

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Hyperoxie auf undifferenzierte PC12-Zellen

3.1.1 Hyperoxie führt zu Veränderungen in der Zellzyklusverteilung bei undifferenzierten PC12-Zellen

Alleinige Hyperoxie-Exposition sowohl über 24 als auch über 48 Stunden führt nicht zu einer morphologischen Veränderung der undifferenzierten PC12 Zellen (Abb. 3-3 a-b).

Um untersuchen, welche Auswirkungen Hyperoxie auf den Zellzyklus undifferenzierter PC12-Zellen hat, wurden diese für 24 bzw. 48 h einer Sauerstoffkonzentration von 80% ausgesetzt und anschließend entsprechend 2.7.3 Zellzyklusanalyse mit PI analysiert. Wie in Abbildung 3-1 (linke Spalte) ersichtlich, erhöht sich nach 24stündiger Hyperoxie-Exposition der Anteil der Zellen in der S-Phase mit simultaner Verminderung der Fluoreszenz der Zellen, die sich in der diploiden Ruhephase (G0/1 – M2) befinden, im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂). Noch ausgeprägter ist diese Veränderung nach 48stündiger Hyperoxie-Exposition zu beobachten. Quantitative Analyse der Daten (Abb. 3-1, rechte Spalte) zeigt eine Erhöhung des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, um 20,5% nach 24h Hyperoxie-Exposition und um 34,5% nach 48h Hyperoxie-Exposition, jeweils im Vergleich mit der unbehandelten 21% O₂-Kontrollgruppe. Entsprechend vermindert sich der Anteil der G0/1-Fraktion um 17,2% (24 h Hyperoxie) bzw. 39,1% (48 h Hyperoxie). Der Anteil der Zellen, die sich aufgrund verminderten DNA-Gehalts im Sub-G0/1-Peak darstellen und die apoptotische Fraktion repräsentieren, erhöht sich nur gering nach 24stündiger Hyperoxie-Exposition (+ 1,7%), steigt jedoch nach 48stündiger Hyperoxie-Exposition um 3,9%, jeweils im Vergleich mit der unbehandelten 21% O₂ - Kontrollgruppe.

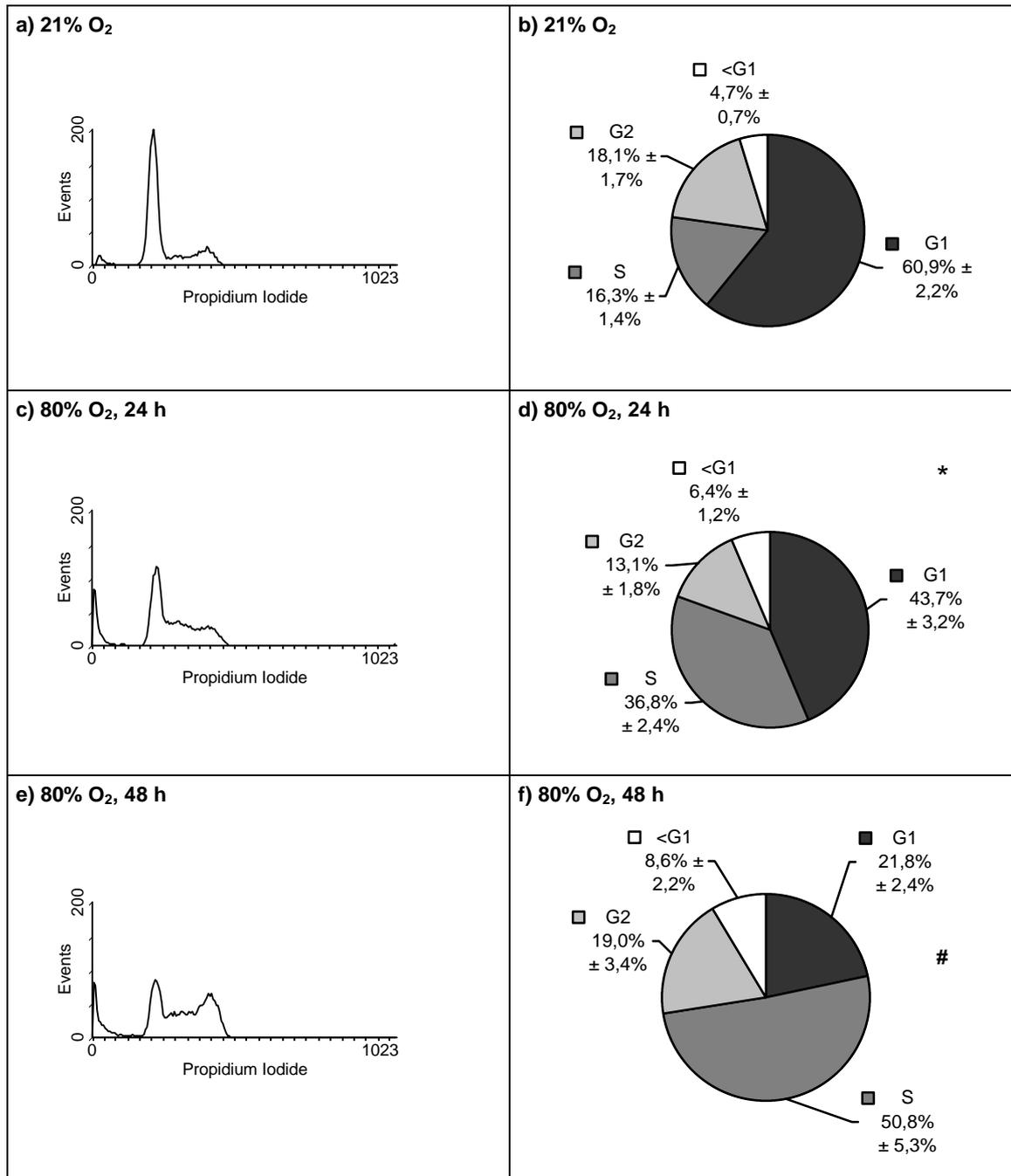


Abb. 3-1: Einfluss von Hyperoxie auf die Zellzyklusverteilung nativer PC12-Zellen. Durchflusszytometrisches Profil sowie quantitative Analyse von undifferenzierten PC12-Zellen bei Raumluft (a + b) und nach 24 h (c + d) bzw. 48 h (e + f) Inkubation bei Hyperoxie, anschließend DNA-Färbung mit Propidiumjodid. a – c – e: Repräsentative Histogramme von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=4. b – d – f: Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G1, S, G2 und subG1 als Mittelwert ± Standardfehler. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=4.

p<0,001 für G1 und p<0,0001 für S bei 24stündiger Hyperoxie-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Raumluftgruppe

p=0,0001 für G1 und p=0,006 für S bei 48stündiger Hyperoxie-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Raumluftgruppe)

3.1.2 BSO erhöht konzentrationsabhängig die Empfindlichkeit undifferenzierter PC12-Zellen gegenüber Hyperoxie (MTT)

In der Literatur gibt es vielfach Hinweise darauf, dass der durch Hyperoxie-Exposition induzierte Zelltod durch Akkumulation von ROS, die zu oxidativem Stress führen, vermittelt wird. Eine Verstärkung des hyperoxiebedingten oxidativen Stresses lässt sich durch Beschränkung der antioxidativen Reserven mit BSO, Inhibitor der GSH-Synthese, erreichen. Um den Effekt von Hyperoxie bei reduzierter antioxidativer Kapazität auf die Zellaktivität undifferenzierter PC12-Zellen zu untersuchen, wurde der MTT-Test durchgeführt. Native PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxie-Exposition mit dem Kulturmedium bzw. mit Medium und BSO in den Konzentrationen 10 μM / 100 μM / 200 μM / 500 μM / 1000 μM präinkubiert (Abb. 3-2). BSO-Behandlung in Normoxie (21% O₂) führte zu einer leichten Reduktion der Zellaktivität und damit der vitalen Zellen, ebenso wie 24stündige Hyperoxie-Exposition allein. PC12-Zellen jedoch, die nach Präinkubation mit BSO einer 24stündigen Hyperoxie-Behandlung ausgesetzt wurden, zeigten konzentrationsabhängig eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen, am ausgeprägtesten bei einer Konzentration von 200 μM BSO (22,7% \pm 3,4% [$p < 0,001$ vs. alle anderen Gruppen]). Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen die Konzentration 200 μM BSO gewählt.

Die Änderung der Vitalität lässt sich auch lichtmikroskopisch darstellen (Abb. 3-3).

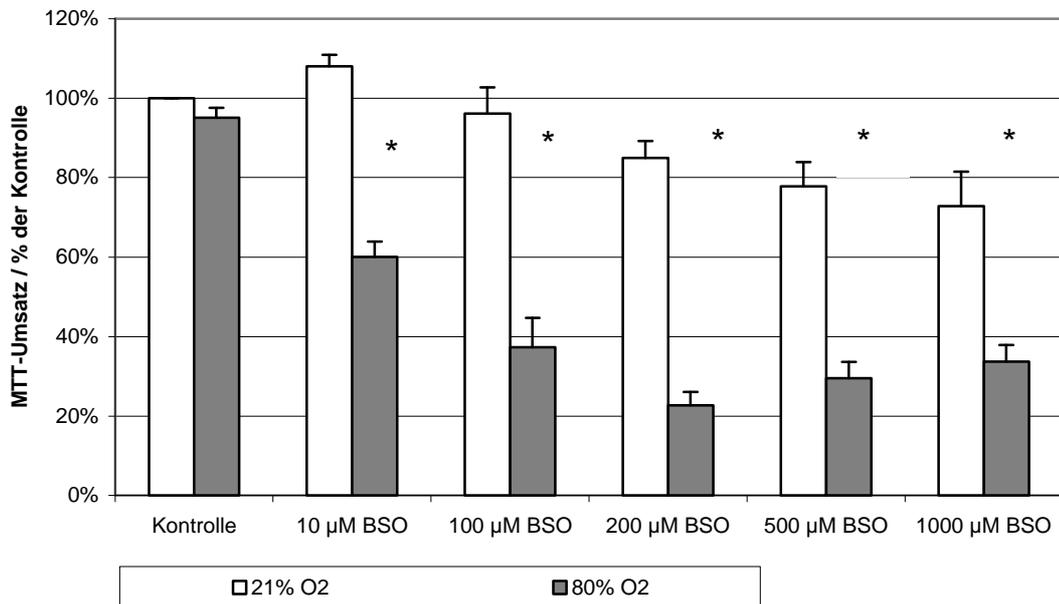


Abb. 3-2: Einfluss von BSO und Hyperoxie auf die Zellaktivität nativer PC12-Zellen. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium oder BSO in der angegebenen Konzentration präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft (helle Balken) oder Hyperoxie (dunkle Balken). Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=6$.

* $p < 0,001$ für angegebene BSO-Konzentration bei 80% O₂ vs. 21% O₂

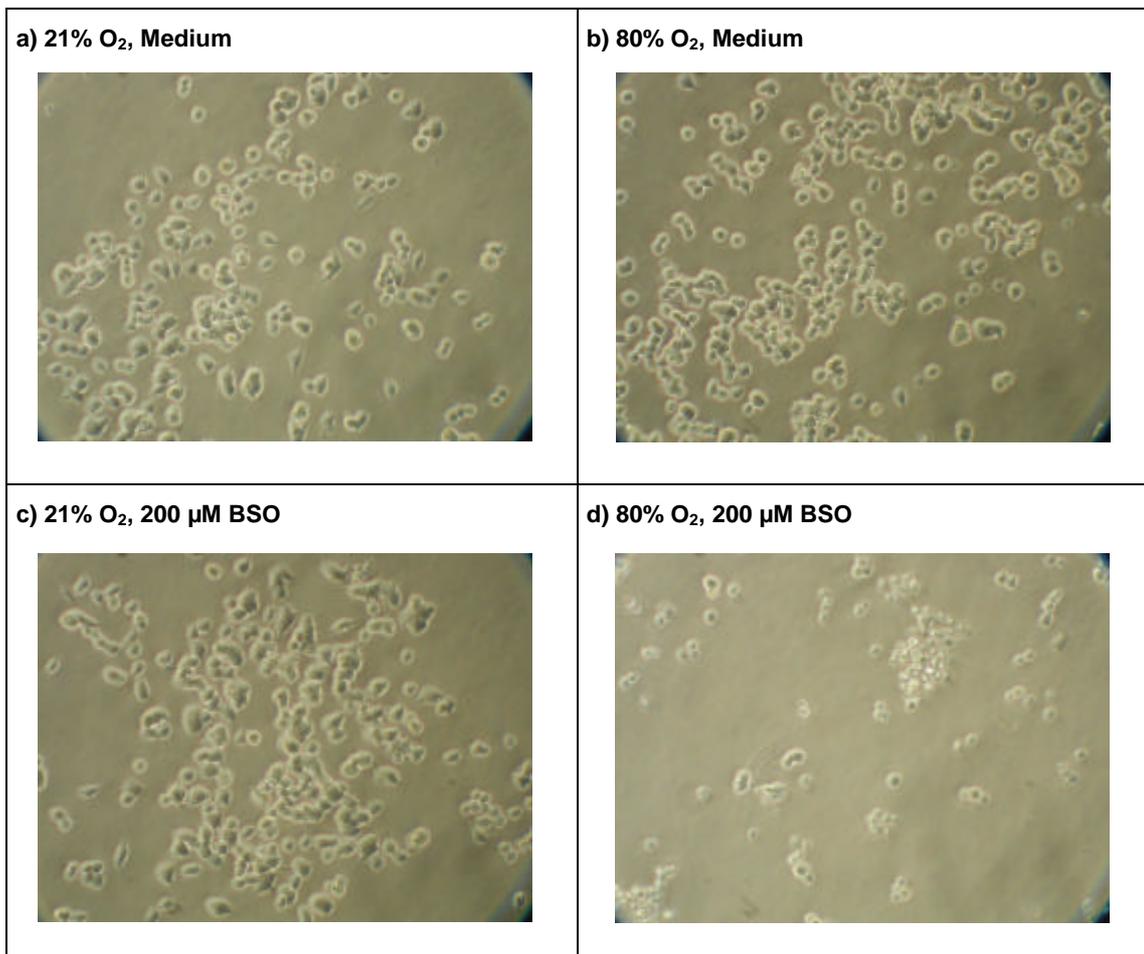


Abb. 3-3: Lichtmikroskopische Darstellung von PC12-Zellen nach kombinierter BSO-Hyperoxie-Exposition. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium (a, b) oder 200 µM BSO (c, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft (a, c) oder Hyperoxie (b, d). Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (V 1:40).

3.1.3 Hyperoxie-induzierte Toxizität ist ROS-vermittelt

Um zu überprüfen, ob Hyperoxie-Exposition undifferenzierter PC12-Zellen tatsächlich zu einer intrazellulären Akkumulation von ROS führt, wurde der CM-H₂DCF-DA-Test durchgeführt. Wie in Abb. 3-4 ersichtlich, führt Hyperoxie-Exposition zeitabhängig zu einer ROS-Akkumulation, die nach 2 Stunden 240,8%±18,1% erreicht und dann wieder etwas abfällt, jedoch nach 24 Stunden immer noch über dem Ausgangsniveau liegt. Präinkubation undifferenzierter PC12-Zellen mit 200 µM BSO über 24 h in Raumluft führt bereits zu einer ROS-Akkumulation (149,7%±6,8%). Anschließende Hyperoxie-Exposition verstärkt zeitabhängig die ROS-Akkumulation, die ihren Gipfel nach 12 Stunden erreicht (355,7%±28,4%) und auf hohem Niveau bleibt.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass der durch kombinierte BSO-Hyperoxie-Exposition undifferenzierter PC12-Zellen induzierte Zelltod durch oxidativen Stress vermittelt ist.

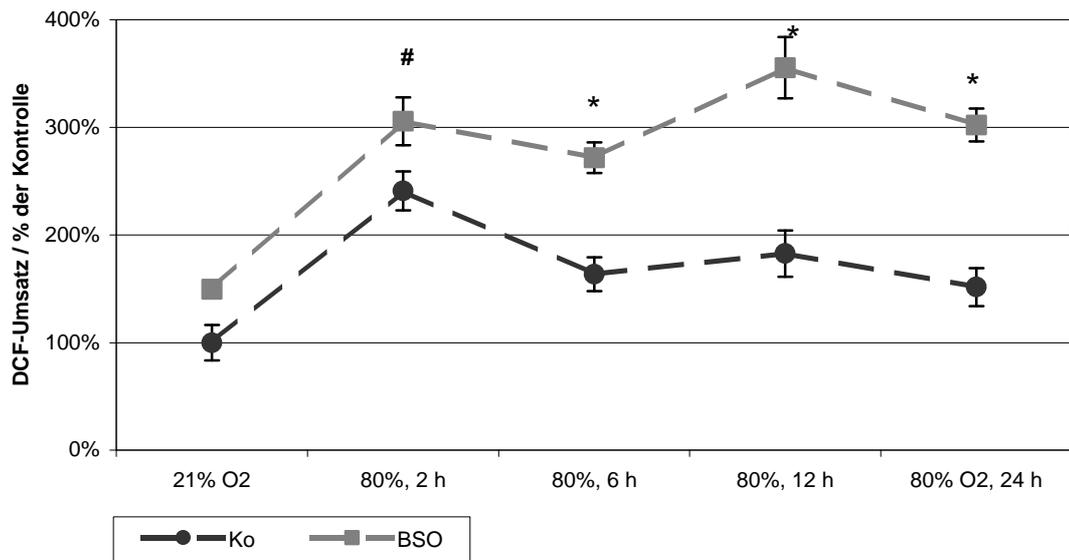


Abb. 3-4: BSO und Hyperoxie induzieren ROS-Akkumulation in nativen PC12-Zellen. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium oder 200 μ M BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft [schwarze Linie] oder Hyperoxie [graue Linie]. Messung des DCF-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

$p < 0,01$ für BSO vs. Kontrolle bei 80% O₂

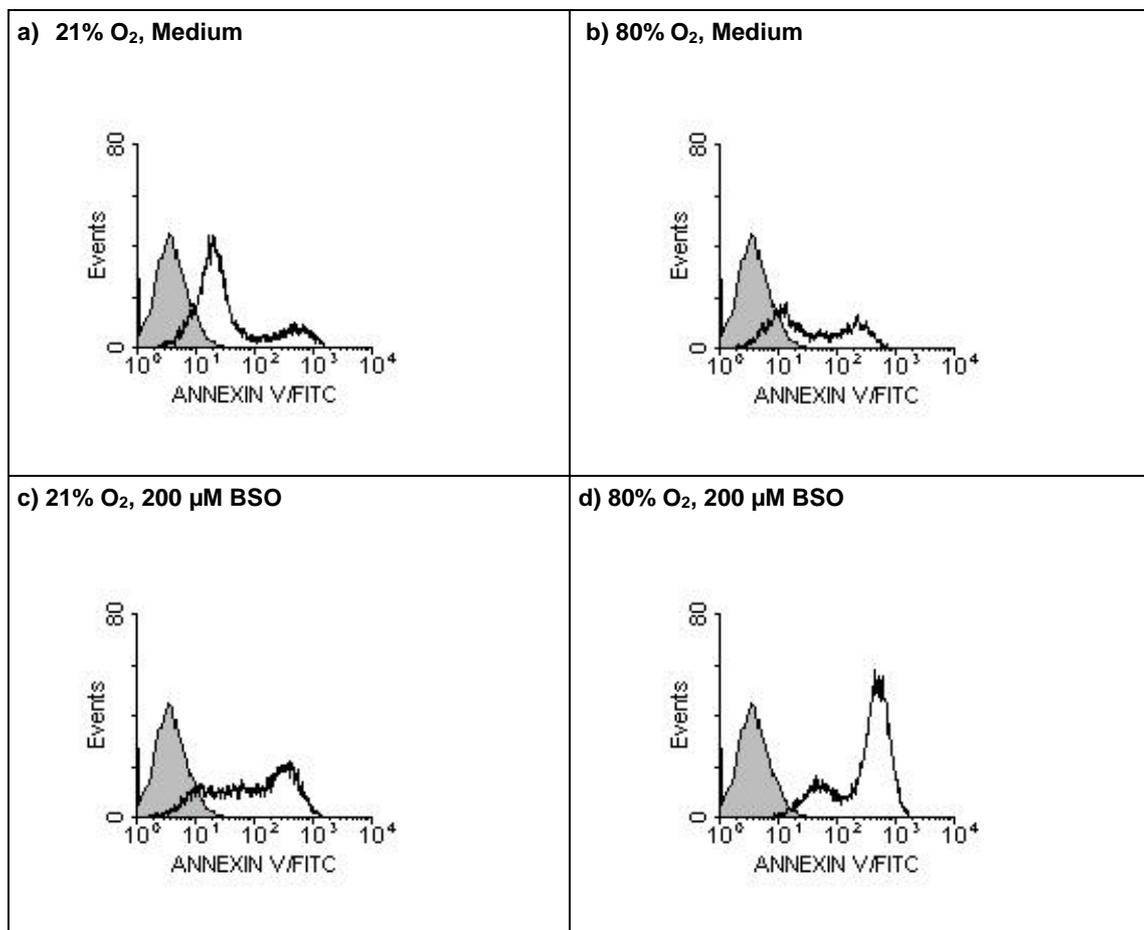
* $p < 0,001$ für BSO vs. Kontrolle bei 80% O₂

3.1.4 Die Kombination Hyperoxie + BSO induziert Apoptose in undifferenzierten PC12-Zellen

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (3.1.1) weisen auf durch Hyperoxie-Exposition bedingten gesteigerten apoptotischen Zelltod hin, der durch Inhibition der GSH-Synthese mit BSO verstärkt werden kann (siehe 3.1.2). Um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um apoptotischen Zelltod handelt, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie weitere apoptosespezifische Merkmale untersucht.

3.1.4.1 Annexin V – FITC / PI – Bindung

Analog 3.1.2 wurden undifferenzierte PC12-Zellen 24 h vor Hyperoxie-Exposition (24 h) mit Medium bzw. Medium und BSO (Endkonzentration 200 μ M) präinkubiert und nach Beendigung des Versuches simultan Annexin V- und PI-gefärbt (Abb. 3-5 a-d – Annexin, Abb. 3-5 e-h – PI). Sowohl BSO allein als auch Hyperoxie verursachen nur eine geringe Änderung der medianen Fluoreszenz von Annexin V – FITC und PI im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂). Im Gegensatz dazu zeigen BSO-präinkubierte undifferenzierte PC12-Zellen nach 24stündiger Hyperoxie-Exposition eine starke Erhöhung der medianen Fluoreszenz beider Farbstoffe. Auch die quantitative Analyse der entsprechenden Dotplots ergibt eine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen (Annexin positiv / Ann + PI positiv) bei BSO-Präinkubation und anschließender Hyperoxie-Exposition im Gegensatz zu den anderen drei Gruppen.



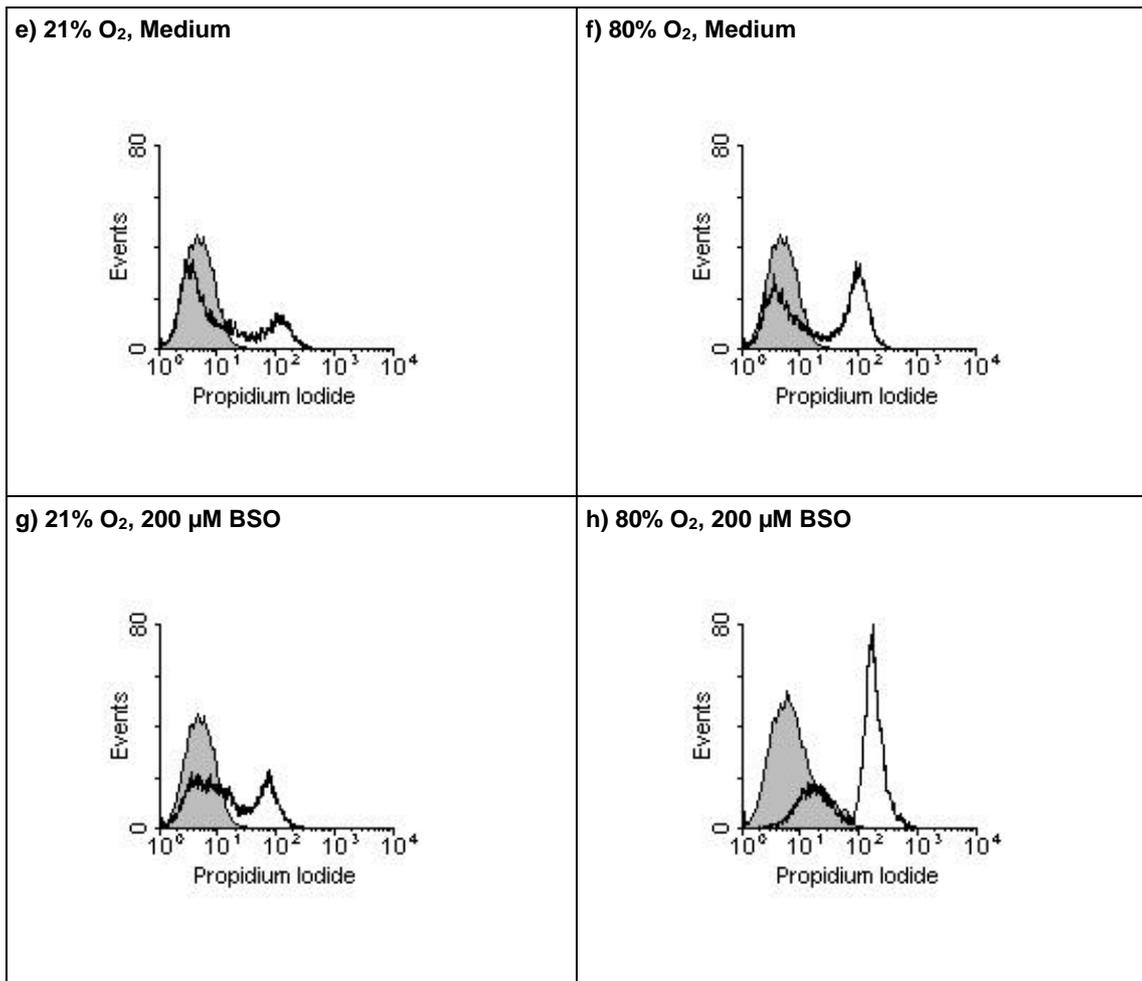


Abb. 3-5 a-h: Einfluss von BSO und Hyperoxie auf die AnnexinV-Bindung (a-d) und Propidiumjodid-Aufnahme (e-h) nativer PC12-Zellen, durchflusszytometrische Analyse. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium (a, b, e, f) oder 200 μM BSO (c, d, g, h) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative Histogramme von mindestens 4 unabhängigen Experimenten (n=3).

3.1.4.2 Aktivierte Caspase 3

Weiteres Merkmal des apoptotischen Zelltodes ist eine Aktivierung der Caspase-3. Wie in den Histogrammen ersichtlich (Abb. 3-6 a-d), bewirken sowohl BSO als auch Hyperoxie allein nur geringfügige Änderungen des Aktivierungszustandes von Caspase-3 im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂). Werden jedoch BSO-präinkubierte undifferenzierte PC12-Zellen 24stündiger Hyperoxie ausgesetzt, ist eine starke Aktivierung der Caspase-3 nachweisbar (Abb. 3-4 d).

Die PC12-Zellreihe ist durch Spontanapoptose gekennzeichnet. Demzufolge lassen sich bei quantitativer Analyse des Dotplots (SSC vs. Activated Caspase – FITC) der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂) 20,9% der Zellen in der Region, die den erhöhten Aktivierungszustand von Caspase-3 repräsentiert, nachweisen (nicht dargestellt). Während Behandlung undifferenzierter PC12-Zellen mit BSO bzw. Hyperoxie allein lediglich zu geringfügigen Änderungen führt (23,7% bzw. 20,5%), steigt diese Fraktion nach BSO-Präinkubation und anschließender Hyperoxie-Exposition auf 76,3% an (nicht dargestellt).

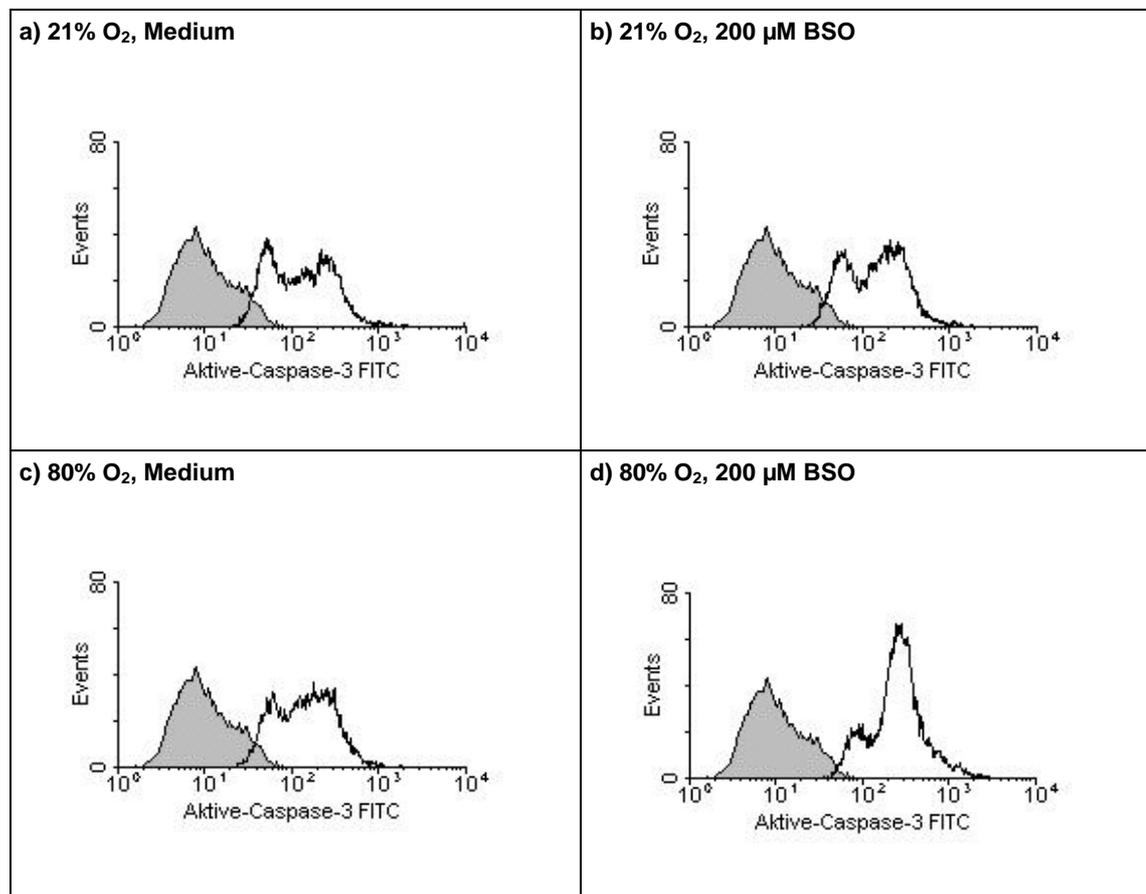


Abb. 3-6 a-d: Einfluss von BSO und Hyperoxie auf die Aktivierung von Caspase 3 bei nativen PC12-Zellen. Verwendung eines FITC-markierten Aktivierte Caspase-3-Antikörpers, durchflusszytometrische Analyse. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium (a, c) oder 200 μM BSO (b, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative Histogramme von mindestens 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

3.1.4.3 Hemmbarkeit mit Z-VAD-fmk

Mit Hilfe der beiden durchflusszytometrischen Methoden konnte gezeigt werden, dass Hyperoxie-Exposition undifferenzierter PC12-Zellen mit inhibierter GSH-Synthese zu gesteigertem apoptotischen Zelltod führt. Um nachzuweisen, dass dieser durch den Pancaspase-Inhibitor z-vad.fmk teilweise vermeidbar ist, wurde der MTT-Test verwendet (Abb. 3-7): Während Hyperoxie-Exposition nach BSO-Präinkubation (200 μ M) zu einer Reduktion der Zellaktivität und damit der vitalen Zellen auf 22,7% \pm 3,4% führt, ist bei Hyperoxie-Exposition nach Inkubation mit BSO und z-vad.fmk (100 μ M) lediglich ein Abfall auf 69,3 \pm 3,0% (200 μ M BSO + z-vad.fmk) nachweisbar. Inkubation undifferenzierter PC12-Zellen mit z-vad.fmk allein führte sowohl bei Normoxie als auch bei Hyperoxie zu einer geringen Reduktion der Zellvitalität (89,5% \pm 6,3% bzw. 86,0% \pm 5,6%).

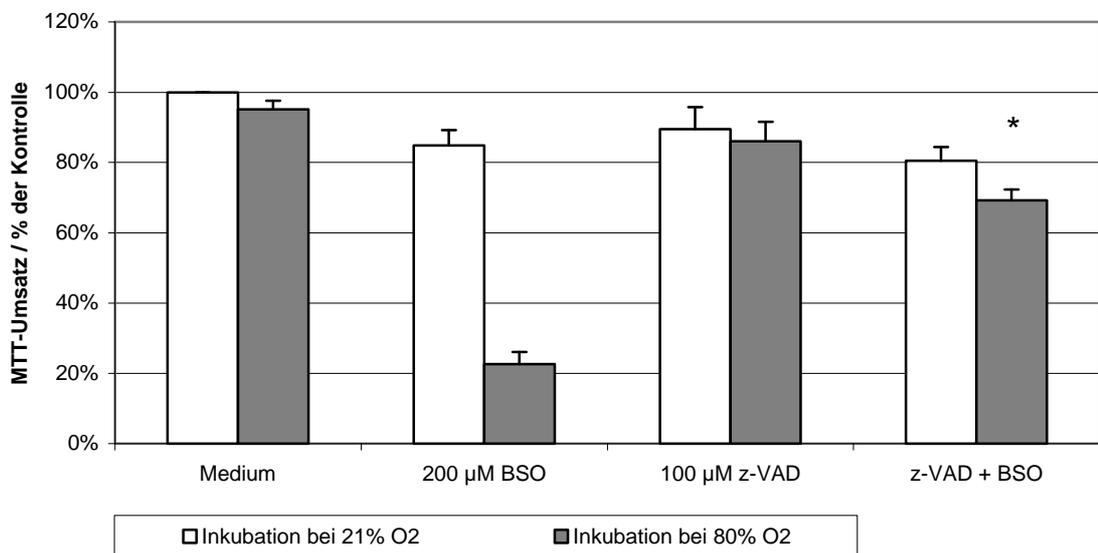


Abb. 3-7: Effekt des Caspase-Inhibitors z-VAD.fmk auf den durch kombinierte BSO-Hyperoxie-Exposition induzierten Zelltod undifferenzierter PC12-Zellen. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium und/oder z-vad.fmk und/oder 200 μ M BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft (weiße Balken) oder Hyperoxie (dunkle Balken). Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* $p < 0,0001$ für z-VAD+BSO vs. 200 μ M BSO bei 80% O₂

3.2 NGF-differenzierte PC12-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber Hyperoxie und Hyperoxie / BSO

Es ist bekannt, dass sich undifferenzierte PC12-Zellen durch Zugabe von NGF zu einer zu neuronähnlichen Zellen mit Neuritenbildung entwickeln und zum anderen vor Stress, der durch verschiedene Stimuli ausgelöst wird und zu Apoptose führt, geschützt werden können.

3.2.1 NGF induziert bereits nach 24 Stunden Differenzierungsprozesse (beta-III-Tubulin-Synthese)

NGF als Wachstumsfaktor induziert biochemische und morphologische Veränderungen der PC12-Zellen, die typisch für eine neuronale Differenzierung sind, unter anderem kommt es zur Bildung von neuronenspezifischen zytoskelettalen Proteinen wie beta-III-Tubulin. Mit Hilfe eines modifizierten Differenzierungsassay nach Ohuchi et al. (2002) wurde der beta-III-Tubulin-Gehalt undifferenzierter und NGF-differenzierter PC12-Zellen untersucht.

Wie in Abb. 3-8 zu erkennen, ist die Bindung des spezifischen beta-III-Tubulin-Antikörpers bei undifferenzierten PC12-Zellen nur unwesentlich stärker als die des entsprechenden Isotyp-Antikörpers (IgG2b = 100% vs. beta-III-Tubulin 104%). Bereits 24 Stunden nach NGF-Gabe steigt diese Bindung auf 400% im Vergleich mit dem Isotypantikörper, nach voller Differenzierung über 7 Tage ist ein weiterer Anstieg auf 538% nachzuweisen.

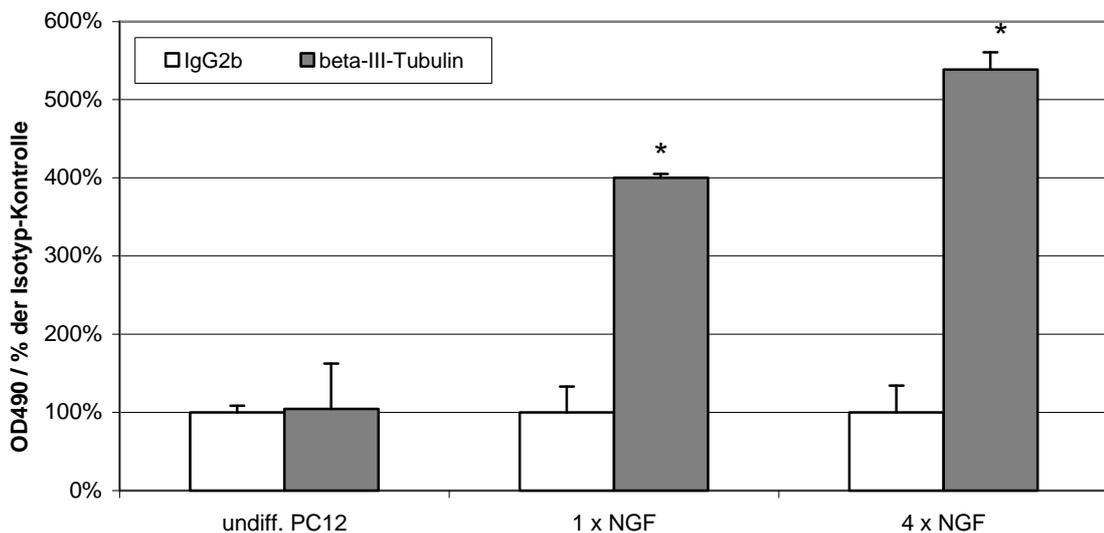


Abb. 3-8: NGF induziert neuronenspezifisches beta-III-Tubulin in PC12-Zellen bereits nach 24 h. Der beta-III-Tubulin-Gehalt wurde bei undifferenzierten PC12-Zellen sowie bei über 24 h und 7 Tage mit NGF (100 ng/ml) differenzierten PC12-Zellen bestimmt (siehe Material und Methoden). Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=6$.

* $p < 0,0001$ vs. undifferenzierte PC12-Zellen

3.2.2 Hyperoxie-induzierte Zellzyklusveränderungen sind bei NGF-differenzierten PC12-Zellen nicht nachweisbar

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse sollte untersucht werden, ob Differenzierung mit NGF (100 ng/ml) die hyperoxiebedingte Akkumulation der PC12-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus sowie die nach 48stündiger Hyperoxie zu beobachtende Zunahme der Sub-G0/1-Population verhindern kann. Wie in den Histogrammen zu sehen (Abb. 3-9), ändert sich die Fluoreszenz-Intensität der einzelnen Peaks bei differenzierten PC12-Zellen kaum. Quantitative Analyse der Daten (Abb. 3-10) zeigt eine Erhöhung des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, um 5,1% nach 24 h Hyperoxie-Exposition (im Gegensatz zu einem Anstieg um 20,5% bei undifferenzierten PC12-Zellen unter sonst gleichen Bedingungen) und um 8,9% nach 48h Hyperoxie-Exposition (34,5% bei undifferenzierten PC12-Zellen), jeweils im Vergleich mit der unbehandelten 21%O₂-Kontrollgruppe. Entsprechend vermindert sich der Anteil der G0/1-Fraktion lediglich um 7,4% (24 h Hyperoxie) bzw. 11,2% (48 h Hyperoxie). Der Anteil der Zellen, die sich im Sub-G0/1-Peak darstellen und die apoptotische Fraktion repräsentieren, bleibt sowohl nach 24- als auch 48stündiger Hyperoxie-Exposition nahezu unverändert (+1,3% bzw. -0,1% im Vergleich mit der unbehandelten 21%O₂-Kontrollgruppe).

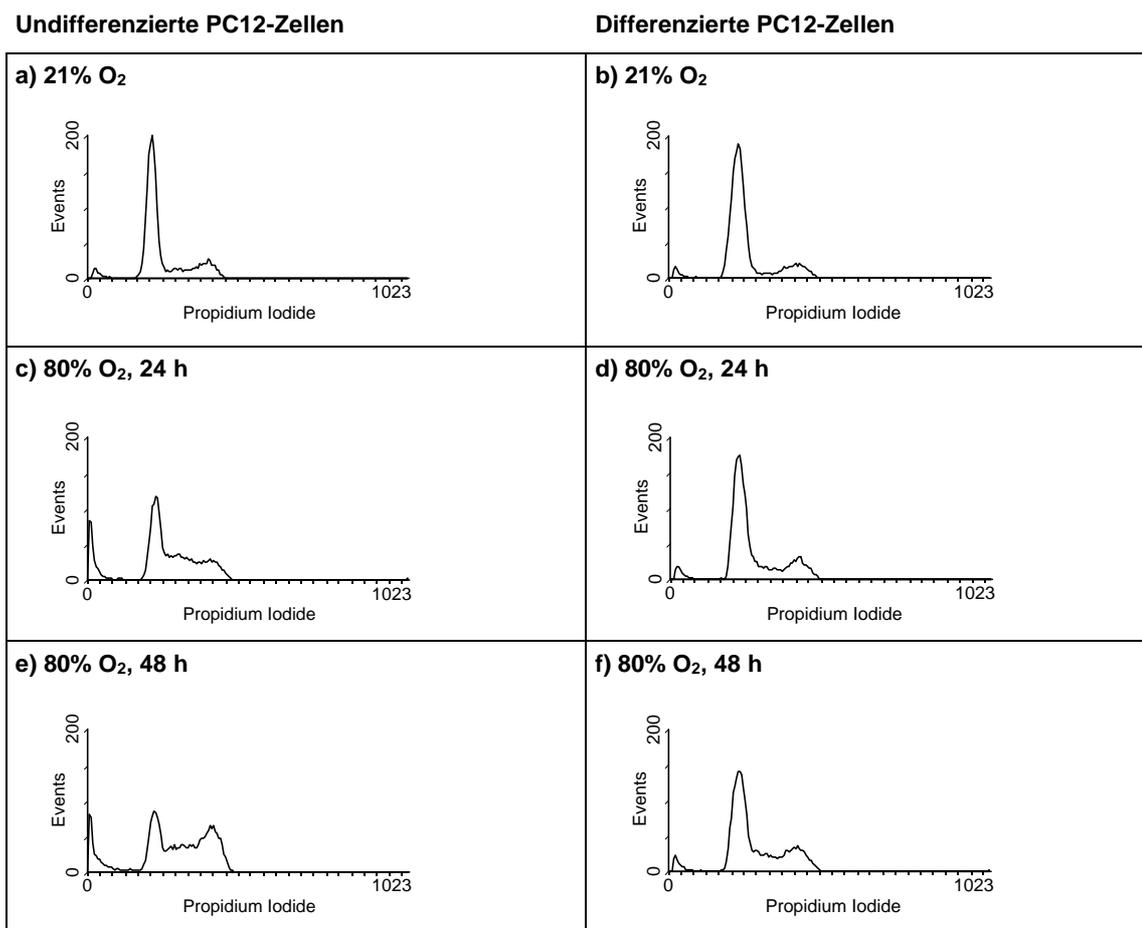


Abb. 3-9 a-f: Einfluss von Hyperoxie auf die Zellzyklusverteilung differenzierter PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen. Durchflusszytometrisches Profil undifferenzierter (a, c, e) und differenzierter (b, d, f) PC12-Zellen bei Raumluft (a, b) und nach 24 h (c, d) bzw. 48 h (e, f) Hyperoxie, anschließend DNA-Färbung mit Propidiumjodid. Repräsentative Histogramme von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=4.

Undifferenzierte PC12-Zellen

Differenzierte PC12-Zellen

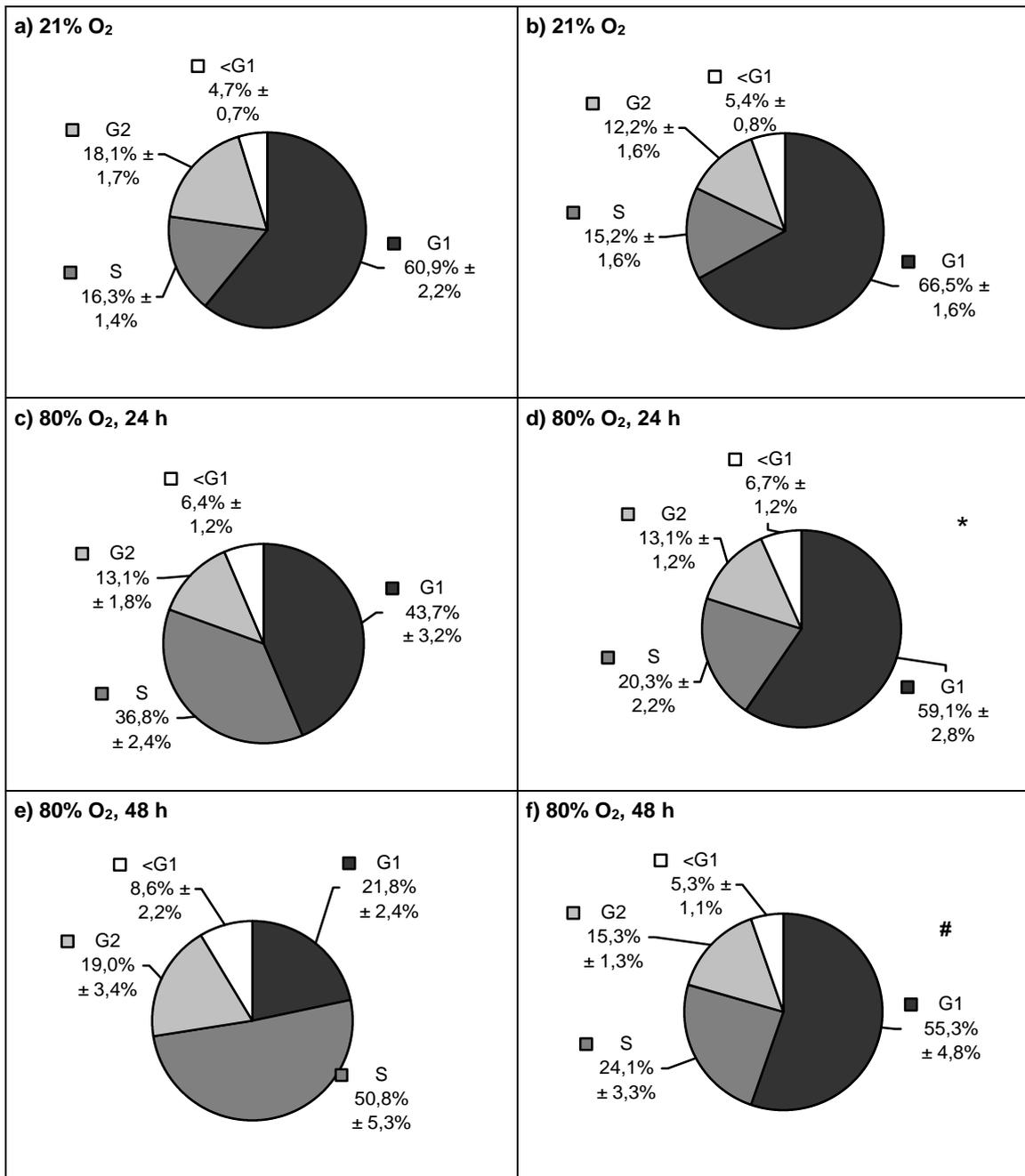


Abb. 3-10 a-f: Einfluss von Hyperoxie auf die Zellzyklusverteilung differenzierter PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen. Quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung undifferenzierter (a, c, e) und differenzierter (NGF über 7 Tage: b, d, f) PC12-Zellen bei Raumluft (a + b) und nach 24 h (c + d) bzw. 48 h (e + f) Hyperoxie, anschließend DNA-Färbung mit Propidiumjodid. Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G1, S, G2 und subG1 als Mittelwert ± Standardfehler. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=4.

* p<0,005 für G1 und p<0,0005 für S, differenzierte vs. undifferenzierte PC12-Zellen bei 24stündiger Hyperoxie-Exposition (t-Test)

p=0,001 für G1 und p<0,005 für S, differenzierte vs. undifferenzierte PC12-Zellen bei 24stündiger Hyperoxie-Exposition (t-Test)

3.2.3 NGF-differenzierte PC12-Zellen sind weniger empfindlich gegenüber BSO und Hyperoxie

Die Kombination Hyperoxie und Inhibition der GSH-Synthese mit BSO führt bei undifferenzierten PC12-Zellen zu einer starken Reduktion der Zellaktivität respektive vitalen Zellen. Um die Empfindlichkeit NGF-differenzierter PC12-Zellen gegenüber verstärktem oxidativen Streß zu untersuchen, wurde der Zellaktivitätstest mit MTT durchgeführt. Native PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxie-Exposition mit NGF (100 ng/ml) bzw. mit NGF und 200 μ M BSO präinkubiert (Abb. 3-11). BSO-Behandlung bei gleichzeitiger Zugabe von NGF in Normoxie (21% O₂) zog ebenso wie 24stündige Hyperoxie-Exposition nach NGF-Präinkubation nur eine minimale Änderung der Zellvitalität nach sich (101,1% \pm 3,3% bzw. 97,8 \pm 1,9% im Vergleich mit der NGF-behandelten 21% O₂-Kontrollgruppe). Während Hyperoxie-Exposition nativer PC12-Zellen nach BSO-Präinkubation zu einer Reduktion der vitalen Zellen um 77,3% auf 22,7 \pm 3,0% führte, zeigten PC12-Zellen, die nach Präinkubation mit NGF und BSO einer 24stündigen Hyperoxie-Behandlung ausgesetzt wurden, lediglich eine Reduktion der vitalen Zellen um 12,4% auf 87,6% \pm 2,5%.

Auch die lichtmikroskopische Darstellung zeigt nach kombinierter BSO-Hyperoxie-Exposition differenzierter PC12-Zellen kaum eine Änderung im Vergleich mit der unbehandelten Raumluftgruppe (Abb. 3-12).

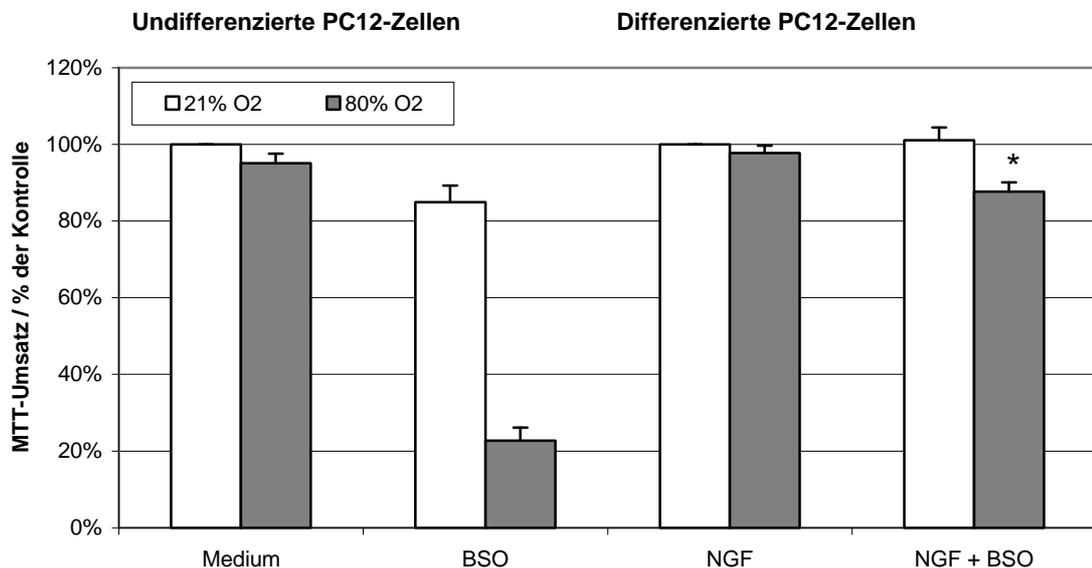


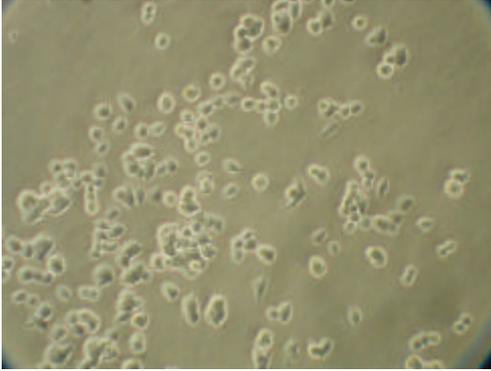
Abb. 3-11: Einfluss von BSO und Hyperoxie auf die Zellaktivität differenzierter PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen. Undifferenzierte und differenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium/NGF oder 200 μ M BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft [helle Balken] oder Hyperoxie [dunkle Balken]. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

*p<0,0001 für NGF+BSO vs. BSO bei 80% O₂

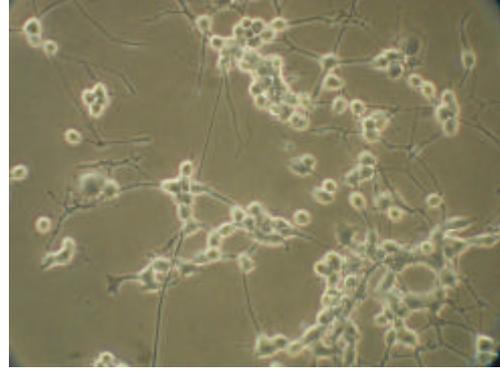
Undifferenzierte PC12-Zellen

Differenzierte PC12-Zellen

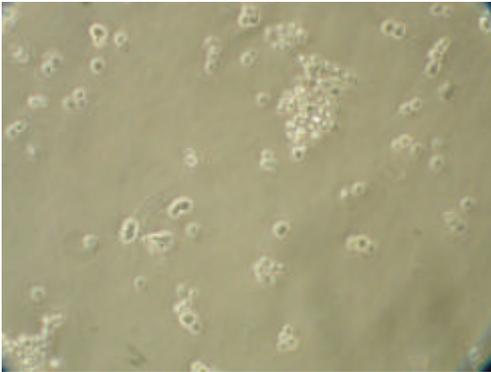
a) 21% O₂, Medium



b) 21% O₂, NGF



c) 80% O₂, 200µM BSO



d) 80% O₂, NGF + 200 µM BSO

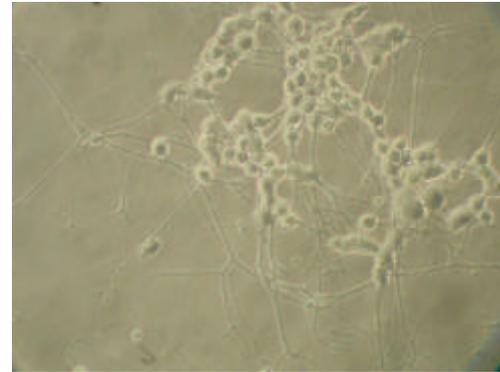


Abb. 3-12 a-d: Die Morphologie differenzierter PC12-Zellen ändert sich nach kombinierter BSO-Hyperoxie-Exposition kaum. Undifferenzierte (a, c) bzw. differenzierte PC12-Zellen (Differenzierung mit NGF über 7 Tage: b, d) wurden 24 h mit Medium (a, b) oder 200 µM BSO (c, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (V 1:40).

3.2.4 NGF schützt PC12-Zellen vor Apoptose durch Hyperoxie + BSO

Mit Hilfe des MTT-Tests konnte nachgewiesen werden, dass differenzierte PC12-Zellen bereits 24 Stunden nach Zugabe von NGF zum reduzierten Nährmedium eine geringere Empfindlichkeit gegenüber gesteigertem oxidativen Stress aufweisen. Um zu untersuchen, ob auch die Intensität der apoptosetypischen Merkmale abnimmt, wurde die Durchflusszytometrie verwendet.

3.2.4.1 Annexin V – FITC / Propidiumjodid – Bindung

NGF-differenzierte PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxie-Exposition (24 h) mit NGF (100 ng/ml) bzw. mit NGF und 200 μ M BSO (Endkonzentration 200 μ M) präinkubiert und nach Beendigung des Versuches simultan Annexin V- und PI-gefärbt (Abb. 3.12 a-d – Annexin, Abb. 3.13 a-d – PI). Der Anteil spontanapoptotischer Zellen ist bei NGF-differenzierten PC12-Zellen höher als bei undifferenzierten, erkennbar an der höheren medianen Annexin V- und PI-Fluoreszenz der NGF-behandelten Kontrollgruppe (21% O₂) im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂) undifferenzierter PC12-Zellen. Sowohl BSO (21% O₂) und Hyperoxie allein als auch die Kombination aus BSO-Präinkubation und Hyperoxie-Exposition verursachen nur eine minimale Änderung der medianen Fluoreszenz von Annexin V – FITC und PI im Vergleich mit der NGF-behandelten Kontrollgruppe (21% O₂), während BSO-präinkubierte undifferenzierte PC12-Zellen nach 24stündiger Hyperoxie-Exposition eine starke Erhöhung der medianen Fluoreszenz beider Farbstoffe zeigten. Auch die quantitative Analyse der entsprechenden Dotplots zeigt in allen vier Gruppen eine ähnliche prozentuale Verteilung der Zellen.

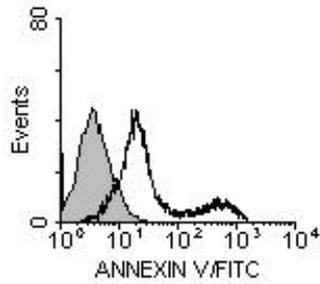
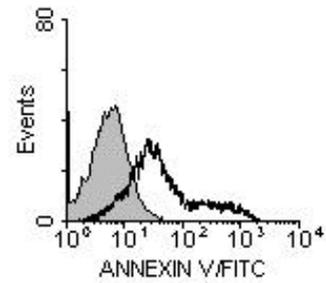
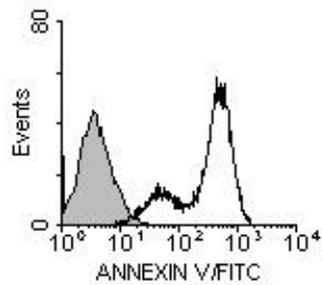
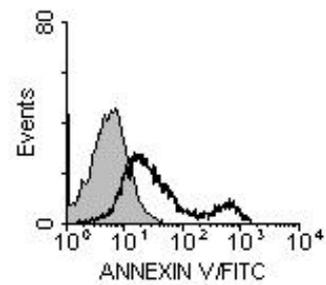
Undifferenzierte PC12-Zellen**Differenzierte PC12-Zellen****a) 21% O₂, Medium****b) 21% O₂, NGF****c) 80% O₂, 200 µM BSO****d) 80% O₂, NGF + 200 µM BSO**

Abb. 3-13 a-d: Wirkung von BSO und Hyperoxie auf die Annexin V-Bindung bei differenzierten PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen, durchflusszytometrische Analyse. Undifferenzierte (a, c) bzw. differenzierte PC12-Zellen (Differenzierung mit NGF über 7 Tage: b, d) wurden 24 h mit Medium (a, b) oder 200 µM BSO (c, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative Histogramme (AnnexinV – Propidiumjodid-Doppelfärbung, siehe Abb. 4-11 a-d) von mindestens 4 unabhängigen Experimenten (n=3).

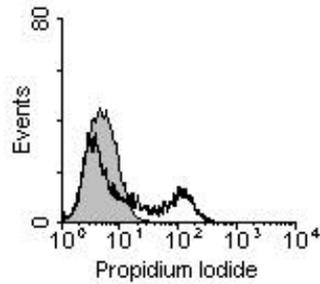
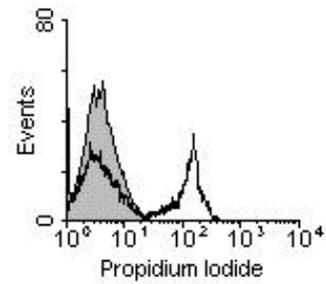
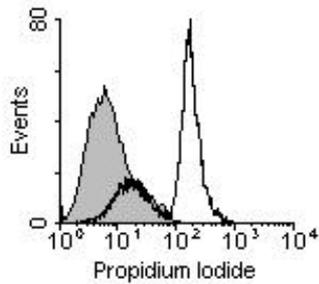
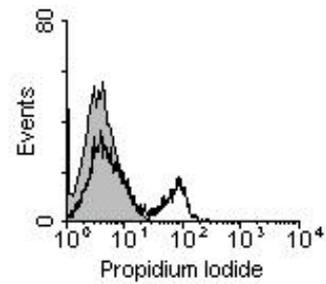
Undifferenzierte PC12-Zellen**Differenzierte PC12-Zellen****a) 21% O₂, Medium****b) 21% O₂, NGF****c) 80% O₂, 200 µM BSO****d) 80% O₂, NGF + 200 µM BSO**

Abb. 3-14 a-d: Wirkung von BSO und Hyperoxie auf die Propidiumjodid-Aufnahme bei differenzierten PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen, durchflusszytometrische Analyse. Undifferenzierte (a, c) bzw. differenzierte PC12-Zellen (Differenzierung mit NGF über 24 h - 7 Tage: b, d) wurden 24 h mit Medium (a, b) oder 200 µM BSO (c, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative Histogramme (AnnexinV – Propidiumjodid-Doppelfärbung) von mindestens 4 unabhängigen Experimenten (n=3).

3.2.4.2 Aktivierte Caspase 3 – FITC

Als weiteres Merkmal des apoptotischen Zelltodes wurde bei BSO-präinkubierten PC12-Zellen eine verstärkte Aktivierung der Caspase-3 im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂) nachgewiesen. NGF-differenzierte PC12-Zellen zeigen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen eine erhöhte Spontanapoptose, erkennbar an der höheren medianen Fluoreszenz des Activated Caspase-3 – FITC der NGF-behandelten Kontrollgruppe (21% O₂) im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂) undifferenzierter PC12-Zellen. Wie in den Histogrammen ersichtlich (Abb. 3-15 a-d), wird durch Hyperoxie-Exposition nach BSO-Präinkubation keine Änderung der medianen Fluoreszenz verursacht. Beide Behandlungen allein verändern die mediane Fluoreszenz ebenfalls nicht.

Auch die quantitative Analyse der Dotplots (nicht dargestellt) zeigt nur geringfügige Änderungen der prozentualen Verteilung NGF-differenzierter PC12-Zellen bezüglich Aktivierungszustand der Caspase-3.

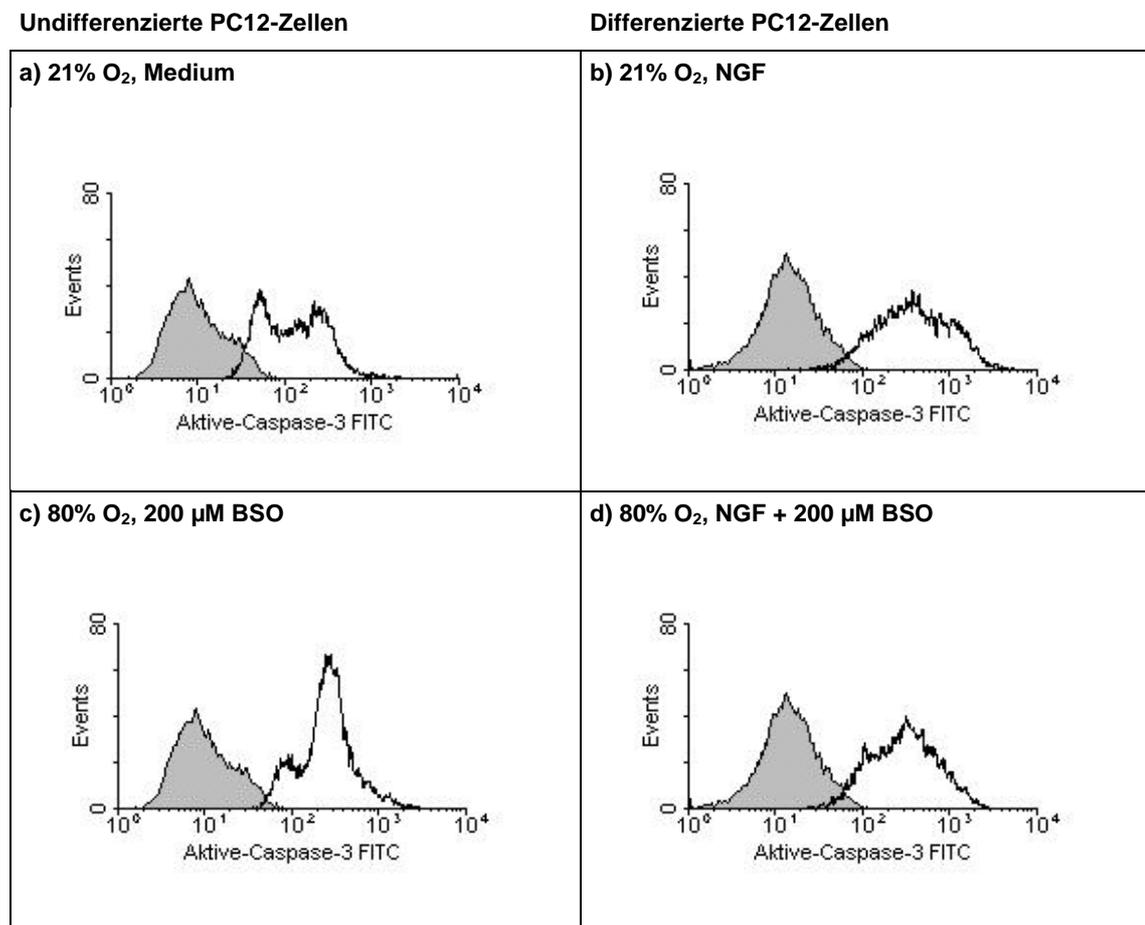


Abb. 3-15 a-d: Einfluss von BSO und Hyperoxie auf die Aktivierung von Caspase 3 bei differenzierten PC12-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten PC12-Zellen, durchflusszytometrische Analyse. Undifferenzierte (a, c) bzw. differenzierte PC12-Zellen (Differenzierung mit NGF über 7 Tage: b, d) wurden 24 h mit Medium (a, b) oder 200 µM BSO (c, d) präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft oder Hyperoxie. Repräsentative Histogramme von mindestens 3 unabhängigen Experimenten (n=3).

3.2.5 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der NGF-Schutzwirkung

Um die Fähigkeit von NGF, PC12-Zellen vor gesteigertem oxidativen Stress zu schützen, genauer zu charakterisieren, wurden Konzentrations- und Zeitabhängigkeit dieser Schutzwirkung untersucht.

Bisher wurde als Standardkonzentration von NGF die in der Literatur für die Differenzierung von PC12-Zellen beschriebene verwendet (100 ng/ml). Bei Präinkubation mit NGF und BSO 24 Stunden vor Hyperoxie-Exposition konnte eine Konzentrationsabhängigkeit des Schutzeffekts nachgewiesen werden (Abb. 3-16). Bereits bei einer NGF-Konzentration von 10 ng/ml ist ein geringerer Abfall der Zellvitalität durch gesteigertem oxidativen Stress nachweisbar ($35,4\% \pm 2,8\%$ 200 μ M BSO und 10 ng/ml NGF vs. $22,7\% \pm 2,5\%$ 200 μ M BSO allein). Proportional zur NGF-Konzentration steigt auch der Anteil der vitalen Zellen, die nach Versuchsabschluss durch ihre Stoffwechselaktivität nachweisbar sind, wobei der maximale protektive Effekt bei 100 ng/ml NGF liegt (50 ng/ml: $50,5\% \pm 2,4\%$, 100 ng/ml NGF: $87,6\% \pm 2,5\%$, 500 ng/ml NGF: $73,0\% \pm 2,0\%$).

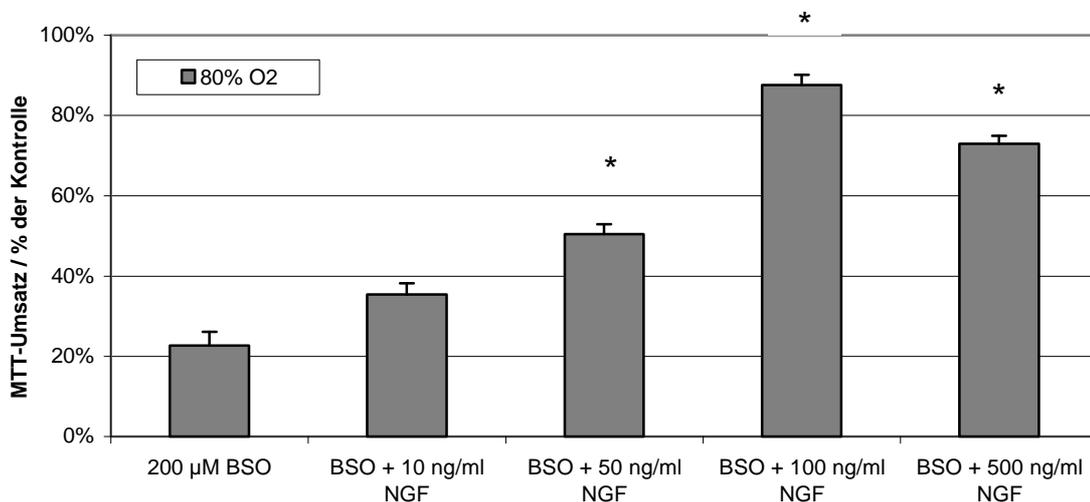


Abb. 3-16: Konzentrationsabhängigkeit der schützenden Wirkung von NGF auf PC12-Zellen unter oxidativem Streß. PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxiebehandlung (24 h) mit BSO (200 μ M) und NGF (10 bis 500 ng/ml) inkubiert. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* $p < 0,0001$ für BSO und entsprechende NGF-Konzentration vs. BSO bei 80% O₂

Da die PC12-Zellen durch Zugabe von NGF direkt vor Hyperoxie-Exposition noch nicht vor gesteigertem oxidativen Stress geschützt sind (Abb. 3-17), bei Zugabe von NGF 24 h vor Hyperoxie-Exposition diese Schutzwirkung und auch β -III-Tubulin als neuronaler Marker jedoch bereits nachweisbar sind, sollte durch Variation der Präinkubationszeiten zwischen 0 und 24 Stunden der Zeitraum gefunden werden, der für die Induktion der biochemischen und metabolischen Änderungen notwendig ist. Für diese Untersuchung wurde der MTT-Test verwendet, NGF und BSO bzw. BSO allein wurden jeweils 24 – 20 – 16 – 12 – 8 – 4 – 0 Stunden vor Hyperoxie-Exposition zu den undifferenzierten PC12-Zellen gegeben. Wie in Abb.

3-17 erkennbar, lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Zellvitalität bei 12stündiger Präinkubation mit NGF und BSO im Vergleich mit alleiniger BSO-Präinkubation nachweisen ($53,1\% \pm 2,3\%$ vs. $13,3\% \pm 8,4\%$, jeweils im Vergleich mit der NGF- bzw. unbehandelten Kontrollgruppe, $21\% \text{ O}_2$). Die Zellvitalität steigt proportional zur Präinkubationsdauer an, bei 20stündiger Präinkubation ist die Schutzwirkung von NGF voll ausgeprägt.

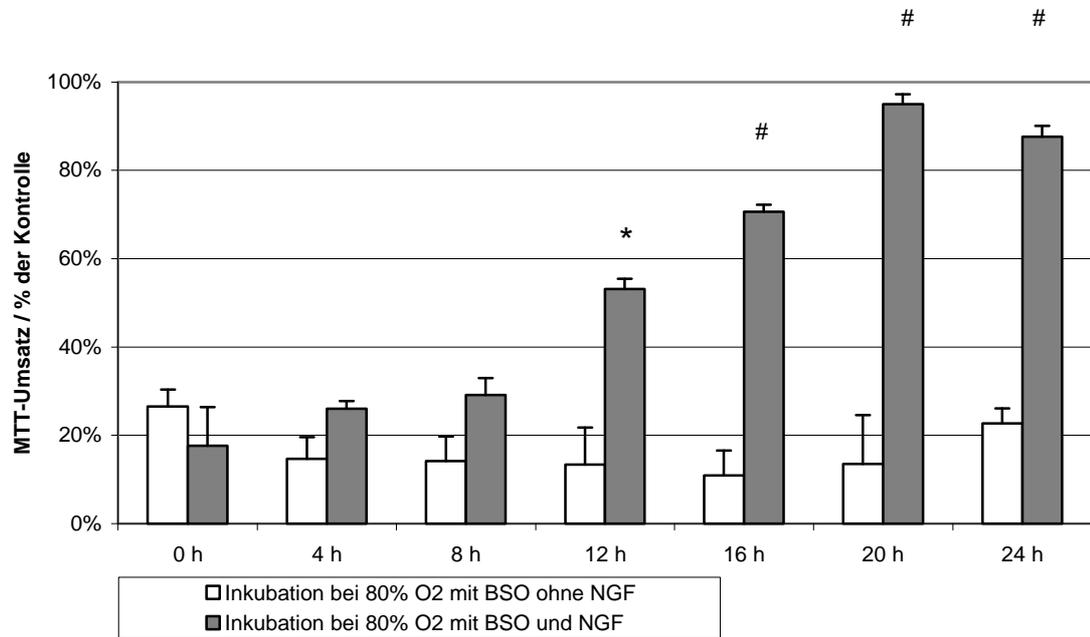


Abb. 3-17: Zeitverlauf der Wirkung von NGF auf PC12-Zellen unter oxidativem Streß. PC12-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten vor Hyperoxiebehandlung (24 h) mit BSO (200µM) [weißer Balken] oder BSO (200 µM) und NGF (100 ng/ml) [grauer Balken] behandelt. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* $p < 0,001$ für Inkubation mit NGF vs. Inkubation ohne NGF bei 80% O₂

$p < 0,0001$ für Inkubation mit NGF vs. Inkubation ohne NGF bei 80% O₂

3.2.6 Inhibition der Proteinsynthese hebt Schutzwirkung von NGF auf

Der für die Entwicklung der Schutzwirkung von NGF vor gesteigertem oxidativen Stress mindestens notwendige Präinkubationszeitraum von 12 Stunden legt eine Beteiligung der *de novo*-Proteinsynthese nahe. Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid (= CHX; 0,1 μ M) bei gleichzeitiger 24stündiger Präinkubation mit NGF und BSO zeigt eine Reduktion des Anteils vitaler Zellen nach Hyperoxie-Exposition auf 17,7% \pm 6,5% vs. 87,6% \pm 2,5% (24 h Präinkubation mit NGF und BSO) bzw. 79,3% \pm 2,2% (24 h Präinkubation mit NGF und CHX 24 h vor Hyperoxie), jeweils im Vergleich mit der NGF-behandelten Kontrollgruppe (21% O₂), siehe Abb. 3-18 .

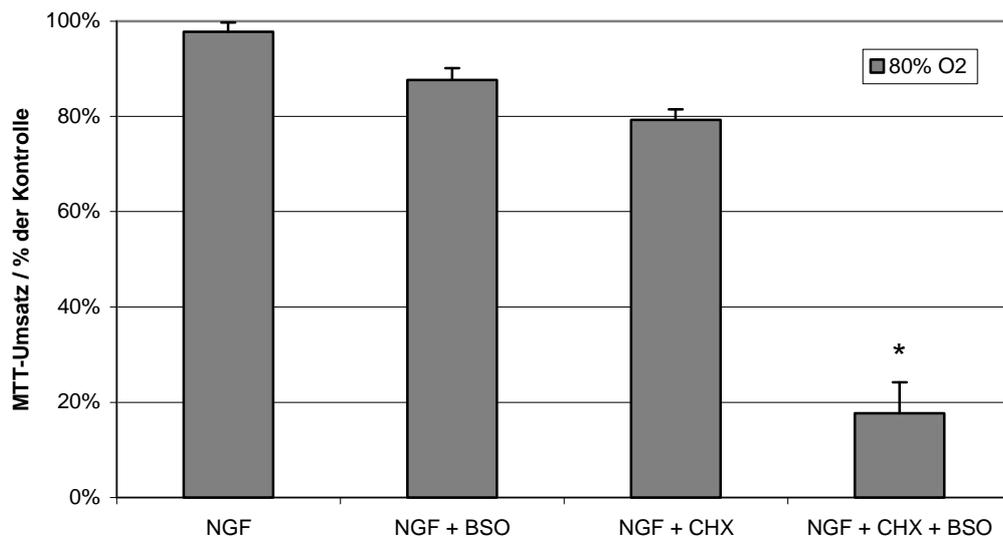


Abb. 3-18: Effekt von BSO und Cycloheximid (CHX) auf PC12-Zellen mit NGF unter oxidativem Stress. PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxiebehandlung (24 h) mit NGF (100 ng/ml) und CHX (0,1 μ M) und/oder BSO (200 μ M) präinkubiert. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* $p < 0,0001$ für NGF + CHX + BSO vs. alle anderen Gruppen bei 80% O₂

3.3 Auswirkungen von Hyperoxie auf die Signaltransduktion bei undifferenzierten PC12-Zellen

Als Folge der NGF-Behandlung von undifferenzierten PC12-Zellen kommt es durch Aktivierung der p42/44-MAPK (=ERK) und PI3K zu Differenzierungsprozessen. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass durch Aktivierung der p42/44-MAPK auch apoptotische Prozesse vermittelt werden können (70, 71, 84). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Inhibition beider Signaltransduktionswege auf die Reaktion von PC12-Zellen auf gesteigerten oxidativen Stress hat, wurden diese mit spezifischen Inhibitoren geblockt.

3.3.1 Auswirkungen der Inhibition der p42/44-MAPK und PI3K auf die Reaktion undifferenzierter P12-Zellen auf gesteigerten oxidativen Stress

Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 60 min vor BSO-Zugabe mit U0126 (10 μ M) als Inhibitor der p42/44-MAPK präinkubiert. 24 Stunden nach BSO-Zugabe erfolgte die Hyperoxie-Exposition. Während Präinkubation mit BSO allein zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 22,7% \pm 3,4% führt, sinkt diese bei Zugabe von U0126 60 min vor BSO-Präinkubation lediglich auf 86,0 \pm 6,0% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂, 100%), vermittelt somit einen Schutz vor gesteigertem oxidativen Stress (Abb. 3-19).

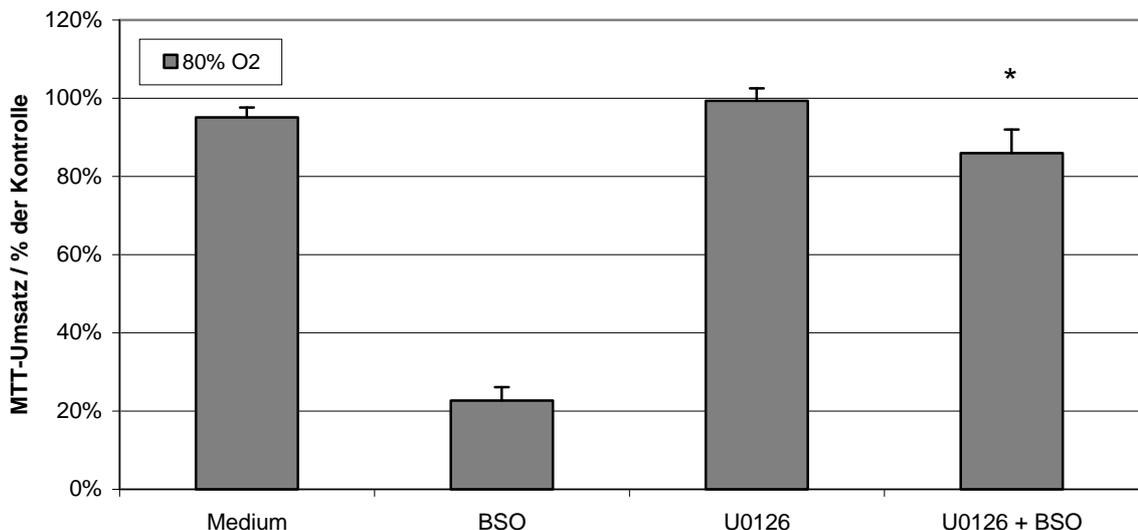


Abb. 3-19: Effekt von BSO und Inhibition der ERK1/2 auf undifferenzierte PC12-Zellen unter oxidativem Streß. PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxiebehandlung (80% O₂ über 24 h) mit den angegebenen Substanzen präinkubiert (BSO: 200 μ M, U0126: 10 μ M). Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* p<0,0001 für U0126 + BSO vs. BSO bei 80% O₂

Inhibition der PI3K mit Hilfe von Wortmannin (100 μ M) 60 min vor BSO-Präinkubation bietet im Vergleich mit alleiniger BSO-Präinkubation keinen besseren Schutz vor gesteigertem oxidativen Stress (Abb. 3-20: 200 μ M BSO – 22,7% \pm 3,4%, 100 nM Wortmannin + 200 μ M BSO – 32,9% \pm 3,7% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂).

Kombination beider Inhibitoren hatte eine vergleichbare Wirkung wie Inhibition der p42/44-MAPK allein (Zellvitalität 75,8% \pm 7,9% – Daten nicht aufgeführt).

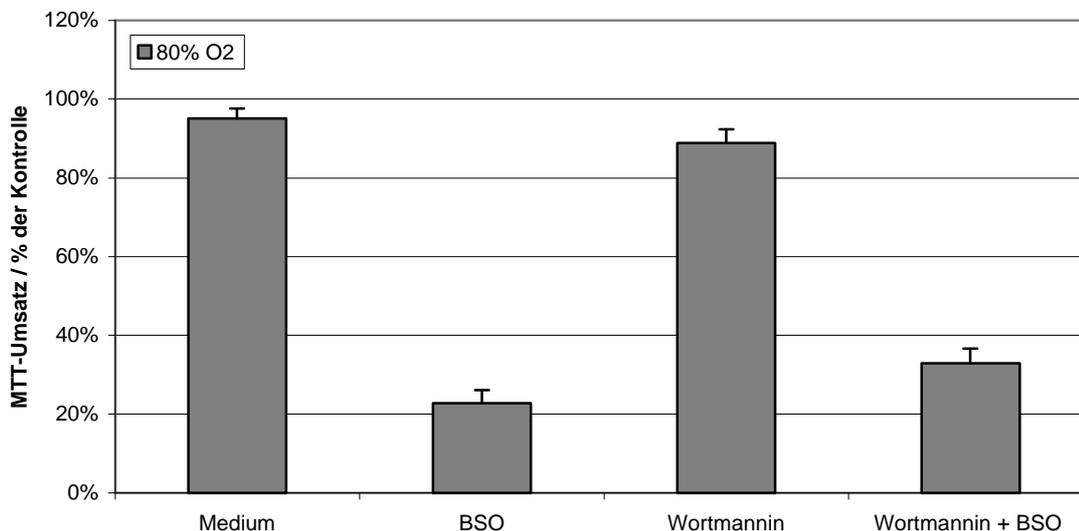


Abb. 3-20: Effekt von BSO und Inhibition der PI3K auf undifferenzierte PC12-Zellen unter oxidativem Stress. PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxiebehandlung (80% O₂ über 24 h) mit den angegebenen Substanzen präinkubiert (BSO: 200 μ M, Wortmannin: 100 nM). Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

3.3.2 Inhibition der p42/44-MAPK verhindert die BSO/Hyperoxie-induzierte ROS-Akkumulation in undifferenzierten PC12-Zellen

Die Kombination Hyperoxie und Inhibition der GSH-Synthese mit BSO führt bei undifferenzierten PC12-Zellen zu einer starken intrazellulären ROS-Akkumulation, die ein Ausdruck des gesteigerten oxidativen Stresses ist. Infolgedessen sinkt nach kombinierter Hyperoxie-BSO-Exposition die Zellaktivität undifferenzierter PC12-Zellen stark ab. Da dieser Abfall der Zellvitalität durch Inhibition der p42/44-MAPK mit U0126 verhindert werden konnte, sollte mit Hilfe des CM-H₂DCF-DA-Tests gezeigt werden, dass auch die durch Hyperoxie und/oder BSO induzierte intrazelluläre ROS-Akkumulation durch U0126 vermindert wird.

Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 60 min vor BSO-Zugabe mit U0126 (10 μ M) als Inhibitor der p42/44-MAPK präinkubiert. 24 Stunden nach BSO-Zugabe erfolgte die Hyperoxie-Exposition. Während Präinkubation mit BSO und anschließende Hyperoxie-Exposition über 2 – 6 – 12 – 24 h zu einem maximalen Anstieg der ROS-Produktion auf 355,7% \pm 28,4% führt (12 h), steigt diese bei Zugabe von U0126 60 min vor BSO-Präinkubation lediglich auf maximal 161,7% \pm 19,1% (2 h) im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (21% O₂, 100%),

vermittelt somit einen Schutz vor gesteigertem oxidativen Stress (Abb. 3-21).

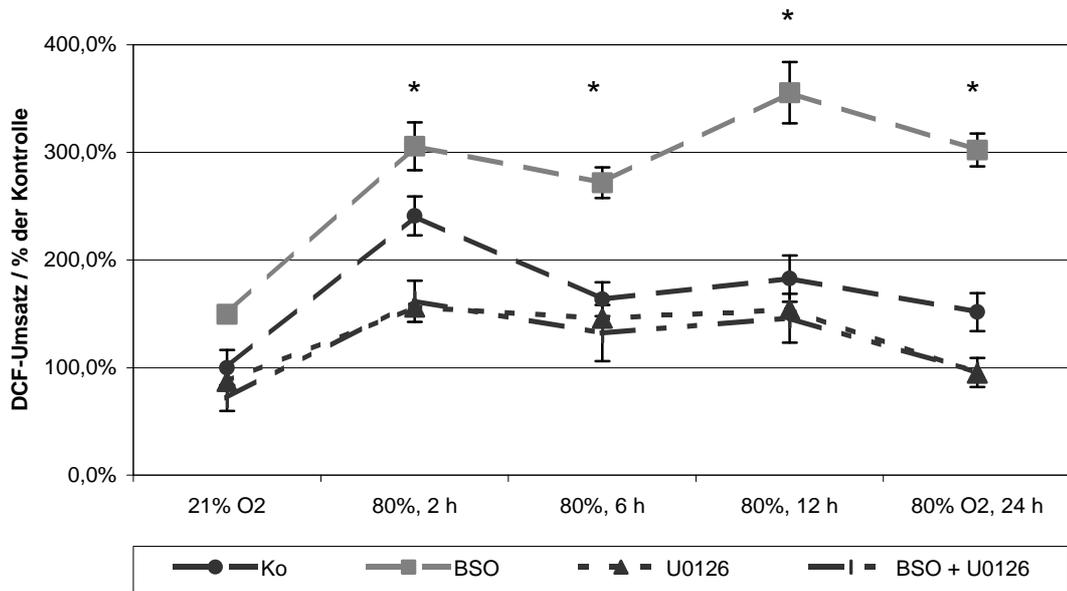


Abb. 3-21: Inhibition der p42/44-MAPK verringert die ROS-Akkumulation in nativen PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden 24 h vor Hyperoxiebehandlung (80% O₂ über 24 h) mit den angegebenen Substanzen präinkubiert (BSO: 200 μM, U0126: 10 μM). Messung des DCF-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%). Daten von 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.

* p<0,0001 für BSO + U0126 vs. BSO bei 80% O₂

3.3.3 Hyperoxie und BSO führen zu verstärkter Aktivierung der p42/44-MAPK bei undifferenzierten PC12-Zellen

Da Hyperoxie-Exposition zu einer verstärkten Aktivierung der MAPK führte, die bereits nach 4 h nachweisbar war, wurde der Einfluß verstärkten oxidativen Stresses auf den Aktivierungszustand untersucht. 4stündige Hyperoxie-Exposition undifferenzierter PC12-Zellen nach 24stündiger Präinkubation mit BSO (10 μ M) führte zu einer starken Aktivierung der p42/44-MAPK sowohl im Vergleich mit BSO-Gabe bei 21% O₂ als auch mit alleiniger Hyperoxie-Exposition (Abb. 3-22).

a)



BSO	-	-	-	+	+	+
21% O ₂	+	-	-	+	-	-
80% O ₂	-	+	+	-	+	+
		(½ h)	(4 h)		(½ h)	(4 h)

b)

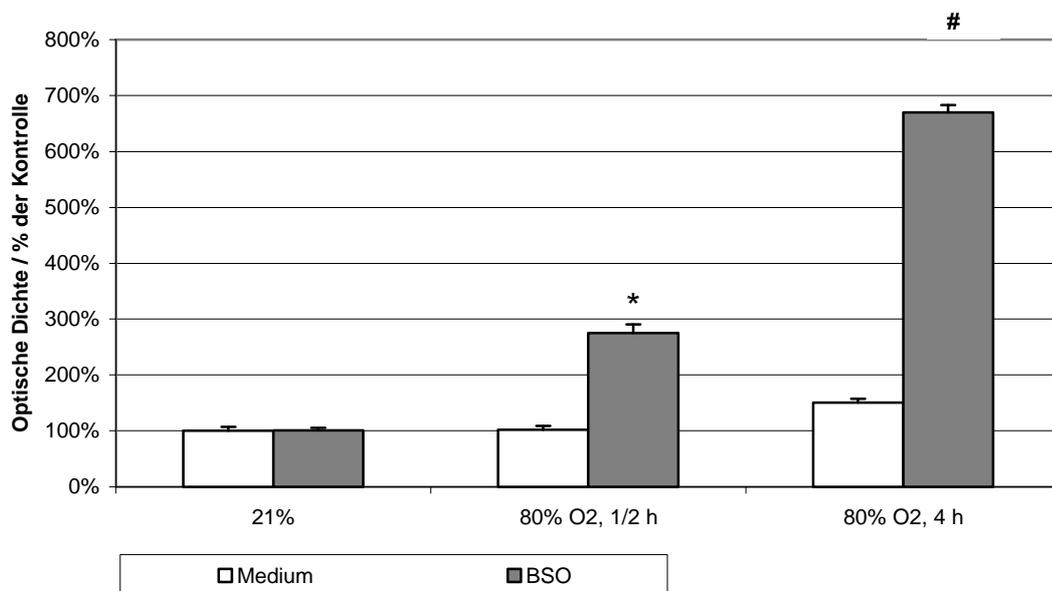


Abb. 3-22: Hyperoxie nach Präinkubation mit BSO führt zu einer starken Aktivierung der p42/44-MAPK bei undifferenzierten PC12-Zellen. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium [weißer Balken] oder 200 μ M BSO präinkubiert [grauer Balken], gefolgt von Inkubation bei Raumluft oder 80% O₂ für die angegebenen Zeiträume, anschließend Proteinextraktion und Westernblot-Analyse mit phospho-p42/44-MAPK-Antikörper.

a) Repräsentativer Film von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit n=3.

b) Darstellung der Aktivität der p42/44-MAPK nach quantitativer Analyse der densitometrischen Bestimmung in Relation zur Kontrollgruppe (21% O₂, Medium).

* p<0,0005 für BSO vs. Kontrolle bei 80% O₂, ½ h

p<0,0001 für BSO vs. Kontrolle bei 80% O₂, 4h