

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Übersicht über die wichtigsten Oxidantien und enzymatischen Antioxidantien. O ₂ = molekularer Sauerstoff; O ₂ ⁻ = Superoxid-Anion; H ₂ O ₂ = Wasserstoffperoxid; OH [·] = Hydroxyl-Radikal; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ = Eisenion; GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion; NADPH = reduziertes Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat; NADP ⁺ = oxidiertes Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat; Cat = Katalase; GSH-Px = Glutathion-Peroxidase; GSH-R = Glutathion-Reduktase; SOD = Superoxid-Dismutase.....	14
Abb. 1-2: Übersicht über die Regulation des Zellzyklus	22
Abb. 2-1: Reduktion von MTT zu Formazan	30
Abb. 2-2: CM-H₂DCF-DA = 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat	31
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).....	32
Abb. 2-4: Beispiele für durchflusszytometrische Analysen. a) Registrierung von orthogonal gestreutem Licht (= Side Scatter) und FITC-markiertem aktivierte 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 aktivierte Caspase-3-Antikörper, weiss).....	35
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) Durchfluss-zytometrisches Profil undifferenzierter PC12-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit 200 nM SSP als Apoptose-Induktor und d) Darstellung der entsprechenden prozentualen Verteilung. .	36
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.....	42
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 ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	43
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).....	44
Abb. 3-4: BSO und Hyperoxie induzieren ROS-Akkumulation in nativen PC12-Zellen. Undifferenzierte PC12-Zellen wurden 24 h mit Medium oder 200 µM BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft [schwarze Linie] oder Hyperoxie [graue Linie]. Messung des DCF-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	45
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).	47
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).....	48
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 µM BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft (weiße Balken) oder Hyperoxie (dunkle Balken). Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	49
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 ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	50
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.	51
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.	52
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 µM BSO präinkubiert, anschließend 24 h Inkubation bei Raumluft [helle Balken] oder Hyperoxie [dunkle Balken]. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe. Daten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	53
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)..	54
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).	56
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).....	57
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).....	58
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 µM) und NGF (10 bis 500 ng/ml) inkubiert. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes ± Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumluftgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6.	59
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 μ M) und NGF (100 ng/ml) [grauer Balken] behandelt. Messung des MTT-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumlufgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6..... 60

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 Raumlufgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6. 61

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 Raumlufgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6..... 62

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 Raumlufgruppe (=100%, nicht dargestellt). Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6..... 63

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 μ M, U0126: 10 μ M). Messung des DCF-Umsatzes, Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler in Relation zur unbehandelten Raumlufgruppe (=100%). Daten von 6 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=6. 64

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 Raumluf oder 80% O₂ für die angegebenen Zeiträume, anschließend Proteinextraktion und Westernblot-Analyse mit phospho-p42/44-MAPK-Antikörper..... 65