.

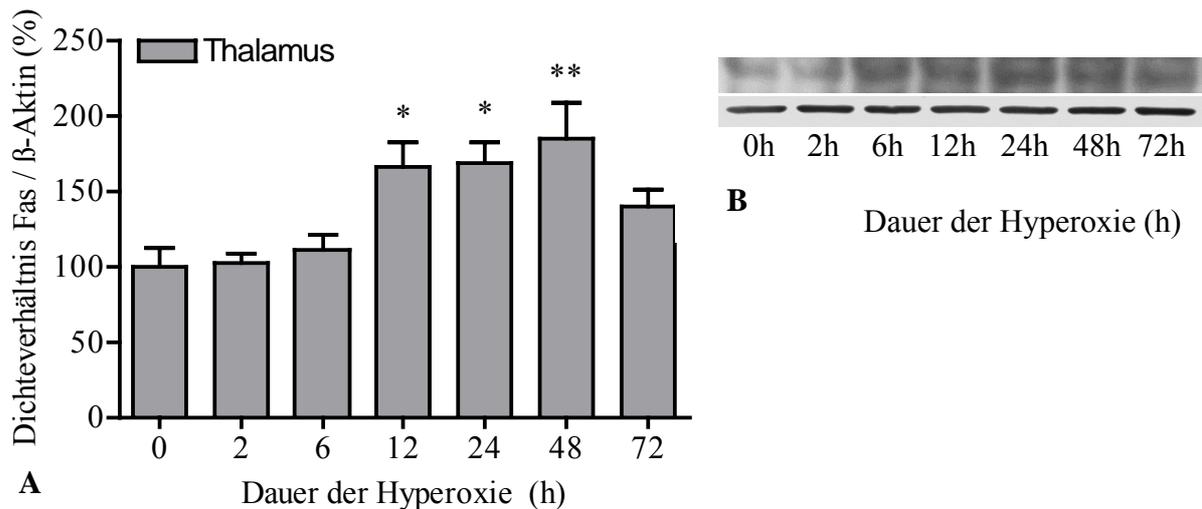


Abb. 4.3 Hyperoxie verstärkt die Expression von Fas auf Proteinebene

(A) Die Auswertung der Fas Proteinexpression im Thalamus ($n = 4$ pro Zeiteinheit) zeigt einen Anstieg der Dichteverhältnisse der Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt Fas, die untere β -Aktin.

die Proteinexpression im Thalamus. Die mRNA- und Proteingehalte wurden dabei nach den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Zeitstufen gemessen. Als Kontrolltiere dienten Ratten, die ausschließlich unter Normoxie gehalten wurden.

Nach Hyperoxie zeigt sich eine Erhöhung der Fas mRNA sowohl in Cortex als auch im Thalamus (Abb. 4.2). In beiden Regionen kann bereits ein Anstieg nach 6 Stunden Hyperoxie gezeigt werden, mit signifikanten Maxima nach 12 Stunden in Höhe von 516 ± 72 % (Mittelwert \pm Standardfehler) im Cortex bzw. 497 ± 121 % im Thalamus. Der interne Standard β -Aktin bleibt in allen Versuchsgruppen gleich.

Auf Proteinebene zeigt sich im Thalamus ein Anstieg von Fas nach Hyperoxie mit einem Maximum von 184 ± 25 % nach 48 Stunden (Abb. 4.3). Die Banden bei 44 kDa zeigen von 12 bis 48 Stunden Hyperoxie eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren in Relation zu β -Aktin.

4.5 Fas-Ligand mRNA- und Proteinexpression unter Hyperoxie

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss von hyperoxischen Bedingungen auf den Fas-Liganden (FasL), sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Cortex und Thalamus von 6 Tage alten Ratten im Vergleich zu den unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Kontrolltieren.

Hier zeigt sich nach Hyperoxie ein Anstieg der FasL-mRNA in Cortex und Thalamus ab 6 Stunden mit einem Maximum nach 12 Stunden von $292 \pm 37\%$ bzw. $495 \pm 56\%$ (Abb. 4.4). Der interne Standard β -Aktin bleibt in allen Versuchsgruppen gleich.

Auf Proteinebene stellt sich ebenfalls ein Anstieg der membrangebundenen Form von FasL im Thalamus nach Hyperoxie dar (Abb. 4.5). Die Bande bei 40 kDa zeigt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren nach 12 bis 72 Stunden in Relation zu β -Aktin mit einem Maximum nach 24 Stunden in Höhe von $166 \pm 12\%$ im Thalamus.

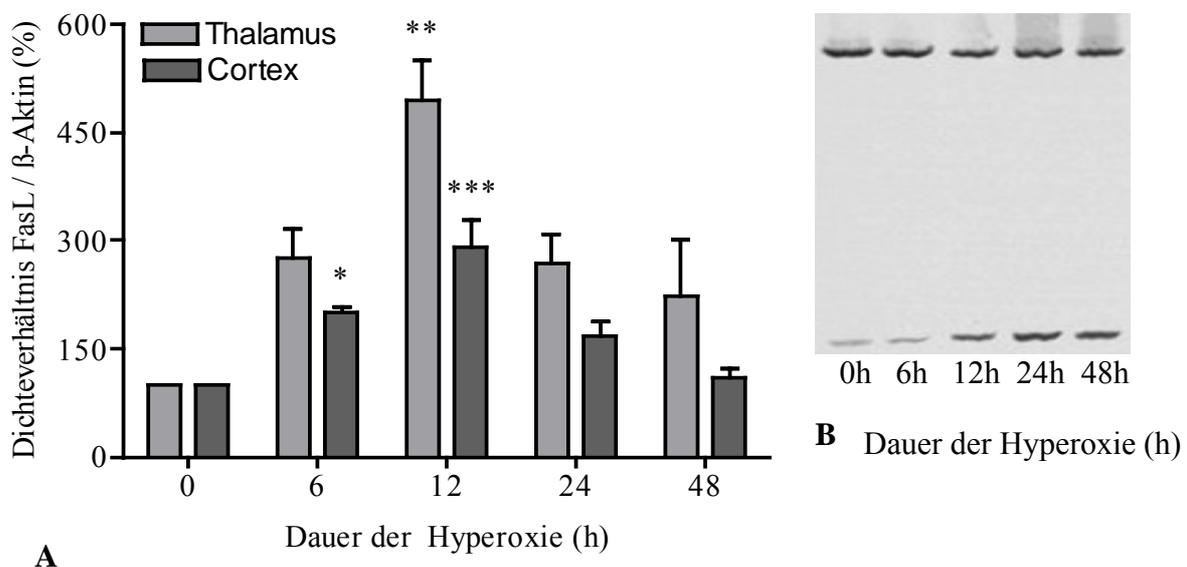


Abb. 4.4 Hyperoxie verstärkt die Expression von FasL mRNA

(A) Die densitometrische Auswertung der mRNA-Gehalte von FasL in Cortex ($n = 4$ Zeiteinheit) und Thalamus ($n = 3$ pro Zeiteinheit) zeigt eine deutliche Erhöhung der Expression. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt den internen Standard β -Aktin, die untere FasL.

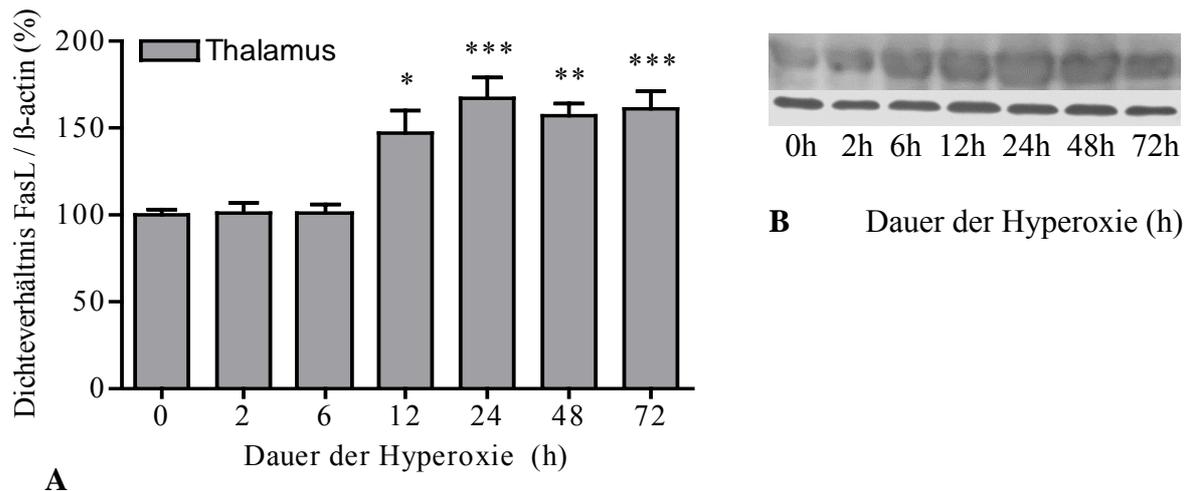


Abb. 4.5 Hyperoxie verstärkt die Expression von FasL auf Proteinebene

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression von FasL im Thalamus ($n = 6$ pro Zeiteinheit) zeigt einen signifikanten Anstieg. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt FasL, die untere β -Aktin.

4.6 Expression der DISC-Proteine FADD und Caspase-8 unter Hyperoxie

Der Einfluß des Sauerstoffgehalts in Höhe von 80 % auf die Expression der Proteine FADD und der aktivierten Form der Caspase-8, die zusammen mit dem durch den Fas-Liganden aktivierten Fas-Rezeptor den die Apoptose vermittelnden DISC-Komplex bilden, wurde mittels Westernblot auf Proteinebene untersucht. Die Expressionsgehalte der genannten Proteine in Cortex und Thalamus sechs Tage alter Ratten wurden dabei mit den Expressionsgehalten der Kontrolltiere, die ausschließlich unter Normoxie gehalten wurden verglichen.

Die Bande des Proteins FADD (*Fas-associated death domain*) bei 28 kDa zeigt nach Hyperoxieexposition eine Zunahme der Dichte in den untersuchten Hirnregionen in Relation zu β -Aktin (Abb. 4.6). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigt sich ein nicht signifikanter Anstieg im Cortex mit einem Maximum in Höhe von 157 ± 18 % nach 48 h. Im Thalamus zeigen sich signifikante Erhöhungen nach 24 bis 72 Stunden mit einem maximalen Wert in Höhe von 201 ± 31 % nach 72 h.

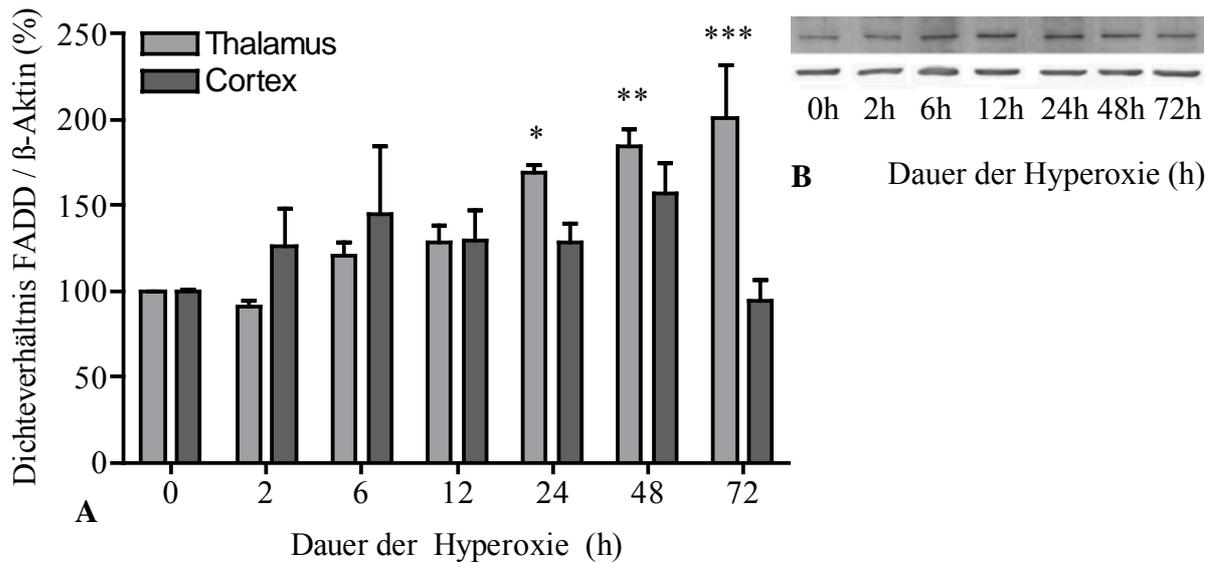


Abb. 4.6 Hyperoxie verstärkt die Expression von FADD auf Proteinebene

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression von FADD zeigt einen Anstieg in Cortex und Thalamus (jeweils $n = 6 - 7$ pro Zeiteinheit), der jedoch nur im Thalamus signifikant ist. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt das Protein FADD, die untere β -Aktin.

Die aktivierte Form des Proteins Caspase-8 zeigt bei 43 kDa eine erhöhte Expression nach Hyperoxie in beiden Hirnregionen, am höchsten nach 48 Stunden, die jedoch nur im Thalamus signifikant sind. Die maximalen Werte liegen nach 48 h bei 168 ± 20 % im Cortex bzw. bei 191 ± 18 % im Thalamus gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 4.7).

4.7 Expression von FLIP unter Hyperoxie

Die Expression des Proteins FLIP nach Hyperoxie wurde mittels Western Blot anhand der beiden Spaltprodukte $FLIP_L$ (*FLIP_{long}*) und $FLIP_S$ (*FLIP_{short}*) auf Proteinebene untersucht. Beide Formen von FLIP werden durch den selben Antikörper gebunden und wurden anhand ihres Molekulargewichts - 30 kDa für $FLIP_S$ bzw. 58 kDa für $FLIP_L$ - eindeutig identifiziert. Auch hier wurden die Expressionsgehalte in Cortex und Thalamus sechs Tage alter Ratten mit den Expressionsgehalten der Kontrolltiere in Normoxie verglichen.

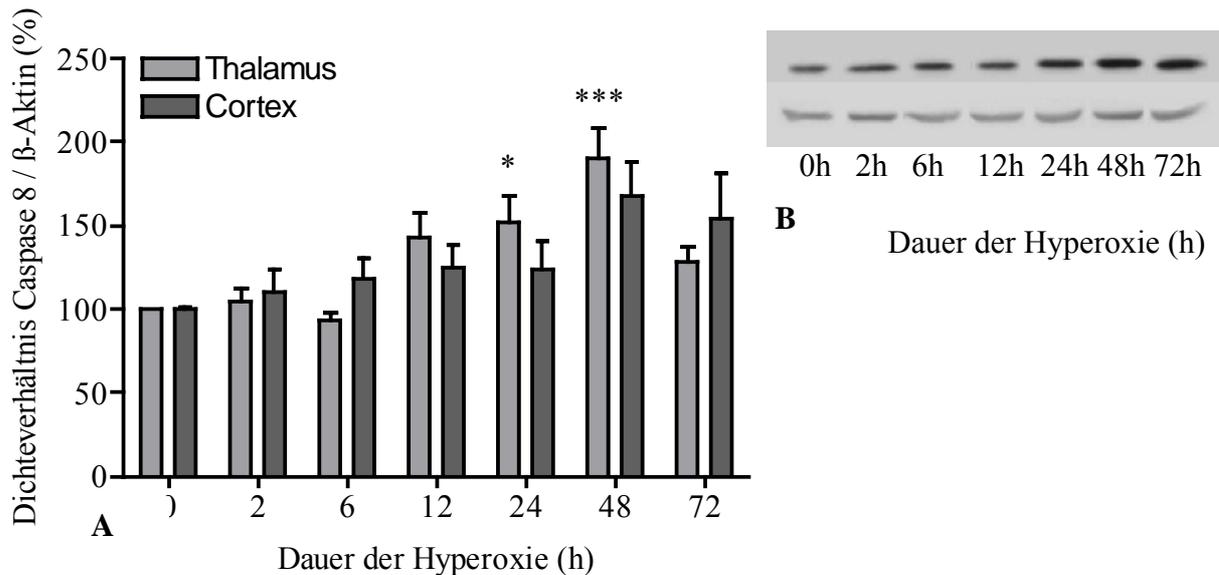


Abb. 4.7 Hyperoxie verstärkt die Expression von Caspase-8 auf Proteinebene

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression der aktivierten Form der Caspase-8 zeigt Anstiege in Cortex ($n = 6 - 8$ pro Zeiteinheit) und Thalamus ($n = 6 - 7$ pro Zeiteinheit), die jedoch nur im Thalamus signifikant sind. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt die aktivierte Form der Caspase-8, die untere β -Aktin.

FLIP_L zeigt nach Hyperoxie im Cortex eine signifikante Zunahme der Expression in Relation zu β -Aktin nach 24 und 48 Stunden Hyperoxie, im Thalamus nur einen nicht signifikanten Anstieg. Die maximalen Werte sind 279 ± 43 % nach 24 Stunden im Cortex bzw. 176 ± 21 % nach 48 Stunden im Thalamus (Abb 4.8).

Die Expression der kleineren Form des Proteins, FLIP_S, zeigt einen im Cortex signifikanten Anstieg nach 48 Stunden mit einem Maximum in Höhe von 352 ± 28 % in Relation zum internen Standard. Der maximale Wert des nicht signifikanten Anstiegs im Thalamus beträgt 123 ± 12 % nach 48 h Hyperoxie (Abb. 4.8).

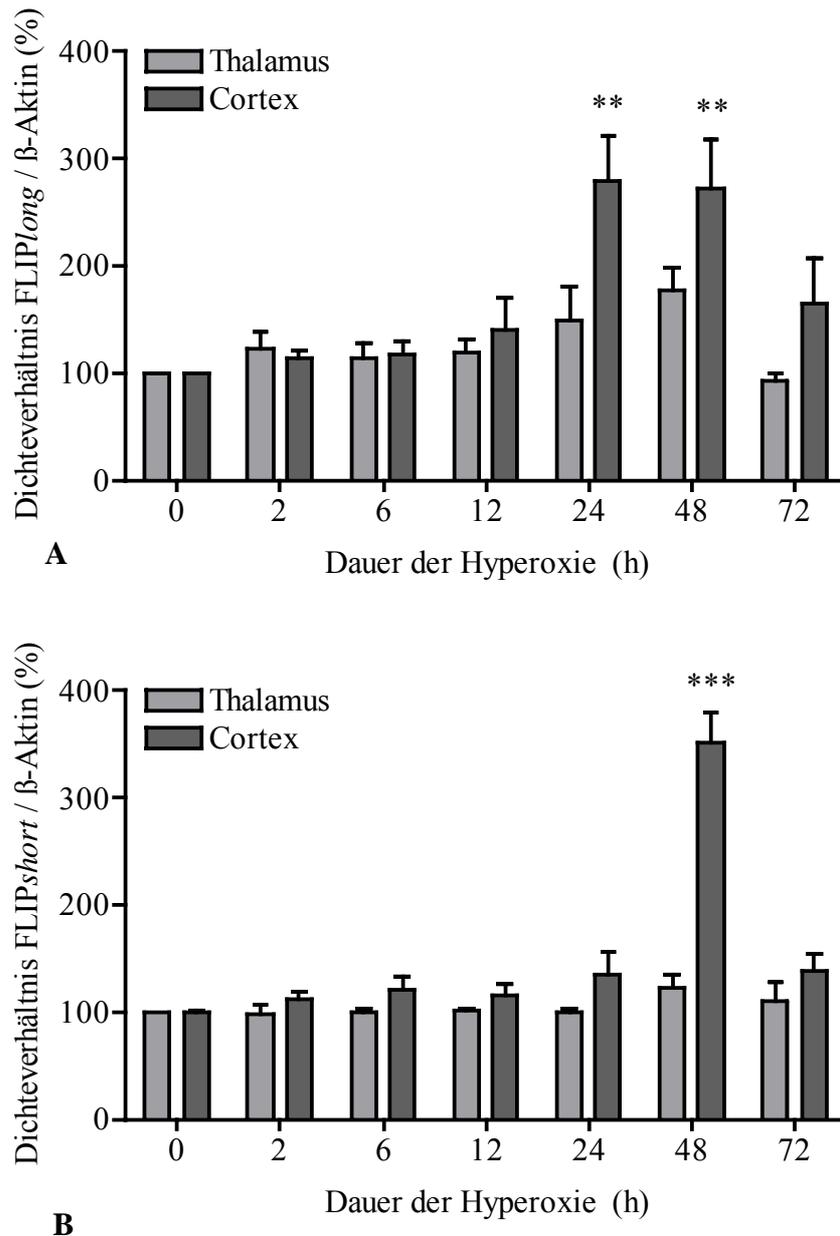


Abb. 4.8 Hyperoxie verstärkt die Expression von FLIP auf Proteinebene

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression von FLIP_L zeigt signifikante Anstiege in Cortex (n = 6 - 7 pro Zeiteinheit und Gehirnregion).

(B) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression von FLIP_S zeigt nur im Cortex (n = 6 - 7 pro Zeiteinheit) einen signifikanten Anstieg, im Thalamus (n = 6 - 8 pro Zeiteinheit) nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg.

Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, *one-way ANOVA*).

4.8 Expression von Caspase-3 unter Hyperoxie

Die Expression der aktivierten Form der Caspase-3 nach Hyperoxie wurde mittels Western Blot auf Proteinebene bestimmt. Die Expression in Cortex und Thalamus sechs Tage alter Ratten wurde densitometrisch erfasst und mit den Werten der Kontrolltiere verglichen.

Die aktivierte Form des Proteins Caspase-3 zeigt einen nach 72 Stunden Hyperoxie signifikanten Anstieg der Bande bei 17 kDa gegenüber der Kontrollgruppe in Cortex und Thalamus, mit einem Maximum nach 72 Stunden Hyperoxie von 731 ± 264 % in Cortex und 413 ± 104 % im Thalamus (Abb. 4.9).

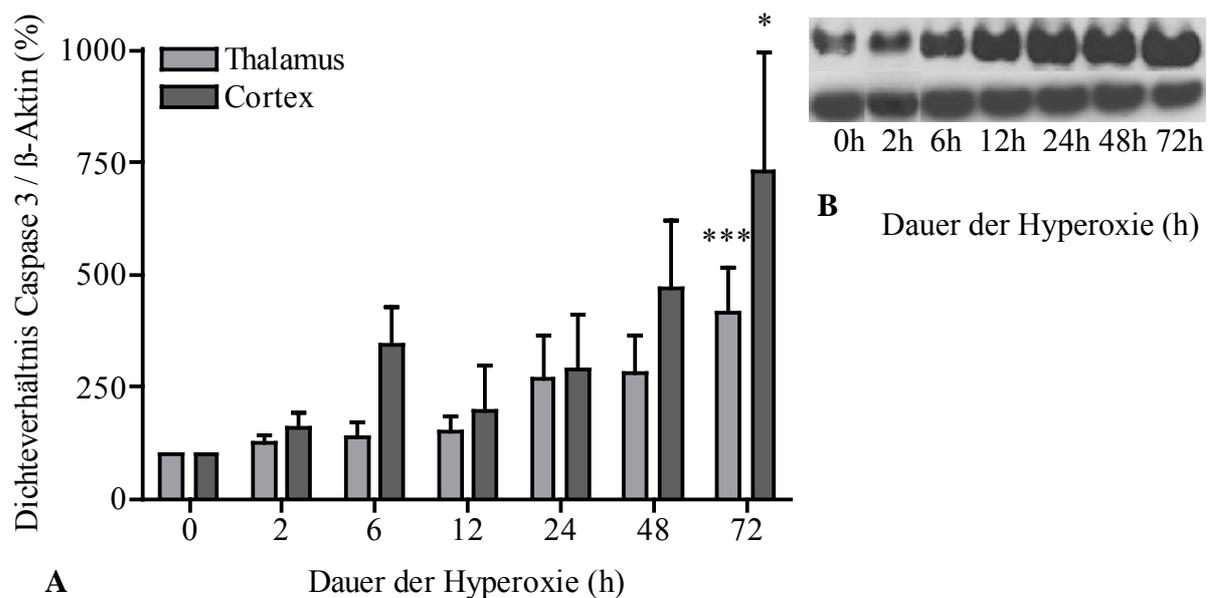


Abb. 4.9 Hyperoxie verstärkt die Expression von Caspase-3 auf Proteinebene

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression der aktivierten Form der Caspase-3 zeigt signifikante Anstiege in Cortex ($n = 3 - 6$ pro Zeiteinheit) und Thalamus ($n = 4 - 8$ pro Zeiteinheit). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die obere Bande zeigt die Expression der aktivierten Form der Caspase-3, die untere β -Aktin.

4.9 Expression und Phosphorylierung von JNK unter Hyperoxie

Während sich im Cortex keine signifikante Veränderung der Expression von JNK (46 kDa) darstellt, zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen nach 2 und 12 sowie 72 Stunden im Thalamus mit einem Maximum von 155 ± 19 % nach 12 Stunden Hyperoxie. Die Expression von phosphoryliertem JNK (pJNK, 46 kDa) nimmt in beiden Gehirnregionen stärker als die Expression von JNK zu, im Cortex und Thalamus signifikant in Relation zu β -Aktin. Maximale Werte bestehen im Cortex in Höhe von 229 ± 6 % nach 12 Stunden und im Thalamus in Höhe von 185 ± 29 % nach 6 Stunden (Abb. 4.10).

4.10 Einfluss von Caspase-8 Inhibitor auf Caspase-3 unter Hyperoxie

Ein Teil der sechs Tage alten Ratten bekam vor einer 24 Stunden dauernden Hyperoxie den Caspase-8 Inhibitor TRP801 appliziert, die Kontrollgruppe erhielt lediglich Kochsalzlösung. Im Western Blot zeigte sich bei den Tieren in Hyperoxie ein Anstieg der Caspase-3 Expression um 151 ± 17 % gegenüber denen in Normoxie. Bei den Versuchstieren in Hyperoxie, denen der Caspase-8 Inhibitor TRP801 appliziert wurde, zeigte sich eine signifikante Verminderung der Caspase-3 Expression auf 89 ± 10 % im Vergleich zur Normoxie-Gruppe (Abb. 4.11).

4.11 Ausmaß Hyperoxie-induzierter Apoptose bei Mäusen ohne Fas-Rezeptor

B6.MRL-Tnfrsf6lpr Mäuse, denen der funktionelle Fas-Rezeptor fehlt (Fas knock-out Mäuse, Fas k/o), wurden für 24 Stunden einer Hyperoxie in Höhe von 80 % ausgesetzt und anschließend deren Gehirne nach der Fluoro-Jade-B-Methode gefärbt, um untergegangene Nervenzellen im gesamten Gehirn sichtbar zu machen. Als Kontrollgruppe dienten *C57BL/6* Wildtyp-Mäuse, die sich insbesondere deswegen gut als Kontrolltiere eignen, da bei ihnen bereits ein Zelluntergang gezeigt werden konnte, der dem von 7 Tage alten Han Wistar Ratten entspricht¹⁰⁸. Quantitativ kann bei *B6.MRL-Tnfrsf6lpr* Mäusen eine signifikant höhere Anzahl (48970 ± 3023) an untergegangenen Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe der *C57BL/6* Mäuse (94347 ± 10827) gezeigt werden (Abb. 4.12). Nach Auszählung der Zelltodraten in den einzelnen Regionen zeigt sich auch in den meisten kortikalen und thalamischen Regionen eine signifikant geringere Apoptoserate bei Fas k/o Mäusen im Vergleich zur *C57BL/6* (Tab. 4.1).

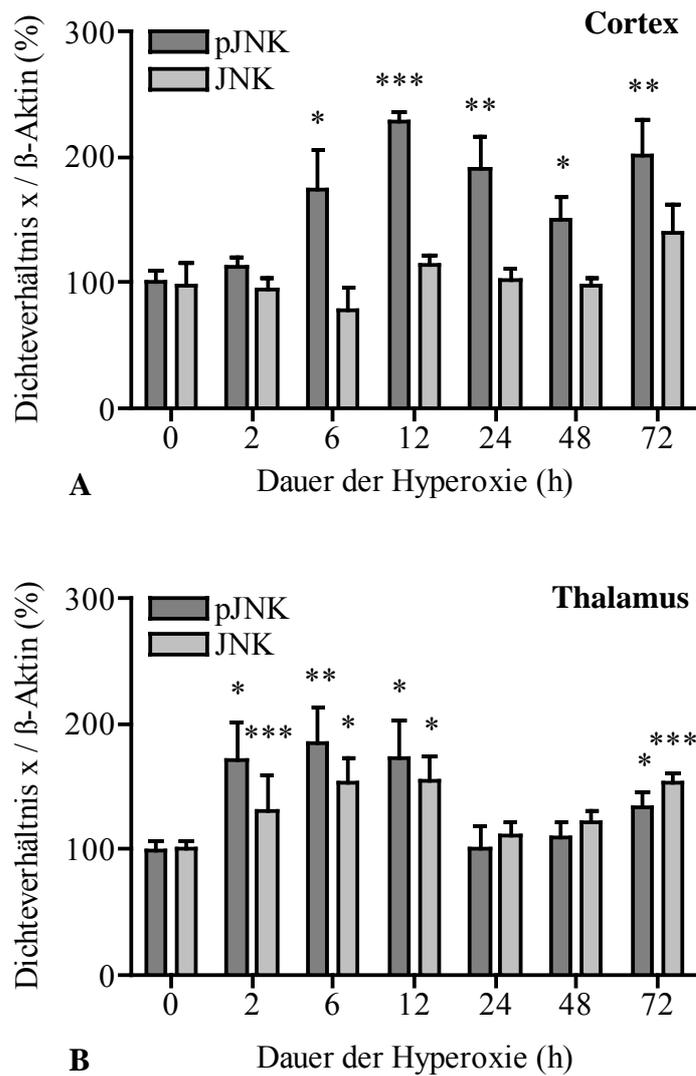
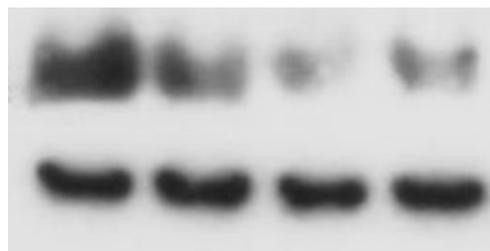
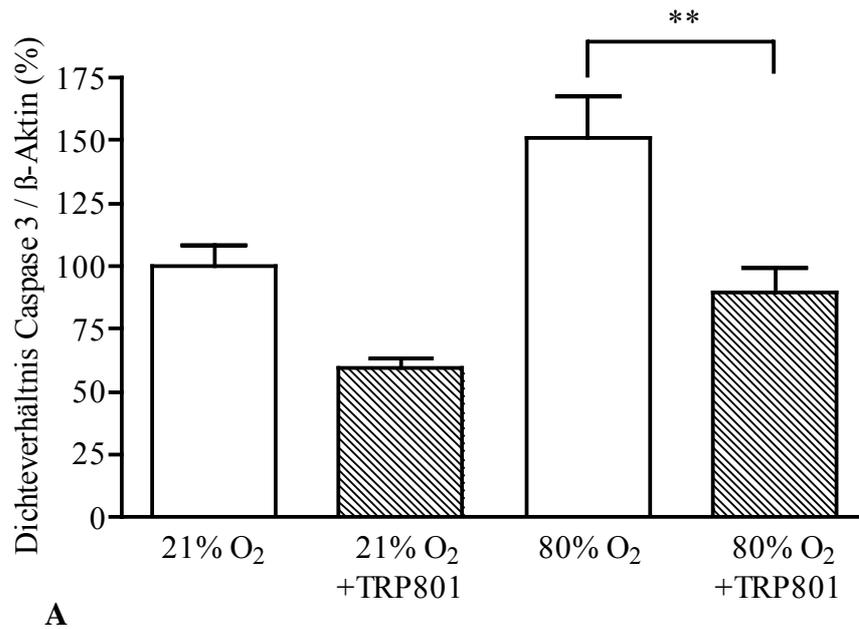


Abb. 4.10 Proteinexpression und Phosphorylierung von JNK nach Hyperoxie

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression und Phosphorylierung von JNK im Cortex zeigt signifikante Anstiege von pJNK.

(B) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression und Phosphorylierung von JNK im Thalamus zeigt signifikante Anstiege von pJNK und niedrigere, signifikante Anstiege von JNK. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin ($n = 5 - 8$ pro Zeiteinheit und Gehirnregion; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).



Hyperoxie 80 %	+	+	-	-
TRP801	-	+	+	-

B**Abb. 4.11** Wirkung des Caspase-8 Inhibitors TRP801

(A) Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression der aktivierten Form der Caspase-3 zeigt eine signifikante Reduktion nach Gabe des Caspase-8 Inhibitors TRP801 unter Hyperoxie. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen in Relation zum internen Standard β -Aktin (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *one-way ANOVA*).

(B) Die photographische Darstellung der Banden zeigt eine deutliche Verminderung der Expression des Proteins Caspase-3 im Sinne einer geringeren Bandendichte nach Applikation des Caspase-8 Inhibitors TRP801 in Relation zu β -Aktin. Die Bande der Kontrollgruppe, die lediglich Kochsalzlösung i.p. appliziert bekam, ist von deutlich größerer Intensität.

4.12 Ausmaß Hyperoxie-induzierter Apoptose bei Mäusen ohne Fas-Liganden

B6Smn.C3-FasLgld Mäuse, die keinen Fas-Liganden exprimieren (Fas Ligand knockout, FasL k/o) wurden ebenfalls für 24 Stunden einer Sauerstoffatmosphäre von 80 % ausgesetzt. Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls Wildtyp-Mäuse vom Typ *C57BL/6* herangezogen. Bei den FasL k/o Mäusen kann im Gehirn kein signifikanter Unterschied in der Rate untergegangener Nervenzellen (86077 ± 3967) im Vergleich zu den *C57BL/6* Mäusen (94347 ± 10827) nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Weiterhin zeigt sich keine signifikante Veränderung der Apoptose in den kortikalen wie auch den thalamischen Regionen der Gehirne im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 4.1).

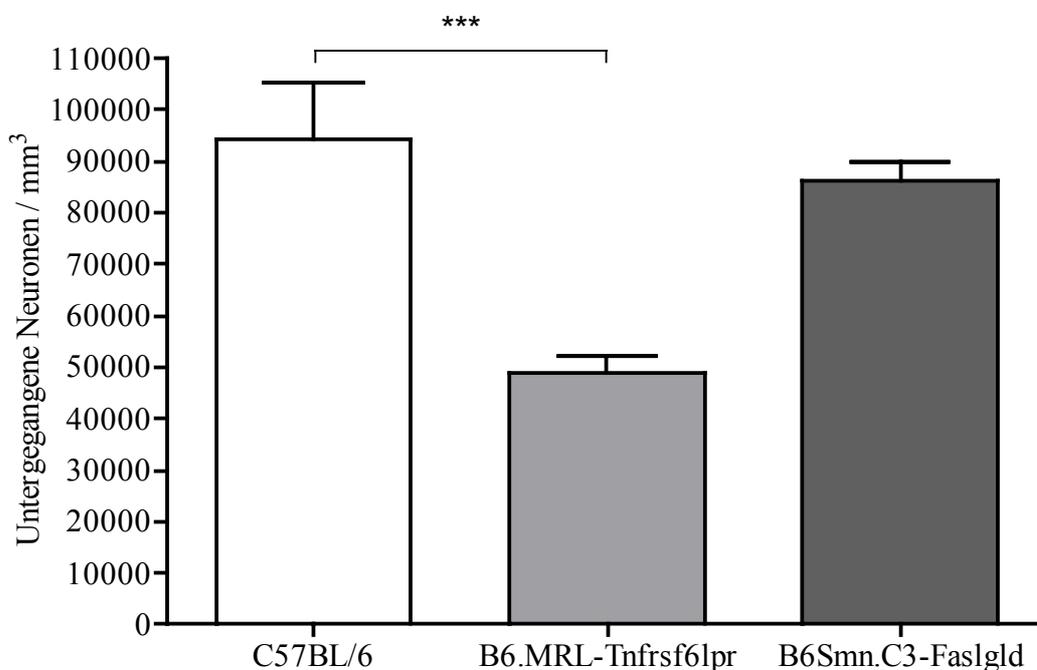


Abb. 4.12 Apoptoseraten nach Hyperoxie

B6.MRL-Tnfrsf6lpr Mäuse, denen der funktionelle Fas-Rezeptor fehlt (Fas k/o, n = 18), zeigen im gesamten Gehirn nach 24 stündiger Hyperoxie in der Fluoro-Jade-B-Färbung eine signifikant niedrigere Anzahl toter Nervenzellen im Vergleich zu Wildtyp *C57BL/6* Mäusen (n = 14).

B6Smn.C3-FasLgld Mäuse, die den Fas-Liganden nicht exprimieren (FasL k/o, n = 23), zeigen hingegen nach gleicher Behandlung nahezu identische Zelltodraten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Versuchsgruppen (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, *student's t-test*).

Gehirnregion	C57BL/6	Fas k/o		FasL k/o	
	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM	p	Mittelwert \pm SEM	p
Cortex frontalis, II	8071 \pm 2220	11333 \pm 1283	-	7043 \pm 948	-
Cortex frontalis, IV	5397 \pm 1291	544 \pm 98	***	5894 \pm 798	-
Cortex parietalis, II	7786 \pm 1120	15333 \pm 2283	-	11391 \pm 1542	-
Cortex parietalis, IV	7778 \pm 1182	511 \pm 97	***	5121 \pm 512	-
Cortex cinguli, II	8571 \pm 1504	5778 \pm 683	-	6870 \pm 783	-
Cortex cinguli, IV	6667 \pm 1680	789 \pm 134	***	4541 \pm 705	-
Cortex retrospl., II	6643 \pm 1880	5111 \pm 691	-	4541 \pm 705	-
Cortex retrospl., IV	6111 \pm 1259	700 \pm 206	***	4637 \pm 440	-
Thalamus mediodors.	5635 \pm 1400	578 \pm 82	***	4638 \pm 654	-
Thalamus laterodors.	8333 \pm 2080	567 \pm 86	***	5314 \pm 666	-
Thalamus ventralis	2857 \pm 635	322 \pm 61	***	3768 \pm 566	-

Tab. 4.1 Apoptoseraten in kortikalen und thalamischen Regionen

Bei *B6.MRL-Tnfrsf6lpr* (Fas k/o) Mäusen zeigt sich eine signifikant niedrigere Rate untergegangener Nervenzellen sowohl in einem Teil der kortikalen, als auch in den thalamischen Gehirnregionen nach 24 Stunden Hyperoxie in der Fluoro-Jade-B-Färbung im Vergleich zu den Wildtyp *C57BL/6* Mäusen. Bei den Zelltodraten der *B6Smn.C3-FasLgld* (FasL k/o) Mäuse gibt es in diesen Regionen keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auflistung der Mittelwerte und der Standardfehler (SEM) bei $n = 14$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *student's t-test*).

4.13 Einfluss von JNK Inhibitor auf PC12 Zellen unter Hyperoxie

Die morphologischen Untersuchungen zeigen, dass sowohl durch *nerve growth factor* (NGF), als auch durch 50 %-ige Hyperoxie eine neuritenartige Aussprossung an den PC12-Zellen nach deren Fixierung auf Kollagen stattfindet¹⁰⁶. Durch die Zugabe des selektiven JNK-Inhibitors SP600125, in einer die Neuritenbildung nach NGF-Applikation betreffend inhibitorisch wirksamen Dosis, wurde ebenso wie in dem Kontrollversuch mit NGF das durch Hyperoxie induzierte Dendritenwachstum gehemmt (Abb. 4.15).

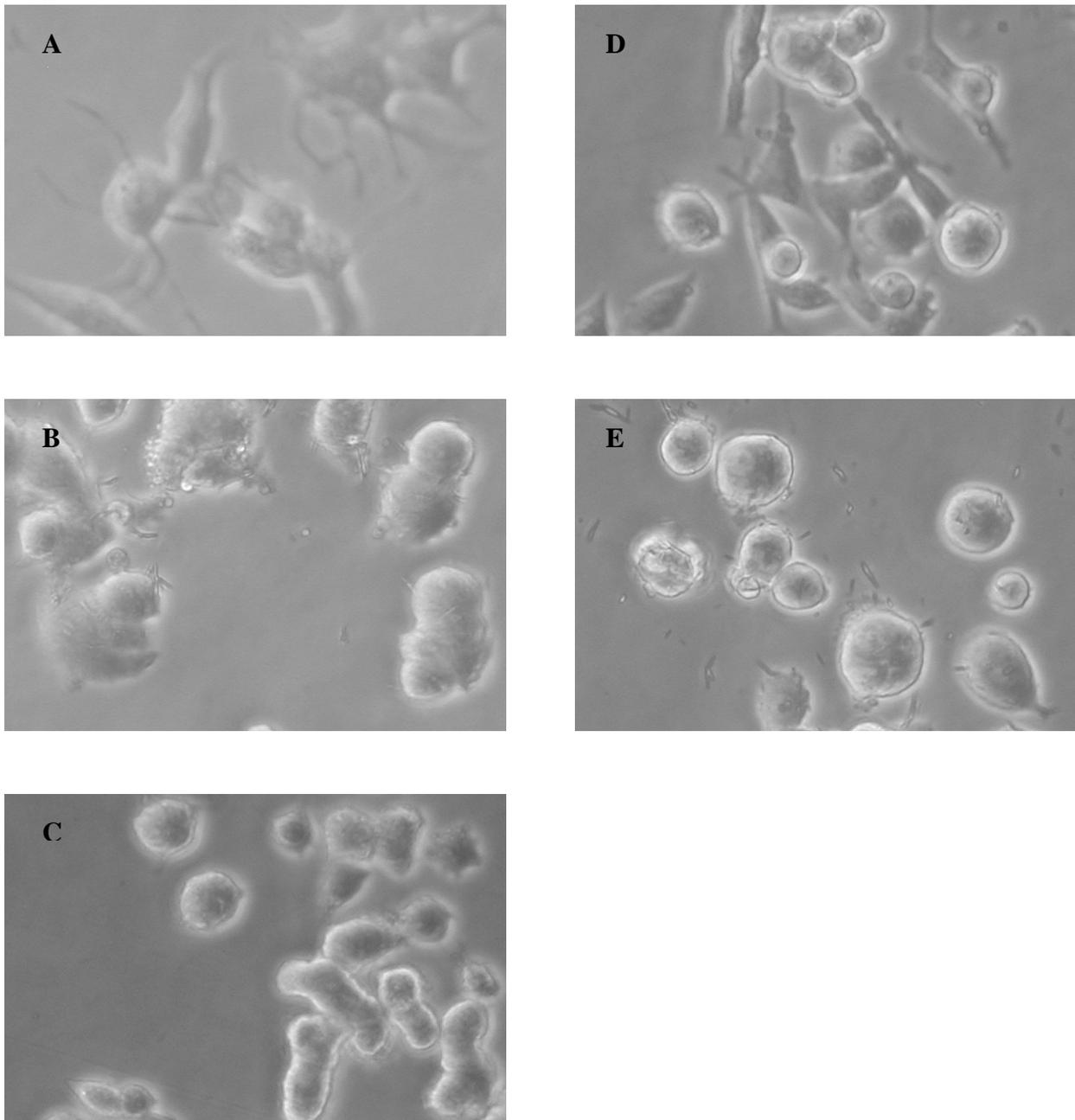


Abb. 4.13 Morphologie von PC12 Zellen

Nach drei Tagen zeigt sich eine neuritenartige Aussprossung der adhärent gewachsenen PC12-Zellen, die (A) in Normoxie gehalten und mit 50 ng NGF und 2 μ l DMSO inkubiert wurden und bei Zellen, die (D) in 50 % Hyperoxie gehalten und mit 2 μ l DMSO inkubiert wurden. Zellen, die mit 20 μ M SP600125 inkubiert wurden, zeigen sowohl nach Normoxie und mit 50 ng NGF (B), als auch nach 50 % Hyperoxie (E) keine Aussprossung, sondern eher hypertrophe, prall runde Formen. In Normoxie gehaltene und nur in Medium inkubierte Zellen (C) zeigen keine morphologischen Veränderungen (Vergrößerungsfaktor: 200)

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Betrachtung

Die Überlebensrate von Frühgeborenen steigt ebenso wie die Zahl extrem kleiner Frühgeborener. Da diese einen längeren Zeitraum pathologisch erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, wird die Problematik neurologisch-kognitiver Spätfolgen der Frühgeburtlichkeit weiter ansteigen³. Ein genaueres Verständnis der pathologischen Mechanismen der Neurotoxizität des Sauerstoffs in der vulnerablen Phase des Gehirnwachstums ist somit von besonderem klinischen Interesse.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Zusammenhang zwischen der pathologisch erhöhten Apoptose im sich entwickelnden Gehirn nach unphysiologisch hoher Sauerstoffexposition und des durch den Fas-Rezeptor induzierten, apoptotischen Signalweges aufzuzeigen. Zudem sollten mögliche neuroprotektive Maßnahmen, die den Fas vermittelten Signaltransduktionsweg nach Hyperoxie hemmen, aufgezeigt werden.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Reifungsprozesse im Gehirn sechs Tage alter Han Wistar Ratten mit denen im Gehirn Frühgeborener während der Phase des beschleunigten Hirnwachstums wurde dieses Tiermodell gewählt, um die pathophysiologischen Vorgänge des durch Hyperoxie herbeigeführten Zelltodes näher zu untersuchen. Dabei wurden die Ratten für definierte Zeiträume (2, 6, 12, 24, 48, 72 Stunden) einer erhöhten Sauerstoffkonzentration in Höhe von 80 % ausgesetzt.

In dieser Arbeit konnte mittels RT-PCR und Westernblot gezeigt werden, dass nach Hyperoxie die Expressionen der Gene und Proteine des Fas-Liganden und des Fas-Rezeptors, wie auch die Expressionen der Proteine FADD, Caspase-8 und Caspase-3, die an dem durch Fas eingeleiteten, apoptotischen Signalweg beteiligt sind, ansteigen. Die Expression der diesen apoptotischen Signalweg hemmenden aktiven Spaltprodukte des Proteins FLIP blieben im Thalamus nahezu unverändert, während sie im Cortex anstiegen. Anhand von transgenen Mäusen, denen der funktionelle Fas-Rezeptor bzw. der Fas-Ligand fehlt, konnte ein wichtiger Beitrag des Fas-Rezeptors an Hyperoxie-induziertem Zelltod nachgewiesen werden. Die neuroprotektive Wirkung durch Unterbrechung der apoptotischen Signalkaskade mittels eines selektiven Caspase-8-Inhibitors zeigte ebenfalls eine entscheidende Rolle dieser Signalkaskade nach Sauerstoffexposition. Desweiteren kam es zu einem Anstieg der Expression und Phosphorylierung (Aktivierung) der sowohl an apoptotischen, als auch an differenzierenden Signalwegen

teilhabenden MAPK JNK. Anhand eines Modells von PC12 Zellen konnte gezeigt werden, dass eben dieses Protein JNK, welches unter anderem durch die Bindung von Daxx bzw. RIP an den Fas-Rezeptor aktiviert werden kann, explizit auch nach Hyperoxie bei morphogenetischen Prozessen im Rahmen der Dendritogenese eine wichtige Rolle spielt ⁵³.

5.2 Die Rolle des Fas-Rezeptors unter Hyperoxie

Die Toxizität von Sauerstoff konnte topografisch als Zelltod in diversen Regionen der grauen und weißen Substanz des Gehirns gesichert werden ²⁴. Auch schädigende Einflüsse im Sinne einer mikrovaskulären Degeneration, einer Verringerung der Gehirnmasse sowie funktionell im Rahmen veränderter visuell evozierter Potenziale (VEPs) sind inzwischen an einem Tiermodell mit Sprague-Dawley Ratten nach Exposition gegenüber 80 % Sauerstoff bekannt ¹⁰⁹. Nach Hyperoxie konnte ein Anstieg der Expressionen von Fas auf mRNA-Ebene, sowie des Fas-Rezeptorproteins nachgewiesen werden. In Mäusen, denen der funktionelle Fas-Rezeptor fehlt, kam es durch Hyperoxie zu einer signifikant niedrigeren Zelltodrate als bei Wildtyp-Mäusen. Die Ergebnisse zeigen Gemeinsamkeiten mit zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten über die Rolle von Fas bei der Vermittlung des Zelltodes in anderen Schädigungsmodellen am unreifen Gehirn. So konnte nach einem neonatalen, hypoxisch-ischämischen Ereignis eine Steigerung der Expression von Fas gezeigt, sowie ein protektiver Effekt durch Mangel an diesem Protein bei Fas knock-out Mäusen nachgewiesen werden ¹¹⁰. Hyperoxie führt zudem zu einer gesteigerten Apoptose und Zunahme der Expression von Fas in unreifen Oligodendrozyten (OLN-93). Im Gegensatz dazu kam es nach Zugabe von 17 β -Estradiol in neuroprotektiver Dosis zum Zellkulturmedium zu keinem Anstieg von Fas ¹¹¹. Die Expression des Proteins FADD, das an den Fas-Rezeptor bindet und infolge dessen einen apoptotischen Signalweg in Gang setzt, nimmt ebenfalls zu. Ob es essentiell für die durch Hyperoxie induzierte Apoptose ist, wie am Beispiel der durch Fas eingeleiteten Apoptose in embryonalen Fibroblasten gezeigt wurde, kann nicht mit abschließender Sicherheit geklärt werden ⁶⁶. Neuere Arbeiten zeigen neben der seit langem bekannten pro-apoptotischen Wirkung von FADD auch bislang unbekannt Rollen des Proteins auf, die nicht zur Apoptose führen ¹¹². Ebenso rücken Funktionen des sogenannten Todesrezeptors Fas vermehrt in den Vordergrund, die in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen und der Zell- bzw. Gewebeart nicht zum Zelluntergang, sondern zu Differenzierung, Proliferation oder Hemmung von apoptotischen Prozessen führen ¹¹³. Für bestimmte Arten von Nervenzellen ist die Anwesenheit von Fas essentiell für die Ausbildung dendritischer Auszweigungen. Dabei bindet

FADD an Fas, jedoch nehmen die Caspasen-8 und-10, die an FADD über die DED binden können, keine Rolle in der weiteren Signalkaskade ein. Ob das Protein FLIP oder ein noch nicht identifiziertes Protein durch Bindung an FADD die Neuritenbildung herbeiführt, ist noch unbekannt. DRG (*dorsal root ganglia*)-Zellen wiederum werden mittels Stimulation durch den Fas-Liganden unabhängig von FADD in ihrer axonalen Ausbildung positiv beeinflusst⁹⁵.

Außer durch Ligandenbindung kann der Fas-Rezeptor auch unabhängig und in Abwesenheit des Fas-Liganden aktiviert werden¹¹⁴. Dabei kommt es zu einer Verbindung von Fas-Rezeptoren über die distale der drei extrazellulären CRDs, jedoch bildet sich nach Anordnung der Fas-Rezeptoren zu einem Trimer kein DISC aus^{58, 115}. Erst nach Bildung eines intrazellulären Trimers aus DDs können apoptotische Kaskaden in Gang gesetzt werden¹¹⁶.

Trotz der Vielzahl der durch Fas eingeleiteten Signalwege, die nicht zur Apoptose führen, konnte eine bedeutungsvolle Beteiligung des Fas-Rezeptors an der durch Sauerstoff induzierten apoptotischen Neurodegeneration gesichert werden.

5.3 Die Rolle des Fas-Liganden unter Hyperoxie

Im Gegensatz zu den Fas knock-out Versuchstieren sind Mäuse, die den Fas-Liganden nicht exprimieren, nicht vor der durch Hyperoxie herbeigeführten Apoptose geschützt. Der Fas-Ligand ist also nicht wesentlich am Zelluntergang nach Sauerstoffexposition beteiligt. Trotzdem kam es zu einem Anstieg des Fas-Liganden auf mRNA-Ebene, sowie des membrangebundenen Fas-Liganden auf Proteinebene. Das Fas-Rezeptorprotein besitzt die Möglichkeit einer Selbstaktivierung durch Anlagerung intrazellulärer DDs (Trimerisierung), die ohne Anwesenheit des Fas-Liganden zur Apoptose führt¹¹⁶. Durch Herbeiführen einer Apoptose mittels onkologischer Medikamente konnte die Einleitung einer zum Zelltod führenden Signalkaskade durch Fas ohne Beteiligung des Fas-Liganden aufgezeigt werden. Dabei kam es zur Anhäufung von Fas-Rezeptoren an der Zellmembran und intrazellulär zu einer Interaktion mit FADD, wodurch der eigentliche Signalweg im Zellinneren in Gang gesetzt wurde¹¹⁷. Auch ultraviolettes Licht führt zu vom Fas-Liganden unabhängiger Apoptose mittels Fas-FADD Interaktionen¹¹⁸. Stattdessen kann durch den Fas-Liganden eine Steigerung der neuronalen Vernetzung ausgelöst werden, was hier nicht weiter untersucht wurde und den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. Diese Vernetzung ist unabhängig von Caspasen und führt insbesondere trotz Aktivierung des Fas-Rezeptors durch den Liganden zu keiner Erhöhung der Expression der aktivierten Caspase-

3. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf Effekte einer Aktivierung des Fas-Rezeptors durch den Fas-Liganden, die nicht zur Apoptose führen ⁹⁵.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Fas-Ligand bei Hyperoxie induzierter Apoptose entweder keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Apoptose einnimmt oder möglicherweise proliferative bzw. protektive Ereignisse, die ebenfalls über Fas vermittelt werden, als kompensatorische Reaktion auf die Hyperoxie auslöst ¹¹³.

5.4 Die Rolle der Caspasen-8 und -3 nach Hyperoxie

Die Caspase-8, ein Protein des DISC und ein direkter Aktivator der Effektorcaspase-3 im Fas-vermittelten, apoptotischen Signalweg wurde nach Hyperoxie verstärkt exprimiert. Durch Inhibition mittels eines selektiven Caspase-8 Inhibitors konnte die Expression der aktivierten Caspase-3 nach Hyperoxie erheblich vermindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Caspase-8 eine wichtige Funktion bei der durch Sauerstoffexposition eingeleiteten Apoptose besitzt.

Die Caspase-8 vermittelt nicht nur direkt über eine Aktivierung der Caspase-3 den Zelltod, sondern auch über eine Regulation des mitochondrialen Signalweges. Hierbei bestehen wechselseitige Regelungsmechanismen zwischen der Caspase-8 und der intrinsischen, mitochondrialen Kaskade, welche in diese Arbeit nicht mit einbezogen wurde ¹¹⁹. Anhand eines Modells mit epithelialen Zellen konnte ein Anstieg der aktiven Formen der Caspase-8 nach Hyperoxie und eine Verbindung zu mitochondrialen Signalwegen nachgewiesen werden. Dabei initiiert die aktive Form der Caspase-8 nach Ausbildung des DISC eine erhöhte Expression und mitochondriale Translokation von den Mitgliedern der Bcl-2 Familie Bid und, auch durch die Aktivierung von Bid beeinflusst, Bax. Diese bewirkten eine Freigabe von Cytochrom-c ins Zytoplasma, die Ausbildung des Apaf-1 Komplexes und somit eine Aktivierung der Caspase-9, was wiederum zum Zelltod führte. Neben der Caspase-8 bestehen weitere Aktivatoren von Bid ¹²⁰. In dem bereits beschriebenen hypoxisch-ischämischen Tiermodell konnte eine Zunahme der aktiven Spaltprodukte der Caspasen-8, -9 und -3 und eine Vernetzung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Kaskaden nachgewiesen werden ¹¹⁰.

Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass apoptotische Signale nach Hyperoxie über einen direkten Weg von der Caspase-8 zur Caspase-3 weitervermittelt werden. Die starke Verminderung der Expression der Caspase-3, einem Biomarker für apoptotischen Zelltod, nach Applikation des Caspase-8 Inhibitors unter Hyperoxie lassen annehmen, dass bei einer

möglichen Beteiligung mitochondrialer Signalkaskaden eine alternative, von der Caspase-8 unabhängige Aktivierung eben dieser einen eher ergänzenden als essentiellen Effekt bei der Apoptose unter Hyperoxie darstellt.

5.5 Die Rolle von FLIP unter Hyperoxie

FLIP, ein Protein mit zwei aktiven Spaltprodukten (FLIP_S und FLIP_L), ist ein wichtiger Regulator der durch Fas eingeleiteten Apoptose. Nach Hyperoxie kam es zu einem Anstieg der Proteinexpression beider Isoformen im Cortex, während sie im Thalamus nahezu unverändert blieben. Regionale Unterschiede konnten auch in dem mehrfach erwähnten hypoxisch-ischämischen Tiermodell von *Graham et al.* in der Expression der Proteine FLIP_S und FLIP_L aufgezeigt werden. So war die basale Expression von FLIP in Cortex und Thalamus wesentlich höher als im Hippocampus, der Region, die in dem Modell auch am meisten vulnerabel war. Nach neonataler Hypoxie/Ischämie blieb die Konzentration von FLIP im Cortex konstant, während sie im Thalamus, der Region mit dem geringsten Zelluntergang, ebenfalls nach 24 Stunden anstieg¹¹⁰. Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit ergaben keine so eindrucksvollen regionalen Unterschiede bei den apoptotischen Prozessen zwischen Cortex und Thalamus. Auch die eigentlichen Apoptoseraten in Cortex und Thalamus zeigen keinen Unterschied dieser Größenordnung²⁴. Dies könnte auf eine Wirkung von FLIP auf den Zelluntergang nach Hyperoxie deuten, die außerhalb der eigentlichen, direkten Inhibition der Caspase-8 durch FLIP liegt. So konnte an Lungenepithelzellen *in vitro* ein direkter Einfluss von FLIP auf Bax, einen wichtigen Bestandteil des intrinsischen Signalweges bewiesen werden. Dabei vermindert FLIP die Translokation und verstärkt der Phosphorylierung von Bax in Abhängigkeit von der MAPK p38, die eine wichtige Rolle als Vermittler oxidativer Signale im Zytoplasma in apoptotische Signale innehat^{121, 122}. Desweiteren hemmt FLIP die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die sowohl proliferative als auch apoptotische Signalkaskaden reguliert. So nimmt die PKC modulierenden Einfluss auf die Ausbildung des DISC^{123, 124}. FLIP_L kann außerdem hemmend auf die Aktivierung von JNK durch Bindung an die MAPKK MKK7, einen JNK-Aktivator wirken¹²⁵.

5.6 Die Rolle von JNK unter Hyperoxie

Das Protein JNK mit seinen drei Isoformen ist ein wichtiger Mediator sowohl apoptotischer, wie auch physiologischer Prozesse (siehe auch Kap. 1.5.6). In den beiden untersuchten Gehirnregionen Cortex und Thalamus nimmt die Expression von JNK bzw. dessen aktivierter, phosphorylierter Form pJNK zu, wobei auch das Verhältnis von pJNK zu JNK zunimmt. An einem Modell mit durch beta-Amyloid induzierter Apoptose an kortikalen Neuronen konnte dargestellt werden, dass es in Abhängigkeit der Isoform 3 von JNK zu einer erhöhten Genexpression des Fas-Liganden kommt⁸⁴. Da JNK nach Fas-Rezeptoraktivierung durch Bindung des Proteins Daxx an Fas verstärkt exprimiert und aktiviert werden kann, wäre auch hier ein intrazellulärer Verstärkungsmechanismus apoptotischer Ereignisse im Sinne eines *self-killing loop* denkbar⁵³. Nach Hyperoxie kam es zu einer Zunahme der Expression des Fas-Liganden, jedoch scheint der Fas-Ligand keine wesentliche Rolle bei Hyperoxie induzierter Apoptose inne zu haben. Somit kann nach Hyperoxie der Weg einer JNK-Aktivierung, mit darauf folgender Expression des Fas-Liganden und einer Fas-Ligand abhängigen Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose nicht als wesentliche Ursache für den Zelluntergang erhalten. Für die durch JNK beeinflusste Proteinexpression von Fas konnte an einem hypoxisch/ischämischen Modell am Mausgehirn nachgewiesen werden, dass die Expression durch das schädigende Ereignis anstieg und durch Inhibition von JNK der Anstieg der Expression von Fas signifikant geringer ausfiel. In diesem Modell konnte auch eine Regulation des mitochondrialen Signalweges durch JNK im Rahmen der Translokation von Bax und Bim in die Mitochondrien nachgewiesen werden¹²⁶. Solche Auswirkungen der JNK-Aktivierung nach Hypoxie sind auch nach Hyperoxie denkbar.

Neben apoptotischen werden durch JNK aber auch physiologische Prozesse vermittelt. So beteiligt sich JNK auf essentielle Art an der durch NGF eingeleiteten Neuritenausbildung und deren Verlängerung an PC12-Zellen und an der Differenzierung von primären Neuronen des Hippocampus und von Astrozyten¹²⁷. Auch durch Hyperoxie konnte eine Neuritogenese an PC12-Zellen herbeigeführt werden¹²⁸. Nach Zugabe des selektiven JNK-Inhibitors SP600125 zu den PC12-Zellen konnte die durch Hyperoxie ausgelöste Neuritenausbildung gehemmt werden. Die genaue Rolle des Proteins JNK und seiner Aktivierung nach Hyperoxie ist noch nicht vollständig geklärt. Ein Nachweis einer zur Apoptose führenden Rolle von JNK nach Hyperoxie steht noch aus. Eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von neuronalen und glialen Zellen nach Hyperoxie ist denkbar und ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Forschungsarbeiten.

6 Zusammenfassung

Trotz intensivmedizinischer Fortschritte geht die sinkende Mortalität von Frühgeborenen weiter mit einer hohen Rate neurologischer Defizite und neurosensorischer sowie motorischer Beeinträchtigungen einher. Im unreifen Gehirn von Nagetieren sind über das physiologische Maß hinausgehende Sauerstoffkonzentrationen ursächlich für erhöhte Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten. Die molekularen Mechanismen der durch Sauerstoff getriggerten Neurodegeneration sind weitgehend unbekannt. Diese Arbeit soll den Einfluss der durch den Fas-Rezeptor aktivierten Signalwege nach Hyperoxie aufzeigen.

6 Tage alte Wistar-Ratten wurden dabei für 2 bis 72 Stunden einer Atmosphäre mit 80 % Sauerstoffgehalt ausgesetzt. In den untersuchten Hirnregionen Cortex und Thalamus zeigte sich ein Anstieg auf mRNA- wie Proteinebene von Fas und Fas-Ligand. Auch die Konzentrationen von FADD, Caspase-8 und Caspase-3, also von Proteinen des durch Fas eingeleiteten, apoptotischen Signalweges zeigten einen Anstieg nach Sauerstoffexposition. Durch Hemmung der Caspase-8 durch den selektiven Inhibitor TRP801 kam es zu neuroprotektiven Effekten. Auch das Protein JNK, das über zwei weitere Signalwege von Fas zur Apoptose führt, zeigte unter Hyperoxie eine erhöhte Konzentration und Aktivierung. Anhand eines Modells mit PC12-Zellkulturen konnte ein Beispiel eines nicht zur Apoptose, sondern zur Differenzierung führenden Einflusses von JNK unter Hyperoxie aufgezeigt werden. PC12-Zellen differenzierten sich unter Hyperoxie, durch Hemmung von JNK durch den selektiven Inhibitor SP600125 konnte diese Differenzierung gehemmt werden.

Anhand von Mäusen, denen der funktionelle Fas-Rezeptor (*B6.MRL-Tnfrsf6lpr*) bzw. Fas-Ligand (*B6Smn.C3-FasLgld*) fehlt, konnte der Einfluss von Fas auf sauerstoffinduzierte Apoptose bestätigt werden. Die Tiere wurden ebenso wie Wildtyp *C57BL/6* Mäuse für 24 Stunden 80 % Sauerstoff ausgesetzt. *B6.MRL-Tnfrsf6lpr* Mäuse waren vor der Neurotoxizität des Sauerstoffs weitgehend geschützt, während Mäuse ohne Fas-Liganden ähnliche Zelltodraten wie die Kontrolltiere aufwiesen.

Aus den vorliegenden Daten kann man schließen, dass der Fas-Rezeptor und durch ihn aktivierte Signalkaskaden an apoptotischer Neurodegeneration nach Hyperoxie im neonatalen Gehirn von Nagetieren beteiligt sind. Möglichen proliferativen bzw. zur Differenzierung führenden Effekten einer Aktivierung von Fas muss weiter nachgegangen werden. Eine Neuroprotektion nach Hyperoxie konnte im Modell durch das Fehlen des Fas-Rezeptors und durch selektive Inhibition der Caspase-8 erreicht werden.

7 Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen

ANOVA	Analysis of Variance
BSA	Bovine Serum Albumin
CRD	Cysteine-rich Domain
cDNA	complementary DNA
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-inducing signalling complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
FADD	Fas-associated Death Domain
FAP-1	Fas-associated Phosphatase
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FLICE	FADD-like interleukin-1 β converting enzyme
FLIP	FLICE-inhibitory protein
HS	Horse Serum
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kDa	kiloDalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MKK	MAPK kinase
NGF	Nerve Growth Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate buffered saline
RIP	Receptor-interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TBS	Tris Buffered Saline
Upm	Umdrehungen pro Minute

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 1.1 Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums	3
Abb. 1.2 Zwei Wege in den programmierten Zelltod	5
Abb. 1.3 Fas-Signalwege zur Apoptose	7
Abb. 1.4 Lineare Darstellung des molekularen Aufbaus des Fas-Rezeptors	8
Abb. 1.5 Aktivierung und Internalisierung des DISC	11
Abb. 3.1 Inkubator mit Sauerstoffkonzentrations-Messgerät	16
Abb. 3.2 Flussdiagramm zur Darstellung der Untersuchung der Genexpression	22
Abb. 3.3 Flussdiagramm zur Darstellung der Untersuchung der Proteinexpression	31
Abb. 4.1 Nachweis der Integrität der RNA	50
Abb. 4.2 Hyperoxie verstärkt die Expression von Fas mRNA	50
Abb. 4.3 Hyperoxie verstärkt die Expression von Fas auf Proteinebene	51
Abb. 4.4 Hyperoxie verstärkt die Expression von FasL mRNA	52
Abb. 4.5 Hyperoxie verstärkt die Expression von FasL auf Proteinebene	53
Abb. 4.6 Hyperoxie verstärkt die Expression von FADD auf Proteinebene	54
Abb. 4.7 Hyperoxie verstärkt die Expression von Caspase-8 auf Proteinebene	55
Abb. 4.8 Hyperoxie verstärkt die Expression von FLIP auf Proteinebene	56
Abb. 4.9 Hyperoxie verstärkt die Expression von Caspase-3 auf Proteinebene	57
Abb. 4.10 Proteinexpression und Phosphorylierung von JNK nach Hyperoxie	59
Abb. 4.11 Wirkung des Caspase-8 Inhibitors TRP801	60
Abb. 4.12 Apoptoseraten nach Hyperoxie	61
Abb. 4.13 Morphologie von PC12 Zellen	63

8.2 Tabellen

Tab. 3.1	Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratation	18
Tab. 3.2	Entparaffinisierung der Proben	19
Tab. 3.3	Ansatz zur DNase I Behandlung	24
Tab. 3.4	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription	25
Tab. 3.5	Master Mix der Reversen Transkription	25
Tab. 3.6	Allgemeines Verlaufsschema der PCR	26
Tab. 3.7	PCR-Ansatz für Fas-Rezeptor	26
Tab. 3.8	PCR-Ansatz für Fas-Ligand	27
Tab. 3.9	Eingesetzte Primer	27
Tab. 3.10	Polyacrylamid-Gellösung	28
Tab. 3.11	Molekulargewichtsstandard für Polyacrylamidgel	29
Tab. 3.12	Schema der Silberfärbung	29
Tab. 3.13	Proben für die Gelelektrophorese	33
Tab. 3.14	Verwendete primäre Antikörper	34
Tab. 3.15	Verwendete sekundäre Antikörper	35
Tab. 3.16	Zellkulturmedium für PC12-Zellen	36
Tab. 3.17	Reduziertes Zellkulturmedium für PC12-Zellen	37
Tab. 3.18	Versuchsaufbau	37
Tab. 4.1	Apoptoseraten in kortikalen und thalamischen Regionen	62

9 Literaturverzeichnis

1. Darlow BA, Cust AE, Donoghue DA, Improved outcomes for very low birthweight infants: evidence from New Zealand national population based data. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2003. **88**(1):F23-8.
2. Sinn JK, Ward MC, Henderson-Smart DJ, Developmental outcome of preterm infants after surfactant therapy: systematic review of randomized controlled trials. *J Paediatr Child Health*, 2002. **38**(6):597-600.
3. Emsley HC, Wardle SP, Sims DG, Chiswick ML, D'Souza SW, Increased survival and deteriorating developmental outcome in 23 to 25 week old gestation infants, 1990-4 compared with 1984-9. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1998. **78**(2):F99-104.
4. Saigal S, Hoult LA, Streiner DL, Stoskopf BL, Rosenbaum PL, School difficulties at adolescence in a regional cohort of children who were extremely low birth weight. *Pediatrics*, 2000. **105**(2):325-31.
5. Mikkola K, Ritari N, Tommiska V, et al., Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996-1997. *Pediatrics*, 2005. **116**(6):1391-400.
6. Iwamoto HS, Teitel D, Rudolph AM, Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatr Res*, 1987. **22**(6):634-40.
7. Bancalari E, Gerhardt T, Bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Clin North Am*, 1986. **33**(1):1-23.
8. Ben Sira I, Nissenkorn I, Kremer I, Retinopathy of prematurity. *Surv Ophthalmol*, 1988. **33**(1):1-16.
9. Saugstad OD, Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr Scand*, 1990. **79**(10):881-92.
10. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD, Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002. **181**(1):60-7
11. Bostek CC, Oxygen toxicity: an introduction. *AANA J*, 1989. **57**(3):231-7
12. Pierce MR, Bancalari E, The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*, 1995. **19**(6):371-8
13. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF, Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol*, 1996. **114**(10):1210-7.

14. Aiello LP, Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res*, 1997. **29**(5):354-62.
15. Cadenas E, Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989. **58**:79-110
16. Dani C, Cecchi A, Bertini G, Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr*, 2004. **56**(4):381-94
17. Halliwell B, Gutteridge JM, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 1990. **186**:1-85
18. Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS, Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(10):4765-9.
19. Sayre LM, Smith MA, Perry G, Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem*, 2001. **8**(7):721-38
20. Bowling AC, Beal MF, Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci*, 1995. **56**(14):1151-71
21. Olanow CW, A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 1993. **16**(11):439-44
22. Liu D, Wen J, Liu J, Li L, The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J*, 1999. **13**(15):2318-28.
23. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF, Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol*, 1999. **9**(1):147-6.
24. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M et al., Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis*, 2004. **17**(2):273-82.
25. Saugstad OD, Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics*, 2001. **108**(5):1203-5
26. Dobbing J, The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*, 1974. **53**(1):2-6
27. Dobbing J, Sands J, Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 1979. **3**(1):79-83
28. Northington FJ, Ferriero DM, Martin LJ, Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell death. *Dev Neurosci*, 2001. **23**(3):186-91.
29. Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al., N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5):2508-13.

30. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al., Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(23):15089-94.
31. Gottlieb A, Keydar I, Epstein HT, Rodent brain growth stages: an analytical review. *Biol Neonate*, 1977. **32**(3-4):166-76.
32. Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W, Apoptosis: live or die--hard work either way! *Horm Metab Res*, 2001. **33**(9):511-9
33. Hengartner MO, The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. **407**(6805):770-6
34. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995. **267**(5203):1456-6
35. Kiess W, Gallaher B, Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*, 1998. **138**(5):482-91
36. Ashkenazi A, Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. **281**(5381):1305-8
37. Thorburn A, Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 2004. **16**(2):139-44
38. Adams JM, Cory S, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998. **281**(5381):1322-6
39. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X, An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 1999. **274**(17):11549-56.
40. Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC, Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci*, 1999. **19**(5):1754-70.
41. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V et al., Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med*, 1996. **184**(6):2361-70.
42. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F, FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*, 1999. **27**(1):62-74.
43. Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, et al., Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol*, 2000. **10**(1):17-29.
44. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, et al., Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis*, 2002. **11**(2):231-45.
45. Trauth BC, Klas C, Peters AM, et al., Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 1989. **245**(4915):301-5.

46. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1989. **169**(5):1747-56.
47. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, et al., Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, 1995. **373**(6513):441-4.
48. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D, Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 1997. **89**(7):1067-76.
49. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al., FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 1996. **271**(9):4961-5.
50. Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC, FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*, 1995. **268**(5209):411-5.
51. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B, RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 1995. **81**(4):513-23.
52. Ivanov VN, Lopez Bergami P, Maulit G, Sato TA, Sassoon D, Ronai Z, FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(10):3623-35.
53. Lambert C, Landau AM, Desbarats J, Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis*, 2003. **8**(6):551-62.
54. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 1993. **75**(6):1169-78.
55. Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ*, 2003. **10**(11):1215-25.
56. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, et al., Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(4):1428-40.
57. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD, Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*, 1994. **263**(5154):1759-62.
58. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ, A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 2000. **288**(5475):2351-4.

59. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ et al., Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8):7218-27.
60. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW, NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 1996. **384**(6610):638-41.
61. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV, A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 1993. **74**(5):845-53.
62. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 1995. **81**(4):505-12.
63. Kim KS, Multifunctional role of Fas-associated death domain protein in apoptosis. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(1):1-6.
64. Jeong EJ, Bang S, Lee TH, Park YI, Sim WS, Kim KS, The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23):16337-42.
65. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell*, 2006. **22**(5):599-610.
66. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME et al., FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 1998. **279**(5358):1954-8.
67. Alnemri ES, Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 1997. **64**(1):33-42
68. Eckhart L, Ballaun C, Hermann M et al., Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol*, 2008. **25**(5):831-41.
69. Thornberry NA, Lazebnik Y, Caspases: enemies within. *Science*, 1998. **281**(5381):1312-6.
70. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997. **388**(6638):190-5.
71. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC et al., FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 1997. **16**(10):2794-804.
72. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME, Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(1):207-20.
73. Thome M, Schneider P, Hofmann K et al., Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 1997. **386**(6624):517-21.

74. Li FY, Jeffrey PD, Yu JW, Shi Y, Crystal structure of a viral FLIP: insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling. *J Biol Chem*, 2006. **281**(5):2960-8
75. Micheau O, Thome M, Schneider P et al., The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47):45162-71.
76. Peter ME, The flip side of FLIP. *Biochem J*, 2004. **382**(Pt 2):e1-3.
77. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M, Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, 1993. **7**(11):2135-48.
78. Davis RJ, MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*, 1994. **19**(11):470-3.
79. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, 1997. **389**(6653):865-70.
80. Tournier C, Hess P, Yang DD, Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 2000. **288**(5467):870-4.
81. Curtin JF, Cotter TG, Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, 2003. **15**(11):983-9
82. Davis RJ, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 2000. **103**(2):239-52.
83. Ip YT, Davis RJ, Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2):205-19
84. Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*, 2001. **21**(19):7551-60.
85. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB, Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2001. **4**(3):313-32
86. Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, et al., Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42):27084-90.
87. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, et al., Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*, 1998. **187**(4):587-600.
88. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, et al., Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*, 1997. **272**(15):9677-82.

89. Schwerk C, Schulze-Osthoff K, Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(8):1453-8.
90. Dash PK, Blum S, Moore AN. Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport*, 2000. **11**(12):2811-6.
91. Acarin L, Villapol S, Faiz M, et al., Caspase-3 activation in astrocytes following postnatal excitotoxic damage correlates with cytoskeletal remodeling but not with cell death or proliferation. *Glia*, 2007. **55**(9):954-65.
92. Mountz JD, Edwards CK 3rd., Murine models of autoimmunity: T-cell and B-cell defects. *Curr Opin Rheumatol*, 1992. **4**(5):612-20
93. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 1994. **76**(6):969-76.
94. Suda T, Nagata S, Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **100**(6 Pt 2):S97-101
95. Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ*, 2006. **13**(1):31-40.
96. Schmued LC, Hopkins KJ, Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 2000. **874**(2):123-30.
97. West MJ, Gundersen HJ, Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*, 1990. **296**(1):1-22.
98. Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1):156-9.
99. Lohmann J, Schickle H, Bosch TC, REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques*, 1995. **18**(2):200-2.
100. Greene LA, Tischler AS, Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(7):2424-8.
101. Hirata Y, Adachi K, Kiuchi K, Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *J Neurochem*, 1998. **71**(4):1607-15.
102. Kang CD, Jang JH, Kim KW, et al., Activation of c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase and the decreased ratio of Bcl-2 to Bax are associated with the auto-oxidized dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurosci Lett*, 1998. **256**(1):37-40.
103. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA, The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*, 1999. **22**(4):667-76.

104. Waetzig V, Herdegen T, The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neurogenesis and converges at the level of target proteins. *Mol Cell Neurosci*, 2003. **24**(1):238-49.
105. Chang L, Jones Y, Ellisman MH, et al., JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell*, 2003. **4**(4):521-33.
106. Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, et al., Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem J*, 1999. **338**(Pt2):465-70.
107. Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, et al., Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, 1996. **271**(51):33018-25.
108. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O, et al., Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol*, 2005. **57**(1):50-9.
109. Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A, et al., Hyperoxic exposure leads to nitrate stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke*, 2006. **37**(11):2807-15.
110. Graham EM, Sheldon RA, Flock DL, et al., Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis*, 2004. **17**(1):89-98.
111. Gerstner B, Sifringer M, Dzierko M, et al., Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol*, 2007. **61**(6):562-73.
112. Park SM, Schickel R, Peter ME, Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(6):610-6.
113. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, et al., The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*, 2007. **129**(3):447-50.
114. Mundle SD, Raza A, Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation. *Trends Immunol*, 2002. **23**(4):187-94.
115. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, et al., Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000. **288**(5475):2354-7.
116. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, et al., Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*, 1995. **270**(1):387-91.

117. Micheau O, Solary E, Hammann A, et al., Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem*, 1999. **19**;274(12):7987-92.
118. Aragane Y, Kulms D, Metz D, et al., Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol*, 1998. **140**(1):171-82.
119. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 1998. **17**(6):1675-87.
120. Wang X, Ryter SW, Dai C, Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31):29184-91.
121. Wang X, Wang Y, Kim HP, FLIP inhibits endothelial cell apoptosis during hyperoxia by suppressing Bax. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(10):1599-609.
122. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR, Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*, 2003. **17**(1):64-6.
123. Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene*, 2003. **22**(55):8939-47.
124. Gómez-Angelats M, Cidlowski JA, Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48):44944-52.
125. Nakajima A, Komazawa-Sakon S, Takekawa M, et al., An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J*, 2006. **25**(23):5549-59.
126. Gao Y, Signore AP, Yin W, et al., Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005. **25**(6):694-712.
127. Gelderblom M, Eminel S, Herdegen T, et al., c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton--functions beyond neurodegeneration. *Int J Dev Neurosci*, 2004. **22**(7):559-64.
128. Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, et al., Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **241**(2):347-51.

Danksagung

Ein ganz großer Dank geht an meine Betreuerin und Doktormutter Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Müser für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe dieses Dissertationsvorhaben realisieren zu können, für ihre vielfältige Unterstützung sowie ihre höchst intensive und exzellente Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke auch Prof. Dr. Christoph Bühner für die unzähligen fruchtbaren Diskussionen während meiner Zeit am Universitätskinderspital in Basel.

Besonders dankbar bin ich auch Dr. Mark Dzierko und Marco Sifringer, die mir seit meinen ersten Gehversuchen im Labor stets geduldig mit fachlicher sowie praktischer Beratung zur Seite standen und die Realisierung dieser Arbeit erst ermöglichten.

Rodica Altmann sorgte stets für außergewöhnliche Arbeitsbedingungen im Labor. Ihr danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Doktoranden Lasse Dührsen, Oliver Polley und Alexandra Schüller für die freundschaftliche, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die gute Kooperation beim gegenseitigen Anlernen in neuen experimentellen Methoden.

Ebenso danke ich Antje Thiele für ihre Hilfe bei der grafischen Erstellung der Abbildungen des ersten Kapitels und Romy Meißner für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung während des Studiums und des Promotionsvorhabens.

Erklärung

Ich, Vinzenz Boos, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Aktivierung der Fas (Apo-1/CD95) Signaltransduktion durch Hyperoxie im neonatalen Gehirn von Nagetieren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 07.11.2008

Vinzenz Boos

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.
