

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Folgende Geräte sind bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendet worden:

- Blotkammer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Brutschrank, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
- Einmal-Injektionskanülen, Braun, 0,9 x 70 mm, Melsungen, Deutschland
- Einmalpipetten, Falcon, 1 - 2 - 5 - 10 - 25 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Falcon, 5 - 15 - 50 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalspritzen, Braun, 10 ml, Melsungen, Deutschland
- ElectrophoresisPower Supply, Bio-Rad, Modell 3000xi, Hercules, USA
- Elektrophorese-Kammer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Entwicklungsmaschine, Kodak, X-OMAT 5000RA, Stuttgart, Deutschland
- Geldokumentationssystem, Biometra, BioDocAnalyze, Göttingen, Deutschland
- Kulturflaschen, Falcon, 25 - 75 cm², Lincoln Park, USA
- Kulturplatten, Falcon, 6-Well / 96-Well, Lincoln Park, USA
- Laborwaagen, Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
- Laminar-Flow-Bench, Heraeus Instruments, HB 2448, Fellbach, Deutschland
- Mikroskop, Olympus Europa GmbH, Modell CH 2 und Modell CK 2, Hamburg, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
- pH-Meter, Hanna Instruments, Modell pH 211, Kehl am Rhein, Deutschland
- Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettierhilfe, Hirschmann, Modell Pipetus-Aku, Eberstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen, Eppendorf, Modell Pipetman P, Hamburg, Deutschland
- Röntgenfilme, Amersham, Freiburg, Deutschland
- Schlauchpumpe, Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
- Tischzentrifuge, Heraeus Instruments, Modell Megafuge 1.0R, Fellbach, Deutschland
- Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, USA
- Vortex, Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Wärmebad, GFL, Burgwedel, Deutschland
- Wärmeschrank, Binder, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge, Heraeus Instruments, Modell Minifuge GL, Fellbach, Deutschland
- FacScan Flow Cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien sind bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendet worden:

- 1,2-Phenylendiamin, 809721, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Acrylamide, 30%, 161-0158, BioRad, Richmond, USA
- Annexin V-FITC Kit, BMS306FI, Bender MedSystems, Wien, Österreich
- Anti-beta-Tubulin, Isotyp III, Clone SDL.3D10 , T-8660, Sigma, St. Louis, USA
- Anti-rabbit-Ig, HRP linked, NA 934 OV, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- APS, A-3678, Sigma, St. Louis, USA
- BCA-Protein-Assay, 23223, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
- Biotinylated Protein Ladder Detection Pack, 7727, Cell Signaling Technology, Beverly, USA
- Caspase-3 Detection Kit, QIA91, Oncogene/EMD-Biosciences, Darmstadt, Deutschland
- Citronensäure-1-hydrat , 0088, J.T. Baker, Deventer, Holland
- CM-H₂DCF-DA, C6827, Molecular Probes, Oregon, USA
- Collagen S1, 1098 292, Boehringer Mannheim, Deutschland
- Crystal Violet, C-0775, Sigma, St. Louis, USA
- Dinatriumhydrogenphosphat, 6566, Merck, Darmstadt, Deutschland
- DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximine, B-2640, Sigma, St. Louis, USA
- DMSO, D-5789, Sigma, St. Louis, USA
- DTT, D-9163, Sigma, St. Louis, USA
- EDTA, 10964, Merck, Darmstadt, Deutschland
- EGTA, E-3889, Sigma, St. Louis, USA
- Ethanol, 100983, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Fetales Kälberserum, S-0115, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Glycerol, G-8773, Sigma, St. Louis, USA
- Hanks' Salt Solution, L-2015, Biochrom, Berlin, Deutschland
- HSA, OBCA 44, Aventis Behring, Marburg, Deutschland
- Hyperfilm ECL, RPN6K, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- IGEPAL CA-630, I-3021, Sigma, St. Louis, USA

- Isopropanol, 109634, Merck, Darmstadt, Deutschland
- L-Glutamin (200mM), K-0283, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Medium 199 Earle, F-0615, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Methanol, 106009, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mouse IgG2b kappa, M-5534, Sigma, St. Louis, USA
- NaCl, 106404, Merck, Darmstadt, Deutschland
- NGF 7S, 1015 331, Boehringer Mannheim, Deutschland
- PBS mit Ca + Mg, L-1815, Biochrom, Berlin, Deutschland
- PBS ohne Ca + Mg, L-1825, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin, A-2213, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG , 115-035-146, Jackson ImmunoResearch, Soham, Uk
- Pferdeserum, S-9135, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Phospho-p42/44-MAPK-Antikörper, 9101, Cell Signaling Technology, Beverly, USA
- Phospho-p42/44-MAPK-Protein, 9103, Cell Signaling Technology, Beverly, USA
- PMSF, P-7626, Sigma, St. Louis, USA
- Propidiumjodid, P-4170, Sigma, St. Louis, USA
- Ribonuklease A, R-5500, Sigma, St. Louis, USA
- RPMI 1640, 21875-034, Gibco, Paisley, UK
- Salzsäure, 84416, Fluka, Buchs, Schweiz
- SDS, L-4509, Sigma, St. Louis, USA
- Sodium-Deoxycholate, D-6750, Sigma, St. Louis, USA
- Sodiumfluoride, S-6521, Sigma, St. Louis, USA
- Sodium-Orthovanadate, S-6508, Sigma, St. Louis, USA
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, 34075, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
- TEMED, T-7024, Sigma, St. Louis, USA
- Tris(hydroxymethyl)amminomethan, 108382, Merck, Darmstadt, Deutschland

- Triton X-100, 789704, Boehringer Mannheim, Deutschland
- Trockenmilchpulver, 70166, Fluka, Buchs, Schweiz
- Trypan Blue Solution (0,4%), T-8154, Sigma, St. Louis, USA
- Trypsin-EDTA (10x), L-2153, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Tween 20, 170-6531, BioRad, Richmond, USA
- U0126, 9903, Cell Signaling Technology, Beverly, USA
- Wortmannin, 681675, Calbiochem/Merck, Darmstadt
- z-vad-fmk, G-7232, Promega, Madison, USA

2.3 Zellkultur

2.3.1 Nährmedien und Materialien für die Zellkultur

- Nährmedium für undifferenzierte PC12-Zellen: RPMI 1640 + 10% HS + 5% FKS + 0,25% D-Glukose
- Nährmedium für differenzierte PC12-Zellen: RPMI 1640 + 0,5% HS, 0,25% FKS + 0,25% D-Glucose und 100 ng/ml NGF
- NGF-Stammlösung: 10 µg/ml in Aqua dest. + 0,1% BSA, Aufbewahrung bei –20°C, Weiterverdünnung in Nährmedium für differenzierte PC12-Zellen
- Kollagen S: Aufbewahrung als Stocklösung mit 0,3 mg/ml in Aqua dest. bei 4°C. Beschichtung der Kulturplatten/-flaschen mit 30 µg/ml (Weiterverdünnung mit Aqua dest.)
- BSO: Stocklösung 250 mM in Aqua dest., Aufbewahrung bei 4°C, Weiterverdünnung mit Kulturmedium.
- 5 mM EDTA-Lösung in PBS w/o Ca + Mg
- Zählkammer: Neubauer improved

2.3.2 Undifferenzierte Zellen

Die PC12-Zelllinie wurde 1976 von Greene und Tischler aus dem Nebennierenmarktumors (Phäochromozytom) der Ratte isoliert. Seitdem hat sie weltweite Verbreitung als Modell für das Studium neurobiologischer, neurochemischer und entwicklungsneurologischer Prozesse gefunden. Die Zelllinie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. Felderhoff-Mueser zur Verfügung gestellt.

Die Stammkultur wurde in unbeschichteten 75 cm²-Gewebe Kulturfラスchen bei 37°C, 95% Luft,

5% Kohlendioxid gehalten. Hier wuchsen die PC12-Zellen in Suspension, durch Zellteilung etwa alle zwei Tage bildeten sich im Medium schwimmende Zellhaufen. Das Zellkulturmedium bestand aus RPMI 1640 mit 10% HS, 5% FKS und 0,25% D-Glucose. Die Zellen wurden alle 2 – 4 Tage durch Entfernen eines Teils der Stammlösung und Zugabe von frischem Medium in einem Verhältnis von 1:5 minimiert und alle 7 – 8 Tage nach Zentrifugation in eine neue Kulturflasche überführt.

Um die Zellen für die verschiedenen Experimente mit einer definierten Zellzahl auf den entsprechenden Platten auszusäen, wurde die Stammlösung in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 rpm / 8 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 5 – 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die vorhandenen Zellhaufen wurden durch fünfmaliges Ziehen durch eine 0,9 x 70 mm Kanüle mit 10 ml Spritze vereinzelt. Anschließend wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Die in der Stammlösung in Suspension wachsenden Zellen stellten den undifferenzierten Typ dar. Durch Aussaat der Zellen auf Kollagen-S1-beschichteten Platten entstand der adhärent wachsende Typ. Die Zellen proliferierten, differenzierten sich jedoch nicht.

2.3.3 Differenzierte Zellen

Eine Differenzierung der PC12-Zellen wurde durch Zugabe von NGF zum Nährmedium erreicht:

Für den klassischen Weg der Differenzierung der PC12-Zellen wurde 16 – 24 Stunden nach Aussaat auf kollagenbeschichteten Platten das übliche Medium entfernt und durch RPMI 1640 mit 0,5% HS, 0,25% FKS und 0,25% D-Glucose sowie NGF in einer Konzentration von 100 ng/ml ersetzt. Erst dann stellten die PC12-Zellen die Proliferation ein und begannen mit der Ausreifung zum neuronähnlichen Typ. Je nach Versuchsansatz wurde alle 48 – 72 Stunden das Medium gewechselt. Für eine vollständige morphologische Differenzierung war dies über einen Zeitraum von 6-8 Tagen notwendig.

2.3.4 Zelldichte

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer improved-Zählkammer.

Für FACS-Analysen (AnnexinV/Propidiumjodid, aktivierte Caspase-3-FITC, Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid) wurden die PC12-Zellen auf 6-Wellplatten ohne Kollagen-S-Beschichtung (im folgenden: PC12 in Suspension) bzw. mit Kollagenbeschichtung ausgesät. Die Zelldichte für naive PC12 bzw. PC12 mit einmaliger Gabe eines Differenzierungsfaktors war 200.000 Zellen/Well, bei Differenzierung über 6-9 Tage betrug die initiale Zelldichte 100.000 Zellen/Well, jeweils in 1 ml Medium.

Um die optimale Zelldichte für die Zellaktivitätsmessung mit MTT zu finden, wurde zunächst eine Standardkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe erstellt (Zelldichte $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well, nicht dargestellt), Aussaat auf kollagenbeschichteten 96-Well-Platten. Die verwendete Zelldichte von 20.000 Zellen/Well für naive PC12, PC12 mit einmaliger Gabe eines Wachstumsfaktors bzw. Differenzierung über 6-9 Tage lag im linearen Bereich dieser

Standardkurve.

Für Western-Blots wurden die naiven PC12-Zellen in kollagenbeschichteten 25 cm²-Flaschen mit einer initialen Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/Flasche in 5 ml Medium ausgesät.

Am 3. Tag nach Aussaat wurden die Zellen der entsprechenden Behandlung ausgesetzt.

2.4 Kombinierte BSO-/Hyperoxie-Exposition

Untersuchungen wurden jeweils an naiven PC12-Zellen, PC12 mit einmaliger Gabe eines Wachstumsfaktors bzw. nach Differenzierung über 6-9 Tage (adhärent nach Kollagenbeschichtung) durchgeführt. Die Zellen wurden mit steigenden BSO-Konzentrationen (10 – 1000 µM) unterschiedlich lange präinkubiert, es folgte die Hyperoxiebehandlung (80% O₂) über die jeweils angegebenen Zeiträume. Bei Verwendung von 6-Well-Platten wurden 950 µl Medium/Well mit Testsubstanzen hinzugegeben, bei 96-Well-Platten 50 µl und in 25 cm²-Flaschen 2,5 ml. Nach Beendigung der Exposition wurden die Zellen den entsprechenden Untersuchungsmethoden zugeführt.

2.5 Zellaktivitäts-Test (MTT)

- Zellkulturmedium
- MTT- Stammlösung: 5 mg/ml in Aqua dest.
- 10% SDS in Isopropanol + 10 mM HCl

Als Assay für die Wirkung eines zu untersuchenden Agens diente der MTT-Test. Es handelt sich um einen kolorimetrischen nicht-radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen beruht (Abb. 2-1). Die Absorption des entstandenen lila Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 – 600 nm bestimmt, bei der MTT nicht absorbiert. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen mit intakten Mitochondrien aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Viabilität der Zellen (80).

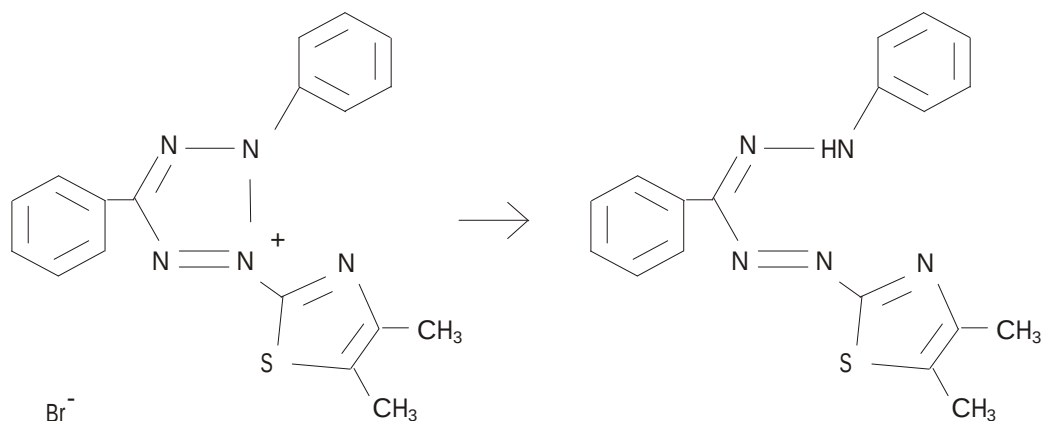


Abb. 2-1: Reduktion von MTT zu Formazan

Der MTT-Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach Beendigung des Versuches erfolgte die Zugabe von 50 µl des entsprechenden Zellkulturmediums per Well (Endvolumen 100 µl). Anschließend wurden 10 µl der MTT- Stammlösung (Endkonzentration 0,5 mg/ml) pro Well zugegeben. Die MTT-Reduktion wurde nach 2–4stündiger Inkubation der Platten bei 37°C durch Zugabe von 100 µl 10% SDS in Isopropanol mit 10 mM HCl beendet. Die Messung der Absorption erfolgte am Folgetag nach Auflösung der Formazankristalle bei 570 nm als Meß-Wellenlänge gegen 630 nm als Referenzwellenlänge mit dem Microplate Reader (Bio-Rad).

2.6 Quantifizierung der Bildung von ROS (CM-H₂DCF-DA-Test)

- CM-H₂DCF-DA (20 x 50 µg): 1 mM-Stock in DMSO, Weiterverdünnung 1:10 in PBS
- PBS (w Ca/Mg)

Um die Bildung von ROS zu quantifizieren, wurde das von Wang et al. entwickelte Verfahren für Microtiter-Patten leicht modifiziert verwendet (81). CM-H₂DCF-DA (Abb. 2-2) kann aufgrund seiner fehlenden Polarität die Membran der Zellen passiv durchdringen. In den Zellen wird der Farbstoff deazetyliert zu nonfluoreszentem CM-H₂DCF, das durch ROS zu fluoreszentem CM-DCF umgesetzt wird. Aufgrund der Polarität des Reaktionsproduktes kann dies die Zellen nicht mehr verlassen. Durch Messung der Fluoreszenz-Intensität mit Hilfe eines CytoFluor Fluoreszenz-Plattenmessgerätes ist es möglich, die entstandenen ROS in den einzelnen Behandlungssträngen zu quantifizieren und zu vergleichen.

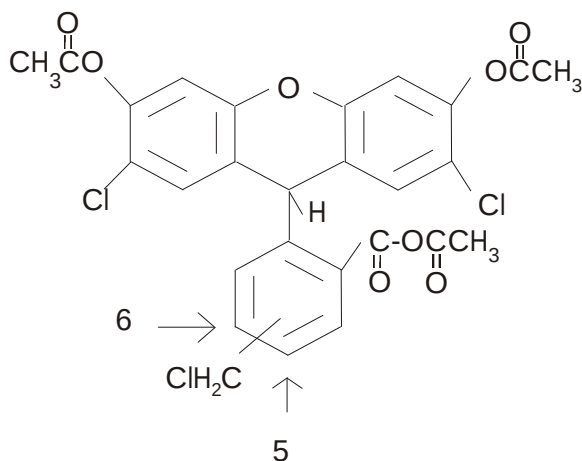


Abb. 2-2: CM-H₂DCF-DA = 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat

Der CM-H₂DCF-DA-Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Die 1 mM CM-H₂DCF-DA-Stammlösung wurde jeweils kurz vor Beendigung der Hyperoxie-Exposition frisch angesetzt und 1:10 in phenolfreiem Zellkulturmedium weiterverdünnt (Endkonzentration 100 µM). Nach Beendigung des Versuches wurde das Zellkulturmedium durch 50 µl der 100 µM CM-H₂DCF-DA-Lösung ersetzt. Nach der Inkubation (45 min, 37°C) wurde die CM-H₂DCF-DA-Lösung wieder entfernt, die Wells wurden 3x mit PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz-Intensität der Wells gemessen (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm) mit Hilfe eines CytoFluor Fluoreszenz-Plattenmessgerätes.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine gute Methode dar, eine hohe Anzahl von Zellen in geringer Zeit in Bezug auf verschiedene zelluläre Parameter (z. B. Volumen, Fluoreszenz nach Fluorochromierung, Absorption) zu erfassen. Hierbei passieren die Zellen einer Suspension nach hydrodynamischer Fokussierung einzeln einen Laserstrahl. Durch zwei Linsen, eine in Richtung des Laserstrahls und die andere in rechtem Winkel dazu positioniert, wird das an der Oberfläche der Zellen und Zellorganellen gestreute Licht gesammelt und nach Passage verschiedener Filter durch Photoröhren und -dioden in einen elektrischen Impuls verwandelt, der mit der Intensität des Lichtsignals korreliert. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Vorwärtsstreulicht (= Forward Scatter) ist proportional zur Zellgröße, während das orthogonal gestreute Licht (= Side Scatter) proportional zur Granularität der Zelle ist. Somit lassen sich verschiedene morphologische Charakteristika der zu untersuchenden Zellen, wie Zellgröße, Gestalt und die Konformation der inneren zellulären Strukturen beurteilen (Abb. 2-3 a). Erweitert wird das Spektrum der mittels Durchflusszytometrie detektierbaren Parameter durch die Möglichkeit der Fluorochromierung. Beispiel für ein häufig verwendetes Fluorochrom ist Fluorescein (= FITC), dessen Emissionswellenlänge bei 530 nm liegt. Das nach entsprechender Exzitation (FITC: 488 nm) emittierte Signal wird gefiltert und dem oben beschriebenen Prinzip entsprechend registriert. Bei Verwendung von Fluorochromen ist es jedoch notwendig, die Autofluoreszenz einer Negativkontrolle, die keinen Fluorochromzusatz enthält, zu bestimmen

und von den Fluorochromsignalen abzugrenzen (Abb. 2-3 b). Durch den Einsatz verschiedener optischer Filter ist es weiterhin möglich, simultan mit 2 oder mehr Fluorochromen zu färben. Bei Simultanfärbung kann die Registrierung der Fluoreszenzsignale nicht nur in dem für die Messung des jeweiligen Fluorochroms vorgesehenen Kanal, sondern teilweise auch in den anderen Kanälen zu Messfehlern führen. Um diese zu minimieren, wird ein gewisser Anteil des jeweiligen Fluoreszenzsignals in den Kanälen proportional zur Fluoreszenzintensität im eigentlich vorgesehenen Kanal subtrahiert. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet.

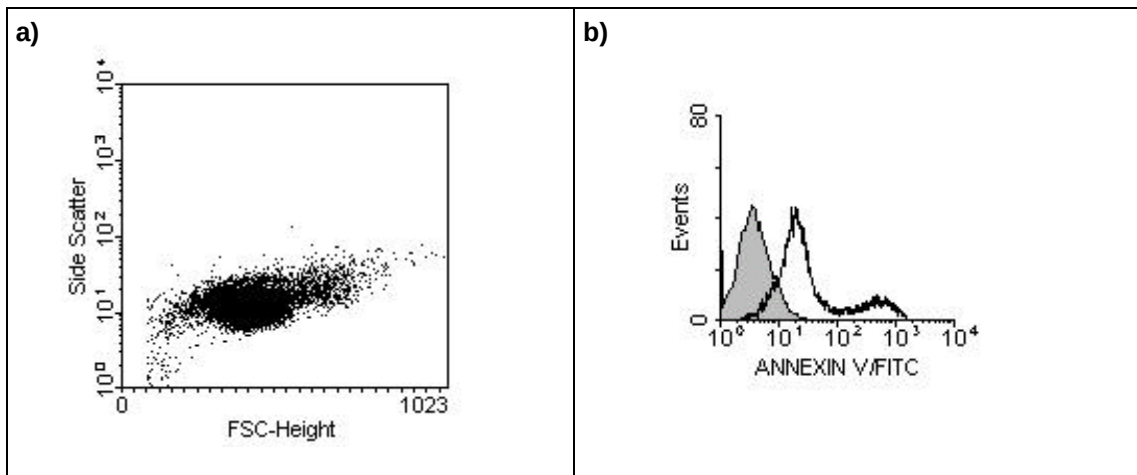


Abb. 2-3 Beispiele für durchflusszytometrische Analysen. a) Registrierung von Vorwärtsstreulicht (= Forward Scatter) und orthogonal gestreutem Licht (= Side Scatter). b) Registrierung der Autofluoreszenz (grau unterlegt) und der Fluoreszenz nach Färbung mit Fluorochromen (hier FITC-markiertes Annexin V, weiss).

Für durchflußzytometrische Analysen in der vorliegenden Arbeit wurde ein FacScan Flow Cytometer (Becton Dickinson), ausgestattet mit einem Argonlaser, verwendet. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson). Es wurden folgende Assays angewendet:

1. Annexin V - FITC/Propidiumjodid
2. Aktivierte Caspase-3-FITC
3. Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid

Für FACS-Analysen wurden die Zellen wie unter 2.4.3 beschrieben auf 6-Wellplatten ausgesät. Nach Versuchsende wurden die Zellen mit 5 mM EDTA-Lösung gelöst und entsprechend Protokoll weiter verarbeitet.

2.7.1 Annexin V - FITC/ Propidiumjodid – Assay

- Waschpuffer = Bindungspuffer: 10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂
- Annexin V-FITC Kit (Bender MedSystems, BMS306FI)

Um in Bezug auf den Mechanismus der Zellschädigung durch Hyperoxie, BSO bzw. die Kombination beider Stressoren zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können, wurde der Annexin V – FITC/Propidiumjodid-Assay verwendet. Annexin hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, die als frühes Ereignis während des programmierten Zelltodes von der Innenseite der Zellmembran nach außen verlagert werden. Die Zellmembran nekrotischer Zellen wird aufgrund gesteigerter Permeabilität durchlässig für Propidiumjodid, so dass diese anhand einer erhöhten PI-Fluoreszenz erkannt werden können. Die Kombination beider Färbemethoden macht es möglich, apoptotische und nekrotische Zellen voneinander zu unterscheiden: frühapoptotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-negativ, Zellen, die sich in einem späteren Stadium der Apoptose befinden, lassen sich sowohl mit Annexin V als auch mit PI anfärben, während nekrotische Zellen nur mit PI färbbar sind. Eine Simultanfärbung ist möglich, da die Annexin V – FITC-Signale in Kanal 1 und die PI-Signale im Kanal 2 des Durchflusszytometers registriert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Annexin V – Assay (Bender Medical Systems) verwendet:

Nach Ablösung der Zellen von der Kulturplatte wurden die Zellen einmalig mit Bindungspuffer gewaschen. Es wurde eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von 200 000 – 500 000/ml hergestellt. 195 µl dieser Suspension wurden in ein Microfuge-Röhrchen überführt und mit 5 µl Annexin V-FITC (Endkonzentration 1 µg/ml) für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Bindungspuffer wurden die Zellen in 195 µl Bindungspuffer resuspendiert und anschließend über 1 Minute mit 5 µl Propidiumjodid (Endkonzentration 1 µg/ml) inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe des FacScan Durchflusszytometers (Becton Dickinson) analysiert. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson). Es wurden jeweils 10 000 Zellen erfaßt, wobei FSC linear und SSC sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert wurden.

Für die weitere Analyse der Daten wurde WIN MDI Flow Cytometry Software verwendet, mit deren Hilfe die entsprechenden Histogramme erstellt wurden. Als Ausgangswert wurde die mediane Fluoreszenz der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂, Medium ohne Testsubstanzen) abzüglich Hintergrundfluoreszenz der ungefärbten Kontrollgruppe bestimmt. Durch entsprechende Behandlung verursachte Änderungen der medianen Fluoreszenz wurden durch Vergleich dieses Ausgangswertes mit dem medianen Fluoreszenzwert der behandelten Gruppe abzüglich Hintergrundfluoreszenz ermittelt.

2.7.2 Aktivierte Caspase 3 – FITC – Assay

- Waschlösung für Aktivierte Caspase-3-Assay: Medium Earle 199 + 1% HSA
- Caspase-3 Detection Kit (Oncogene, QIA91)

Im weiteren Verlauf des apoptotischen Zelltodes kommt es zur Aktivierung von Caspasen (= cysteine aspartate-specific proteases), einer Familie von Proteasen, die ein konserviertes Cystein enthalten und nach Aspartat spalten. Ein Teil dieser Familie stellt wichtige Proteine im

Signaltransduktionsweg der Apoptose dar, wobei Caspase 3 eine Schlüsselstellung einnimmt. Ihre Aktivierung führt zur partiellen oder totalen proteolytischen Spaltung von weiteren Schlüsselenzymen der Apoptose, wie anderen Caspasen, verschiedenen Bestandteilen des Zytoskeletts oder Poly(ADP-ribosyl)polymerase, wobei es sich um ein nukleär vorkommendes Enzym handelt, das zur DNA-Fragmentierung führt.

Mit Hilfe des Activated Caspase 3 – Assay (Oncogene) lässt sich in situ in lebenden Zellen aktivierte Caspase-3 nachweisen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren:

Nach Ablösung der Zellen von der Kulturplatte wurden die Zellen einmalig mit Medium Earle 199 + 1 % HSA gewaschen. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml hergestellt. 300 µl dieser Suspension wurden in ein Microfuge-Röhrchen überführt und mit 0,5 µl FITC-DEVD-FMK für 60 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit dem beigefügten Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden mit Hilfe des FacScan Durchflusszytometers (Becton Dickinson) analysiert. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson). Es wurden jeweils 10 000 Zellen erfasst, wobei Forward Scatter linear und Side Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert wurden.

Für die weitere Analyse der Daten wurde WIN MDI Flow Cytometry Software verwendet, mit deren Hilfe die entsprechenden Dotplots (FITC / Side Scatter) und Histogramme (Events/FITC) erstellt wurden (Abb. 2-4). Als Ausgangswert wurde die mediane Fluoreszenz der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂, Medium ohne Testsubstanzen) abzüglich Hintergrundfluoreszenz der ungefärbten Kontrollgruppe bestimmt, wobei die gemessene mediane Fluoreszenz proportional zum Vorliegen aktivierter Caspase in den zu beurteilenden Zellen ist. Durch entsprechende Behandlung verursachte Änderungen der medianen Fluoreszenz wurden durch Vergleich dieses Ausgangswertes mit dem medianen Fluoreszenzwert der behandelten Gruppe abzüglich Hintergrundfluoreszenz ermittelt.

Durch Festlegen von Regionen in den Dotplots ist es ebenso möglich, die prozentuale Verteilung der Zellen bezüglich aktivierter Caspase und damit Änderungen der Aktivierung durch die Behandlung zu ermitteln (Abb. 2-4).

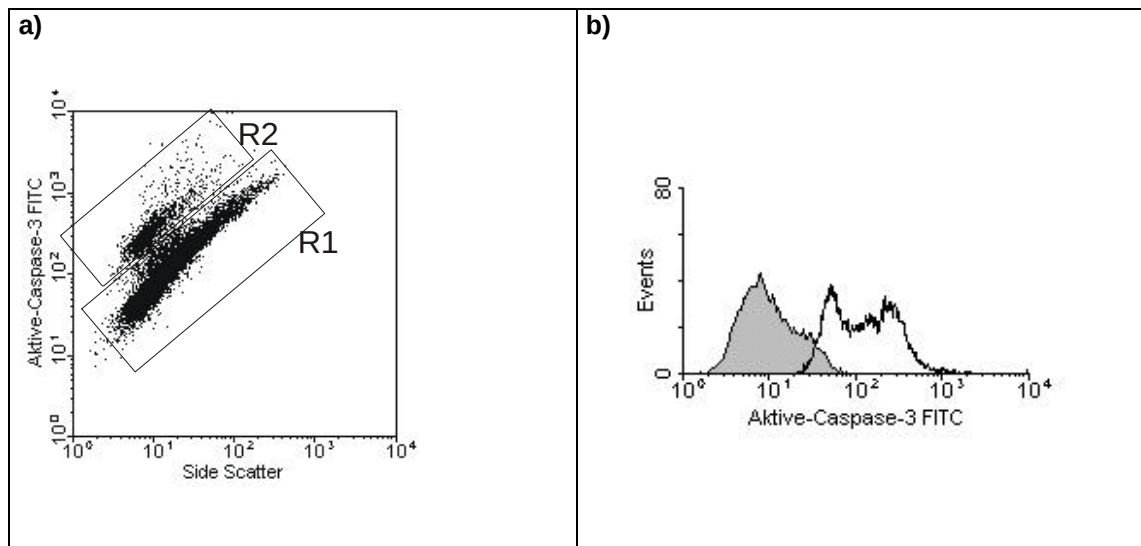


Abb. 2-4: Beispiele für durchflusszytometrische Analysen. a) Registrierung von orthogonal gestreutem Licht (= Side Scatter) und FITC-markiertem aktivierter Caspase-3-Antikörper. Festlegung von Bereichen mit Grundaktivität (R1, hier 81,7%) und aktivierter Caspase 3 (R2, hier 18,3%). b) Registrierung der Autofluoreszenz (grau unterlegt) und der Fluoreszenz nach Färbung mit Fluorochromen (hier FITC-markierter aktiver Caspase-3-Antikörper, weiss).

2.7.3 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid

- 70% Ethanol in Aqua dest.
- HBSS
- PC-Puffer: 192 ml 0,2 M Na_2HPO_4 mit 8 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 7,8)
- RNase A: Stock 10 mg/ml in Aqua dest., Weiterverdünnung auf 0,1 mg/ml in Aqua dest.
- PI: Stock 1,0 mg/ml in Aqua dest. + 0,1% NaN_3 , Weiterverdünnung auf 50 $\mu\text{g/ml}$ in Aqua dest.

Der Lebenszyklus einer Zelle lässt sich in 5 Phasen aufteilen (siehe 1.8 Zellzyklusregulation).

Der für die Zellzyklusanalyse am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumjodid (=PI), ein interkalierend wirkendes Molekül, das stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet. Die Exzitationswellenlänge liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 600 nm. Da PI unspezifisch bindet und daher auch doppelsträngige RNA detektiert werden kann, ist es notwendig, die Zellen vor FACS-Analyse mit RNase zu behandeln, um Messfehler durch eventuell in der Probe vorhandene doppelsträngige RNA auszuschließen.

Wird eine mit PI inkubierte Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert, ist es aufgrund der stöchiometrischen Bindung von PI an doppelsträngige DNA möglich, die Zellen den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen (G0/1: diploid = Chromosomensatz 1n, G2 tetraploid = Chromosomensatz 2n, S = zwischen di- und tetraploid = Chromosomensatz zwischen 1n und 2n, Abb. 2-5, linke Spalte). Mit Hilfe des von Fried et al. (82) beschriebenen mathematischen Modells ist es möglich, die Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen zu berechnen.

Die nach Aktivierung des apoptotischen Programms durch Caspase 3 in ihre aktive Form überführte Poly(ADP-ribosyl)polymerase führt zur DNA-Fragmentierung, sodass Zellen, die sich

in einem mittleren bis späteren Stadium der Apoptose befinden, einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen als diploide Zellen (G0/1-Phase). Diese Zellen stellen sich in der Zellzyklusanalyse mit PI als Sub-G0/1-Peak dar (Abb. 2-5 rechte Spalte).

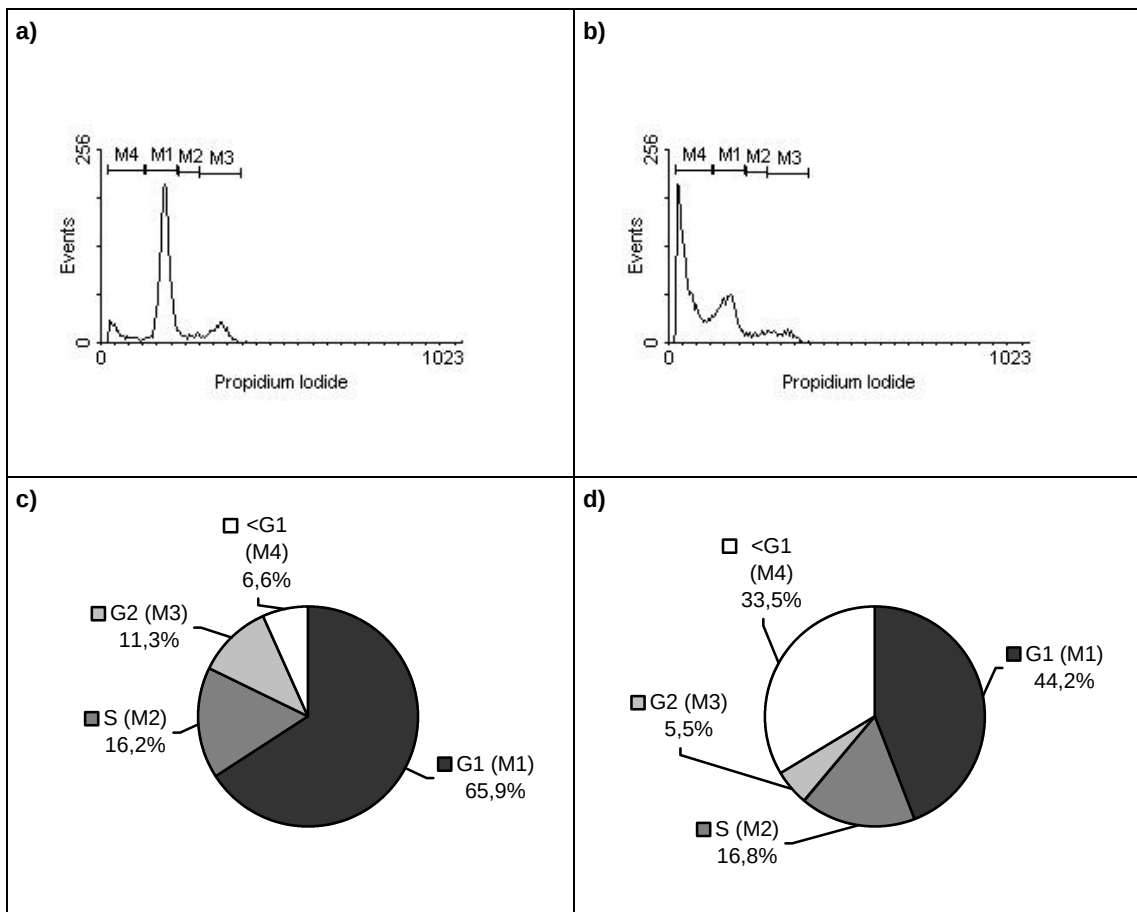


Abb. 2-5 a-b: Beispiele für durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse. M1 = G0/1-Phase, M2 = S-Phase, M3 = G2-Phase, M4 = <G1 (subG1 = apoptotische Zellen). a) Durchflusszytometrisches Profil unbehandelter undifferenzierter PC12-Zellen und (c) Darstellung der entsprechenden prozentualen Verteilung. b) Durchflusszytometrisches Profil undifferenzierter PC12-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 200 nM SSP als Apoptose-Induktor und d) Darstellung der entsprechenden prozentualen Verteilung.

Die Zellzyklusanalyse in der vorliegenden Arbeit wurde nach der Methode von Fried (82) durchgeführt: Nach Ablösung der Zellen von der Kulturplatte wurden die Zellen einmalig mit HSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 120 Minuten bei 4 °C in 5 ml 70% Ethanol fixiert. Nach der Fixierung wurde eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6/\text{ml}$ hergestellt. 500 μl dieser Suspension wurden in ein Microfuge-Röhrchen überführt und einmalig mit HSS gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation mit Phosphat-Citronensäure-Puffer über 5 Minuten. Nach Zentrifugation (2000/min, 5 min) wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet für 10 Minuten mit RNase (50 μl , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Aqua dest.) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μl Propidiumjodid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln). Die Proben wurden mit Hilfe eines FacScan Durchflußzytometers (Becton Dickinson) analysiert. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software

(Becton Dickinson). Es wurden jeweils 20.000 Zellen erfaßt, wobei Forward Scatter linear und Side-Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert wurden. Die Daten wurden mit WinMDI 2.8 und anschließend mit Cylchred.exe weiter bearbeitet.

2.8 Differenzierungsassay

- PBS(+): PBS w 0,9 mM Ca/0,5 mM Mg
- 10 % FKS-PBS(+): PBS(+) + 10 % FKS
- 1 % FKS-PBS(+): PBS(+) + 1 % FKS
- 4% Paraformaldehyd in PBS(+)
- 100 % Methanol
- Primär-AK:
 - beta-III-Tubulin-Ak: Stock 4,6 mg/ml in PBS, Weiterverdünnung 1:800 in 1%FKS-PBS(+) → 5,8 µg/ml
 - Mouse IgG2b (Isotyp-Kontrolle): Stock-Konz. 0,2 mg/ml, Weiterverdünnung 1:34,5 in 1%FKS-PBS(+) → 5,8 µg/ml
- Sekundär-Ak: - Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (800 µg/ml), Weiterverdünnung 1:800 in 1%FKS-PBS(+) → 100 µg/ml
- OPD: 0,4 mg/ml OPD + 0,01 % H₂O₂ in Citrat-Phosphat-Puffer (PC-Puffer)
- Citrat-Phosphat-Puffer: 50 mM, pH 4,8 → mit NaOH einstellen
- 2 N H₂SO₄

Durch Zugabe von NGF zum reduzierten Kulturmedium werden morphologische und biochemische Veränderungen der PC12-Zellen induziert, die typisch für eine neuronale Differenzierung sind. Lichtmikroskopisch kann neben einer Reduktion der Zellteilungsrate das Aussprossen von Neuriten beobachtet werden. Es kommt zu Veränderungen in Enzymmuster und -aktivität (u.a. Inhibition der LDH-Synthese, gesteigerte NADH-Dehydrogenase-Aktivität) sowie zur Expression von neuronenspezifischen zytoskelettalen Markern wie Neurofilament und beta-III-Tubulin.

Im Allgemeinen wird die Differenzierung der PC12-Zellen nach entsprechender Induktion lichtmikroskopisch beurteilt, zum Beispiel durch Bestimmung des Neuriten-Index (=Verhältnis der Zahl der Fortsätze, die länger als der Durchmesser des Zellkörpers sind, zur Zahl der Zellkörper in einem definierten Areal). Da die Bildung von Neuriten dieser Länge jedoch eine NGF-Inkubationszeit von mindestens 72-96 Stunden erfordert, ist diese Methode für den Nachweis der differenzierenden Wirkung von NGF nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden nicht geeignet. Ohuchi et al. (83) etablierten quantitative Verfahren, die Differenzierung von PC12-Zellen anhand der Änderung metabolischer und zytoskelettaler Parameter nachzuweisen. Um den differenzierenden Einfluss von NGF zu quantifizieren, wurde das von Ohuchi et al. entwickelte Verfahren zum Nachweis des neuronenspezifischen beta-III-Tubulin

mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers leicht modifiziert verwendet.

Die Induktion der Differenzierung erfolgte in 96-Well-Platten. Nach der entsprechenden Inkubationsdauer mit NGF (24 h – 7 Tage) wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS(+) für 60 Minuten bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100% Methanol über 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS(+) wurden die Zellen zunächst über 60 Minuten bei 4 °C mit 10%FKS-PBS (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) und anschließend über 60 Minuten bei 4°C entweder mit dem beta-III-Tubulin-Antikörper oder mit dem Isotyp-Antikörper Mouse IgG2b (beide Sigma, Konzentration jeweils 5,8 µg/ml) inkubiert, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 1%FKS-PBS(+). Nach 60minütiger Inkubation der Zellen mit dem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper wurden die Zellen dreimalig mit 1%FKS-PBS(+) und einmalig mit PBS(+) gewaschen. Anschließend wurde bei Raumtemperatur die OPD-Lösung zugegeben. Nach etwa 15 Minuten wurde die Peroxidase-Reaktion mit 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit einem Microplate Reader (Bio-Rad). Um den beta-III-Tubulin-Gehalt zu quantifizieren, wurde die Extinktion der zu untersuchenden undifferenzierten oder differenzierten PC12-Zellen nach Inkubation mit dem beta-III-Tubulin-Antikörper abzüglich Extinktion der Negativkontrolle (IgG2b-Antikörper) bestimmt. Durch NGF induzierte Änderungen wurden durch Vergleich der angegebenen Differenz bestimmt.

Als Ausgangswert wurde die mediane Fluoreszenz der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂, Medium ohne Testsubstanzen) abzüglich Hintergrundfluoreszenz der ungefärbten Kontrollgruppe bestimmt. Durch entsprechende Behandlung verursachte Änderungen der medianen Fluoreszenz wurden durch Vergleich dieses Ausgangswertes mit dem medianen Fluoreszenzwert der behandelten Gruppe abzüglich Hintergrundfluoreszenz ermittelt.

2.9 Westernblot

2.9.1 Proteinextraktion

- 5 mM EDTA-Lösung in PBS w/o Ca + Mg
- RIPA-Puffer: 1% IGEPAL CA-630, 0,5% Sodiumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Sodiumorthovanadat, 20 mM Sodiumfluorid, 0,5 mM DTT in PBS, pH 7.4

Nach Beendigung des Versuches wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit einer 5 mM EDTA-Lösung in PBS w/o Ca/Mg gelöst und in ein Microfuge-Tube überführt. Nach Zentrifugation über 5 min bei 3000xg, 4°C und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zelllyse in 200 µl RIPA-Lysepuffer/Tube (auf Eis, 30 min). Nach erneuter Zentrifugation (3000xg, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in ein 500 µl-Eppendorfgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen. Der Proteingehalt der gewonnenen Suspension wurde mit einem BCA-Protein-Assay nach Pierce bestimmt (siehe 2.9.2). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.9.2 Proteinquantifizierung

- PBS
- BSA-Standard: 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,25 – 0,5 – 1,0 mg/ml BSA in PBS
- BCA-Protein-Assay (Pierce, 23223)

Für die Proteinquantifizierung in den Zellextrakten wurde der BCA-Protein-Assay (Pierce) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren:

Zunächst wurde eine 1:15-Verdünnung mit PBS der zu quantifizierenden Proben hergestellt. Eine Protein-Standardreihe (PBS als Leerwert sowie 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,25 – 0,5 – 1,0 mg/ml BSA enthaltend) und die zu untersuchenden Proben wurden in eine Mikrotiterplatte (96-Well-Platte) pipettiert (4fach-Bestimmung). Nach Zugabe von 150 µl der BC-Assay-Reaktionslösung und einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Extinktionen mit Hilfe eines Microplate Readers (Fa. Bio-Rad) bestimmt. Anschließend wurde die Standardkurve erstellt, die Extinktionswerte der Proben lagen immer im linearen Bereich dieser Standardkurve. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden.

2.9.3 Western Blot Analyse mit Semi-Dry-Transfer der Proteine

- 10xTBS: 88 g Natriumchlorid, 100 ml Tris/HCl (1 mol/l) pH 7,4 – auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- TBS-T (0,1%Tween20): 100 ml 10x-TBS, 1 ml Tween 20 – auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Probenladepuffer: 2 ml 0,625 M Tris/HCl pH 6,8, 0,2 g SDS, 5 ml Glycerin, 0,5 ml beta-Mercaptoethanol, 0,1 ml Bromphenolblau (1% Lsg in Ethanol), 2,4 ml Aqua dest.
- Trenngelpuffer 4x: 1,5 mol/l Tris, 90,8 g Tris, 2 g SDS (=0,4%), pH 8,8 – auf 500 ml mit Aqua dest.
- Sammelgelpuffer 4x: 0,5 mol/l Tris, 30,3 g Tris, 2 g SDS (=0,4%), pH 6,8 – auf 500 ml mit Aqua dest.
- Elektrophoresepuffer 10x: 72,0 g Glycine, 15,15 g Tris, 5 g SDS (=0,1%) – auf 500 ml mit Aqua dest.
- Transferpuffer (semi-dry): 48 mM TrisBase, 39 mM Glycin, 20% Methanol in Aqua dest.
- 0.2% Ponceau S in 3% TCA
- Trockenmilchpulver 5% in TBS/0,1% Tween20
- Primär-AK: - phospho-p42/44-MAPK, rabbit polyclonal, Cell Signaling, 9101, 1:2000 in TBS/0,1% Tween20 + 1% BSA

- Sekundär-AK: - anti-rabbit Ig, HRP-konjugiert, Amersham Biosciences, NA 934 OV, 1:2000 in TBS/0,1% Tween20 + 1% BSA
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, 34075)

Die Proteine (20 µg je Spur) wurden 1:1 in Probenladepuffer nach Hitzedenaturierung auf einem 10,5% SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der Proteine erfolgte halbtrocken (semi-dry) auf Nitrozellulosemembranen, zur Kontrolle des Transfers wurde eine reversible Proteinfärbung mit Ponceau S durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, wurden die Membranen 2 h bei Raumtemperatur mit 5% Trockenmilchpulver in TBS/0,1% Tween20 inkubiert. Nach 4x10minütigem Waschen mit TBS/0,1% Tween20 schloß sich die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4°C an. Nach erneutem Waschen erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper. Die Detektion des Signals erfolgte mit einem ELC-Kit (Fa. Pierce) und Röntgenfilmen, die quantitative Analyse der MAPK-Aktivität wurde mit Hilfe eines Densitometers durchgeführt.

2.10 Software und statistische Analysen

Niederschrift und Layout der Arbeit erfolgte mit dem Textverarbeitungsprogramm WORD (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Die deskriptive Statistik wurde mit EXCEL (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) erstellt. Alle in Diagrammen angegebenen Werte bestehen aus Mittelwert und Standardfehler. Zum statistischen Vergleich der Gruppen wurde, sofern nicht an den Abbildungen anders angegeben, eine Rangsummenvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis angewandt, wobei Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Test nach Dunn berechnet wurden. Als Signifikanzniveau wurde das 95% Konfidenzniveau gewählt, d.h. alle p-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. Signifikanzen sind in den Abbildungen mit * oder # gekennzeichnet.