

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

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

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

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Alexandra Sell

Gießen 2001

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

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

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Bergmann

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

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Alexandra Sell
Tierärztin aus Hanau (Hessen)

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kummer
Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08. 2001

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	<i>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</i>	4
2.1.1	Extra-mitochondriale ROS-Quellen	4
2.1.1.1	NAD(P)H-Oxidase	4
2.1.1.2	Xanthin-Oxidase	5
2.1.2	Mitochondriale ROS-Quellen	6
2.1.3	Aufbau der Mitochondrien	6
2.1.3.1	Äußere und innere Mitochondrienmembran	6
2.1.3.2	Mitochondrienmatrix	7
2.1.4	Mitochondriale Atmungskette	7
2.1.4.1	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)	8
2.1.4.2	Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II)	10
2.1.4.3	Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)	11
2.1.4.4	Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)	13
2.2	<i>Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette</i>	14
2.3	<i>Mitochondriales Genom</i>	16
2.4	<i>Blockade von Anionenkanälen mit 4,4'-Diisothiocyano- stilbene-2,2'-disulfonat (DIDS)</i>	17
2.5	<i>Messung intrazellulärer ROS-Bildung</i>	18
3	Material und Methoden	20
3.1	<i>Zellkultur</i>	20
3.1.1	Zelllinie	20
3.1.2	Kulturbedingungen	20
3.1.3	Splitting	20
3.1.4	Kryokonservierung	21
3.1.5	Auftauen	21
3.1.6	Thiamphenicol-Behandlung	21
3.2	<i>ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren</i>	22
3.2.1	Aussaat der Zellen	22
3.2.2	Reagenzien	22
3.2.3	Kombination der eingesetzten Substanzen	23
3.2.4	Inkubation der Zellen	24
3.2.5	ROS-Messungen	25
3.2.5.1	Laserscanning	25
3.2.5.2	Messreihenfolge	25

3.2.5.3	Messvorgang	26
3.2.6	Statistische Auswertung	26
3.3	<i>Immunhistochemie</i>	27
3.3.1	Einfachimmunfluoreszenz	27
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	27
3.4	<i>Rezepturen eingesetzter Lösungen</i>	28
4	Ergebnisse	30
4.1	<i>Dihydrorhodamin 123</i>	30
4.1.1	PC-2 Zellen	30
4.1.2	T-PC12-Zellen	32
4.1.3	Inkubation von PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren	35
4.1.3.1	DPI	35
4.1.3.2	Rotenon	36
4.1.3.3	Rotenon und DPI	37
4.1.3.4	NaN ₃	40
4.1.4	Inkubation von T-PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren	43
4.1.4.1	Rotenon	43
4.1.4.2	Rotenon und DPI	44
4.1.4.3	NaN ₃	46
4.1.3	Inkubation von PC12-Zellen mit dem Anionenkanalblocker DIDS	49
4.2	<i>2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat</i>	52
4.2.1	PC12-Zellen	52
4.2.2	T-PC12-Zellen	54
4.2.3	Inkubation von PC12-Zellen mit dem Anionenkanalblocker DIDS	56
5	Diskussion	59
5.1	<i>Vergleich der intrazellulären Fluoreszenzindikatoren H₂R und DCFH-DA</i>	59
5.2	<i>Abgrenzung mitochondrialer von nicht-mitochondrialer ROS-Produktion unter Hypoxie</i>	60
5.2.1	PC12-Zellen	60
5.2.2	T-PC12-Zellen	61
5.3	<i>ROS-Produktion einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette</i>	62
5.3.1	Die Rolle der Komplexe III und IV bei der ROS-Produktion	63
5.3.2	Die Rolle der Komplexe I und II bei der ROS-Produktion	64
5.3.2.1	Wirkung von Rotenon auf die ROS-Produktion von Komplex I	65
5.3.2.2	Wirkung von DPI auf die ROS-Produktion von Komplex I	66

5.4	<i>Wirkung von DIDS auf die mitochondriale ROS-Produktion</i>	69
6	Zusammenfassung	71
7	Summary	73
8	Literaturverzeichnis	75
9	Anhang	93
9.1	<i>Eigene Veröffentlichungen zum Thema</i>	93
9.2	<i>Danksagung</i>	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
CoQ	Coenzym Q
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescin Diazetat
DCFH	2',7'-Dichlorofluorescin
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DHR	Dihydrorhodamin 123
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
Fe-S	Eisen-Schwefel-Zentrum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMN	Flavinmononucleotid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ R	Dihydrorhodamin 123
IMAC	Anionenkanal der inneren Mitochondrienmembran
LSM	Laser Scan Mikroskop
NaN ₃	Natriumazid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH [·]	Hydroxylradikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PC12-Zellen	Pheochromozytomzellen der Ratte
Q	Ubiquinon, Ubichinon
Q [·]	Semichinonradikal
QH ₂	Ubiquinol, Ubichinol
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
T-PC12-Zellen	Thiamphenicol-behandelte Pheochromozytomzellen der Ratte
TH	Tyrosinhydroxylase

Abkürzungsverzeichnis

XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthin-Oxidase

1 Einleitung

Sauerstoff (O_2) ist für alle Säugetierzellen lebensnotwendig (López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999). O_2 -Mangel (Hypoxie) löst daher auf zellulärer und molekularer Ebene verschiedene adaptive Reaktionen aus (López-Barneo et al., 1997; Chandel et al., 1998; Chandel und Schumacker, 2000; López-Barneo et al., 2001), um Zell- und Gewebsschädigungen durch O_2 -Mangel vorzubeugen. Die physiologische Antwort auf Hypoxie wird durch ein O_2 -sensitives Regulationssystem ermöglicht, das den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von Blut und Gewebe innerhalb der physiologischen Grenzen konstant hält (Acker, 1993; López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999). Dieses Regulationssystem verfügt über spezielle chemosensitive Zellen, zu denen unter anderem auch paraganglionäre Zellen gehören. (Übersicht bei Kummer, 1996; Conforti et al., 1999). Paraganglien sind Hypoxie-sensitive Organe, die permanent den arteriellen pO_2 messen und bei Hypoxie im Körper adaptive Reaktionen, wie reflektorische Hyperventilation und Katecholaminfreisetzung, initiieren (Czyzyk-Krzeska, 1997; López-Barneo et al., 1997; Höhler et al., 1999). Auch das Nebennierenmark gehört zu den Paraganglien (Übersicht bei Kummer, 1996). Besonders während des hypoxischen Stresses zum Zeitpunkt der Geburt ist die Sekretion von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark für das Überleben des Fetus essentiell (Lagercrantz, 1996).

Trotz zunehmender Erkenntnisse über die Hypoxie-induzierten zellulären Reaktionen wurde der eigentliche O_2 -Sensor in chemosensitiven Zellen noch nicht eindeutig identifiziert. Der genaue Mechanismus, mit dem Zellen die Änderungen des pO_2 detektieren und diese in eine physiologische, adaptive Antwort umwandeln, ist nach wie vor unbekannt. (Acker und Xue, 1992; López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999; Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000).

Greene und Tischler (1976) isolierten eine Tumorzelllinie (PC12-Zellen) aus dem Nebennierenmark der Ratte, die eine hohe Sensitivität gegenüber O_2 -Schwankungen aufweist (Conforti et al. 1999) und sich daher sehr gut für Studien am O_2 -messenden Mechanismus der Paraganglien eignet (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Zhu et al., 1996; Taylor und Peers, 1998). Die PC12-Zellen reagieren auf Hypoxie mit Membrandepolarisation (Conforti et al., 1997), Katecholaminfreisetzung (Kumar et al., 1998; Taylor und Peers, 1998) und verstärkter Genexpression der Tyrosinhydroxylase

(TH), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Katecholaminsynthese (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998).

Um die zellulären Reaktionsmechanismen auf O₂-Mangel genauer zu untersuchen, führten Höhler et al. (1999; 2000) Hypoxie-Experimente an PC12-Zellen durch. Wie zuvor von anderen Arbeitsgruppen bei Kardiomyozyten (Duranteau et al., 1998) und Hep3B-Zellen (Chandel et al., 1998) beschrieben, konnten auch Höhler und Mitarbeiter (1999; 2000) einen Hypoxie-bedingten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beobachten. Zudem konnten Duranteau et al. (1998) bei Kardiomyozyten und Chandel et al. (1998) bei Hep3B-Zellen zwischen der Hypoxie-bedingten ROS-Zunahme und den anschließenden Zellreaktionen einen Zusammenhang nachweisen. Diese Autoren folgerten daraus, ebenso wie Cross und Jones (1990), Youngson et al. (1997), Wolin et al. (1999) sowie Chandel und Schumacker (2000), dass ROS als intrazelluläre second messenger beim Prozess des O₂-Messens und der Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielen.

ROS werden im Rahmen des enzymgebundenen Elektronentransports gebildet, der in allen biologischen Systemen einen wichtigen, natürlichen Prozess darstellt. Die meisten Proteine, die den Elektronentransfer katalysieren, sind aus mehreren redoxaktiven Kofaktoren zusammengesetzt (Sharp und Chapman, 1999).

Bisher existieren verschiedene Auffassungen darüber, welche Redoxproteine für die ROS-Produktion im Zusammenhang mit der O₂-Sensitivität in der Zelle verantwortlich sind. Neben einigen extra-mitochondrialen Enzymsystemen, darunter die NAD(P)H-Oxidase (Jones et al., 1996; Kummer und Acker, 1997; Kummer et al., 1999; Vanden Hoek et al., 1998; López-Barneo et al., 2001), die Xanthin-Oxidase und das Cytochrom P-450 (Zulueta et al., 1995; Jones et al., 1996; Vanden Hoek et al., 1998), stellt insbesondere die mitochondriale Atmungskette (Zulueta et al., 1995; Kummer und Acker, 1997; Vanden Hoek et al., 1998; Chandel et al., 1998; López-Barneo et al., 2001) einen Entstehungsort für ROS dar. Es ist allerdings noch ungeklärt, welches dieser Systeme in paraganglionären Zellen für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg mit second-messenger-Funktion verantwortlich ist.

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit eine Differenzierung mitochondrialer von nicht-mitochondrialen Quellen von ROS bei PC12-Zellen unter Hypoxie vorgenommen werden. In einer eigenen Voruntersuchung wurden hierfür zunächst die beiden Redox-

sensitiven Fluoreszenzindikatoren Dihydrorhodamin 123 (H_2R) und 2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat (DCFH-DA) in ihrer Eignung für Messungen intrazellulär gebildeter ROS verglichen. Um festzustellen, ob mitochondriale oder nicht-mitochondriale Enzymsysteme für die ROS-Bildung unter Hypoxie verantwortlich sind, wurden PC12-Zellen mit Thiamphenicol behandelt (T-PC12-Zellen). Diese Substanz inhibiert, wie ihr Analogon Chloramphenicol (Kroon et al., 1976), spezifisch die mitochondriale Proteinbiosynthese (Kuzela und Luciakova, 1983; Kuzela et al., 1988). Bei T-PC12-Zellen war daher der Verlust von mitochondrial kodierten Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe zu erwarten, wodurch ein physiologischer Elektronentransport durch die Atmungskette unmöglich wird.

Die PC12-Zellen und T-PC12-Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie inkubiert und anschließend wurde die intrazelluläre ROS-Bildung gemessen. Außerdem wurden beide Zellgruppen mit den Atmungsketteninhibitoren Diphenyleneiodonium (DPI), Rotenon und Natriumazid (NaN_3) inkubiert, um die Bedeutung der einzelnen mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei der Hypoxie-bedingten ROS-Produktion zu ergründen.

2 Literaturübersicht

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Während der Übertragung von Elektronen auf O_2 können durch eine unvollständige Reduktion des O_2 -Moleküls verschiedene Sauerstoffradikale entstehen. Die ROS werden aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen und Ladungen in Superoxid-Anionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH \cdot), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Hydrogenperoxid (H_2O_2) eingeteilt. Diese ROS spielen nicht nur bei der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle (Bellative, 1988; Karnovsky, 1994). Studien an verschiedenen Zelltypen haben zudem gezeigt, dass ROS auch unter Hypoxie als intrazelluläre Transmitter von besonderer Bedeutung für den Organismus sind (Chandel und Schumacker, 2000). Es kommen verschiedene zelluläre Enzymsysteme als Entstehungsort für ROS in Frage, die entweder im Zytosol oder in den Mitochondrien lokalisiert sind (Cross und Jones, 1990; Zulueta et al., 1995; Jones et al.; 1996; Kummer und Acker, 1997).

2.1.1 Extra-mitochondriale ROS-Quellen

2.1.1.1 NAD(P)H-Oxidase

Paraganglien sind Hypoxie-sensitive Organe, die den Organismus vor hypoxischen Zuständen schützen (Übersicht bei Kummer, 1996), indem sie mit einem noch weitgehend unbekanntem Mechanismus (López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999) den arteriellen pO_2 messen und adaptive Reaktionen im Körper initiieren (Übersicht bei Kummer, 1996). Eines der Modelle zum O_2 -messenden Mechanismus von Paraganglien beinhaltet, dass eine Flavohämoprotein-haltige NAD(P)H-Oxidase unter Normoxie kontinuierlich eine gleichbleibende Menge an ROS bildet. Unter Hypoxie führt die verminderte O_2 -Verfügbarkeit zu einer verlangsamten, geringeren ROS-Produktion, wodurch physiologische, zelluläre Reaktionen aktiviert werden (Acker und Xue, 1992; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Chandel und Schumacker, 2000).

Die NAD(P)H-Oxidase stellt einen Multipolypeptidkomplex dar, der ursprünglich bei neutrophilen Granulozyten beschrieben wurde (Cross und Jones, 1990; Karnovsky, 1994). Diverse Proteinkomponenten des Enzyms werden auch in anderen O₂-sensitiven Zellen exprimiert (Chandel und Schumacker, 2000). Dies ergaben Untersuchungen an Typ I Zellen des Glomus caroticum (Kummer und Acker, 1995), an neuroepithelialen Körperchen der Lunge (Youngson et al., 1997) sowie eine Studie an Erythropoietin-produzierenden Lebertumorzellen (HepG2, Görlach et al., 1993). Zudem konnte gezeigt werden, dass verschiedene NAD(P)H-Oxidase-Typen existieren, die als MOX 1, MOX 2, ThOX 1, ThOX 2 (Ullrich und Bachschmid, 2000) und Renox (Geiszt et al., 2000) bezeichnet werden.

2.1.1.2 Xanthin-Oxidase

Ein weiteres, gut bekanntes O₂⁻-bildendes System stellt die Xanthin-Oxidase (XO) dar (Cross und Jones, 1990; Ullrich und Bachschmid, 2000), die in Endothelzellen und anderen Zellen membrangebunden vorliegt (Ullrich und Bachschmid, 2000). Die Xanthin-Oxidase und Xanthin-Dehydrogenase (XDH) sind Enzyme, die in den Purin- und Pyrimidinstoffwechsel involviert sind (Hille und Nishino, 1995). Studien haben gezeigt, dass nach Ischämie und Reoxygenierung die XO durch Thiol-Oxidation oder proteolytischer Abspaltung aus der XDH entsteht. Die während einer Ischämie mit nachfolgender Reoxygenierung gebildeten ROS der XO werden unter anderem für die anschließend auftretenden endothelialen Schäden verantwortlich gemacht (Cross und Jones, 1990; Ullrich und Bachschmid, 2000). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Hypoxie-induzierte ROS-Bildung, vor allem in Endothelzellen, nicht auf eine XO-Produktion zurückzuführen ist (De Groot und Littauer, 1988; Littauer und De Groot, 1992; Hawes und Watts, 1993; Zulueta et al., 1995).

2.1.2 Mitochondriale ROS-Quellen

Mitochondrien, die mehr als 90% des zellulären O_2 konsumieren, stellen ebenfalls eine potentielle ROS-Quelle der Zelle dar (Boveris und Chance, 1973; Turrens und Boveris, 1980). Anhand zahlreicher Untersuchungen an Mitochondrien, die aus den unterschiedlichsten Geweben isoliert wurden, konnte gezeigt werden, dass Säugetiermitochondrien unter physiologischen Bedingungen H_2O_2 produzieren (Boveris und Chance, 1973). Hierbei scheinen die Mitochondrien zunächst O_2^- zu bilden (Turrens et al., 1991), das dann schnell zu H_2O_2 dismutiert (Henderson und Chappell, 1993; Karnovsky, 1994).

Obwohl schon lange Zeit bekannt ist, dass Mitochondrien ROS produzieren, standen vor allem ihre zellulären Stoffwechselfunktionen wie beispielsweise die Adenosin-5'-triphosphat (ATP)-Produktion im Vordergrund (Chandel und Schumacker, 1999). Verschiedene Autoren vermuten jedoch, dass die Mitochondrien in chemosensitiven Zellen außerdem als O_2 -Sensor fungieren, indem sie unter Hypoxie gesteigert ROS bilden (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998). Diese ROS scheinen als „second messenger“ eine adaptive, physiologische Reaktion im Organismus zu induzieren (Chandel und Schumacker, 1999; 2000). Demnach kommt den Mitochondrien neben ihrer wichtigen Stoffwechselfunktion außerdem eine große Bedeutung bei der lebensnotwendigen Erkennung von O_2 -Schwankungen und die daran gekoppelte Aktivierung von Adaptionsmechanismen zu.

2.1.3 Aufbau der Mitochondrien

2.1.3.1 Äußere und innere Mitochondrienmembran

Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Die glatte, äußere Membran ist reich an Porin, einem Transmembranprotein, das unspezifische Poren bildet und den Durchtritt von kleinen Molekülen und Ionen bis zu einer Größe von 5 kD ermöglicht (Lloreta-Trull und Serrano, 1998).

An die äußere Membran schließt sich die proteinreiche und stark gefaltete innere Mitochondrienmembran an. In diesen als Cristae bezeichneten Einstülpungen der inneren Membran sind die Enzyme und Redoxproteine, die den Elektronentransport und die oxidative Phosphorylierung katalysieren, lokalisiert (Lloreta-Trull und Serrano, 1998). Die innere Membran ist für viele Metaboliten, polare Moleküle und die meisten Ionen aufgrund ihres hohen Gehalts an Cardiolipin (Capaldi, 1983; Hatefi, 1985; Lloreta-Trull und Serrano, 1998) impermeabel. Sie ist nur für Moleküle durchlässig, für die spezielle Transportproteine vorhanden sind. Dies führt zu einer Abgrenzung und Isolierung des Mitochondriums vom Cytosol und ermöglicht den Aufbau eines elektrochemischen Potentialgradienten über diese innere Membran (Lloreta-Trull und Serrano, 1998).

2.1.3.2 Mitochondrienmatrix

Die innere Mitochondrienmembran umschließt die Matrix. Sie beinhaltet neben den löslichen Enzymen des oxidativen Stoffwechsels Substrate, Nucleotid-Kofaktoren sowie anorganische Ionen (Lloreta-Trull und Serrano, 1998).

Außerdem enthält die Matrix den genetischen Apparat der Mitochondrien, der eine Reihe verschiedener Mitochondrienproteine synthetisiert (Capaldi, 1982; siehe 2.3).

2.1.4 Mitochondriale Atmungskette

Schon vor mehr als 25 Jahren wurde gezeigt, dass die mitochondriale Elektronentransportkette, auch Atmungskette genannt, aus vier grossen Multiproteinkomplexen besteht (Capaldi et al., 1988). Die vier Enzymkomplexe, die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat-Ubiquinon-Reduktase (Komplex II), die Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) durchspannen die innere Mitochondrienmembran aller Säugergewebe und füllen sie fast komplett aus (Capaldi et al., 1988, 1991). In der mitochondrialen

Atmungskette werden Elektronen vom NADH über die Komplexe I, III und IV auf O_2 transferiert. Dabei findet eine an den Elektronentransport gekoppelte transmembrane Protonen-Translokation statt, die zum Aufbau einer elektrochemischen Protonenenergie führt. Diese Protonenenergie wird zur ATP-Synthese durch die ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten H^+ -ATPase (Komplex V) genutzt (Hatefi, 1985; Weiss et al., 1991). Bei diesem als oxidative Phosphorylierung bezeichneten Prozess entsteht aus Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und anorganischem Phosphor energiereiches ATP (Chandel und Schumacker, 1999), der wichtigste Energiespeicher und -überträger des Intermediärstoffwechsels.

2.1.4.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (auch als NADH-Q-Reduktase oder NADH-Dehydrogenase bezeichnet) ist ein 880 kD großer Multi-Polypeptidkomplex, der in Säugerzellen aus mehr als 40 Polypeptiduntereinheiten besteht (Hatefi, 1985; Morgan-Hughes et al., 1988; Friedrich et al., 1990; Koerber et al., 1998). Er katalysiert mit seinen verschiedenen redoxaktiven prosthetischen Gruppen den Elektronen-Transfer vom NADH auf das Ubiquinon (Morgan-Hughes et al. 1988; Ragan, 1990; Friedrich et al. 1990; Leif et al., 1993).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Komplex I von *Neurospora crassa* zeigten, dass die NADH-Q-Reduktase eine zweiteilige, L-förmige Struktur (Abb. 1) aufweist (Weiss et al., 1991a; Leif et al., 1993). Der horizontale, hydrophobe Anteil des Enzym-Komplexes befindet sich innerhalb der Membran. Sein vertikaler Anteil weist in Richtung Matrix (Abb. 1) und enthält neben peripheren Membranproteinen (Leif et al., 1993) ein Molekül Flavinmononucleotid (FMN) (Fearnley und Walker, 1992). FMN bindet als redoxaktive, prosthetische Gruppe der NADH-Dehydrogenase in der Matrix gebildetes NADH (Fearnley und Walker, 1992) und übernimmt dessen Elektronenpaar. Das aus diesem Vorgang hervorgegangene $FMNH_2$ gibt die Elektronen an eine Reihe (vier bis fünf) von Eisen-Schwefel-Clustern (Eisen-Schwefel-Zentren, Fe-S) ab, die der NADH-Q-Reduktase als weitere redoxaktive prosthetische Gruppe dienen (Ragan, 1990; Friedrich et al., 1990; Fearnley und Walker, 1992). Die Fe-S stellen in Nichthäm-

Eisen-Proteinen aufgrund ihrer Beteiligung an Reduktionsreaktionen eine wichtige redoxaktive prosthetische Gruppe dar (Vervoort, 1991). Komplex I enthält die beiden häufigsten Typen, [2Fe-2S] und [4Fe-4S], die als N-1 bis N-4 bezeichnet werden (Weiss et al., 1991).

Die Elektronen fließen innerhalb des vertikalen Arms des Enzym-Komplexes von FMNH₂ über die drei hintereinander geschalteten Eisen-Schwefel-Zentren N-1 ([2Fe-2S]), N-3 und N-4 (jeweils [4Fe-4S]), zu einem internen, gebundenen Coenzym Q (CoQ) (Weiss et al., 1991a). Gleichzeitig wird FMNH₂ zu FMN zurückoxidiert, das erneut Elektronen von NADH aufnehmen kann (Abb. 1).

CoQ ist ein lipophiles (Fearnley und Walker, 1992) Chinonderivat mit einer langen, 10-gliedrigen Isoprenoidkette (Shults et al., 1997), das aufgrund seines ubiquitären Auftretens in lebenden biologischen Systemen als Ubiquinon (Ubichinon, Q) bezeichnet wird. Durch die Aufnahme eines Elektrons entsteht ein reduziertes Semichinonzwischenprodukt (Q[•]). Die Aufnahme eines zweiten Elektrons reduziert dieses enzymgebundene Zwischenprodukt zum Ubiquinol (Ubichinol, QH₂) (Ragan, 1990). Von dem fest gebundenen QH₂ gelangen die Elektronen innerhalb des horizontalen Anteils von Komplex I zu einem als N-2 bezeichneten Eisen-Schwefel-Cluster. Von hier werden sie auf ein weiteres Q transferiert (Ragan, 1990; Weiss et al. 1991a), das ungebunden ist und aufgrund seines unpolaren Charakters schnell in die innere Mitochondrienmembran diffundieren kann (Abb. 1).

Während die NADH-Q-Reduktase den in Stufen ablaufenden Transfer von zwei Elektronen vom NADH zum QH₂ katalysiert, werden vier Protonen von der Matrix- auf die Cytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt (Friedrich et al., 1990; Weiss et al., 1991a; Fearnley und Walker, 1992; Leif et al., 1993). Dabei wird die Redoxenergie in einen elektrochemischen Protonenpotentialgradienten über der inneren Mitochondrienmembran umgewandelt (Fearnley und Walker, 1992). Dies liegt an der Akkumulation von H⁺ auf der Cytosolseite der inneren Membran gegenüber der Matrixseite. Die Cytosolseite wird dadurch zunehmend positiv geladen und der pH fällt. Auf der Matrixseite verhält es sich genau umgekehrt (Abb. 1).

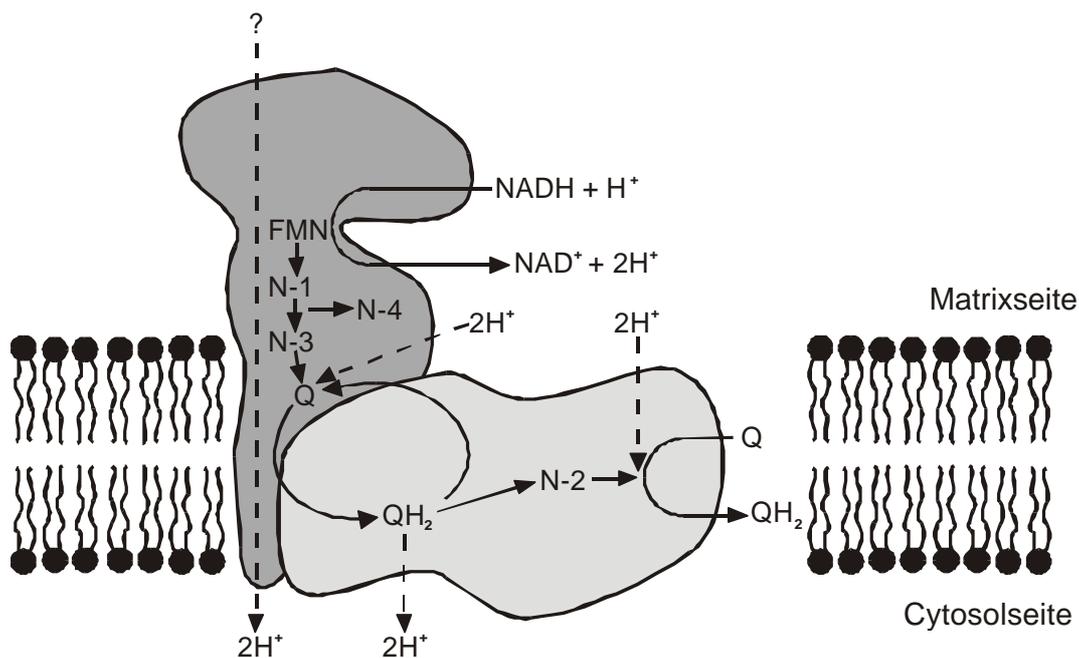


Abb. 1: Modell der L-förmigen NADH-Dehydrogenase. Der vertikale, periphere Arm des Enzyms beinhaltet die NADH-Bindungsstelle, das FMN-Molekül, die Fe-S N-1, N-3 und N-4, sowie das interne Ubiquinon (Q) in oxidierten Form. Sein horizontaler, in der Membran befindlicher Arm enthält das interne Ubiquinon in reduzierter Form (Ubiquinol, QH₂), den Fe-S N-2 und die Ubiquinon-Bindungsstelle (nach Weiss et al., 1991a).

2.1.4.2 Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II)

Die Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Succinat-Q-Reduktase) ist ein Enzymkomplex mit einer Molekülmasse von 140 kD, der Elektronen von Succinat auf CoQ transferiert (Hatefi, 1985).

Der Enzymkomplex ist vollständig in die innere Mitochondrienmembran integriert (Capaldi, 1982; Capaldi et al, 1988) und aus fünf Untereinheiten aufgebaut (Davis und Hatefi, 1971). Seine größte Komponente stellt die membrangebundene Succinat-Dehydrogenase dar, die im Zitronensäurezyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert (Hatefi, 1985). Das bei der Oxidation im Enzym-Komplex entstehende FADH₂ überträgt unter Beteiligung von einem kovalent gebundenen FAD (Davis und Hatefi, 1971; Hanstein et al., 1971), einem [4Fe-4S]-Cluster (S-3), zwei [2Fe-2S]-

Clustern (S-1 und S-2, Hatefi, 1985) sowie einem Cytochrom b (Hanstein et al., 1971; Capaldi, 1982; Hatefi, 1985; Capaldi, 1991) seine Elektronen auf Q.

Bei der Elektronenübertragung durch Komplex II werden jedoch keine Protonen durch die innere Membran gepumpt, da nur wenig freie Energie erzeugt wird (Hatefi, 1985).

2.1.4.3 Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)

Die Cytochrom-c-Reduktase (Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase bzw. Cytochrom-bc₁-Komplex) transferiert die Elektronen von Ubiquinol weiter auf Cytochrom c und pumpt gleichzeitig Protonen von der negativ geladenen Matrixseite auf die positiv geladene Cytosolseite der inneren Mitochondrienmembran (Hatefi, 1985; Trumpower, 1990).

Der Enzymkomplex mit einer Molekülmasse von 250 kD (Hatefi, 1985) besteht aus elf Untereinheiten (Capaldi et al., 1988) und ist asymmetrisch in die innere Mitochondrienmembran integriert. Er enthält neben Q außerdem drei Elektronenübertragende Proteine; Cytochrom b, ein transmembranes Protein, das zwei nicht-kovalent gebundene Häm b-Gruppen (b₅₆₂ und b₅₆₆) enthält, ein Cytochrom c₁ mit einer kovalent gebundenen Häm c-Gruppe und ein [2Fe-2S]-Cluster (Capaldi, 1982; Hatefi, 1985; Trumpower, 1990; Yue et al., 1991).

QH₂ überträgt eines seiner beiden Elektronen auf das matrixnahe [2Fe-2S]-Protein. Das dabei entstehende, instabile Q^{•-} reduziert sofort durch Übertragung seines anderen Elektrons Cytochrom b₅₆₆ und wird zu Q zurückoxidiert. Im nächsten Reaktionsschritt wird das erste Elektron vom [2Fe-2S]-Protein über Cytochrom c₁ auf das periphere Membranprotein Cytochrom c transferiert und das zweite Elektron von Cytochrom b₅₆₆ auf Cytochrom b₅₆₂ übertragen. Von dort gelangt das Elektron auf ein in Cytosolnähe lokalisiertes Q, das zum relativ stabilen Q^{•-} umgewandelt wird (Abb. 2; Hatefi, 1985; Trumpower, 1990).

Um dieses „gespeicherte“ Elektron ebenfalls auf Cytochrom c zu transferieren, reagiert ein zweites Molekül QH₂ mit Komplex III. Ein Elektron wird wie oben beschrieben zu Cytochrom c transportiert, das zweite wird von dem erneut gebildeten Q^{•-} wieder über

Cytochrom b_{566} auf Cytochrom b_{562} übertragen. Durch den Transfer des Elektrons von Cytochrom b_{562} auf das zuvor gebildete, in Zytosolnähe lokalisierte Q^- wird es zu QH_2 reduziert (Abb. 2; Hatefi, 1985; Trumpower, 1990).

In diesem als Q-Zyklus bezeichneten Reaktionsablauf werden die Elektronen effizient von einem Zwei-Elektronen-Carrier, dem Q, an den Ein-Elektronen-Akzeptor (Cytochrom c) weitergegeben. In einem kompletten Q-Zyklus werden ein Elektronenpaar von QH_2 auf zwei Moleküle Cytochrom c und vier Protonen von der Matrixseite auf die Zytosolseite der Mitochondrienmembran transportiert (Abb. 2; Hatefi, 1985; Trumpower, 1990).

Cytochrom c setzt sich aus einer Polypeptidkette mit 104 Aminosäuren und einer kovalent gebundenen Hämgruppe zusammen. Es bindet wechselweise an das Cytochrom c_1 von Komplex III und an den Komplex IV. Es dient sozusagen als Elektronen-Shuttle zwischen den beiden Komplexen der Atmungskette (Skulachev, 1998).

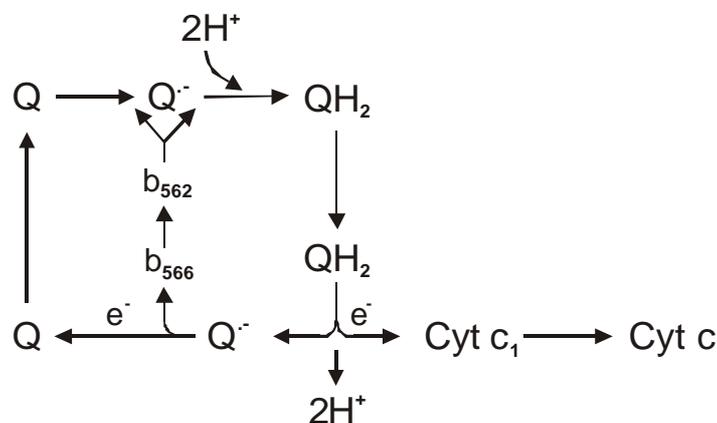


Abb. 2: Modell des Elektronentransfers vom Ubichinol zum Cytochrom c. QH_2 überträgt ein Elektron auf das matrixnahe Fe-S. Das entstehende Q^- transferiert das andere Elektron auf Cytochrom b_{566} und wird dabei zu Q oxidiert. Das erste Elektron gelangt anschließend vom Fe-S zu Cytochrom c_1 und von dort zum peripheren Cytochrom c. Gleichzeitig wird das zweite Elektron vom Cytochrom b_{566} auf Cytochrom b_{562} übertragen. Von dort wird es auf zytosolnahes Q transportiert. Das entstehende Q^- wird durch den erneut ablaufenden Q-Zyklus durch die Aufnahme zweier neuer Elektronen zum QH_2 reduziert (nach Trumpower, 1990).

2.1.4.4 Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Die Cytochrom-c-Oxidase katalysiert die vierfache Elektronenübergabe vom reduzierten Cytochrom c auf molekularen O_2 (Capaldi, 1983; Chan und Li, 1990) und pumpt gleichzeitig acht Protonen von der Matrix auf die Zytosolseite der inneren Membran (Chan und Li, 1990).

Das Y-förmige Enzym (Abb. 3; Capaldi, 1982; Hatefi, 1985) ist ein 200 kD großes Transmembranprotein (Hatefi, 1985), das bei Säugern aus mindestens dreizehn Untereinheiten besteht (Kadenbach und Merle, 1981; Takamiya et al., 1987; Azzi und Müller, 1990; Chan und Li, 1990; Malmström, 1990). Seine drei größten Untereinheiten (CO I-III) werden von mitochondrialer DNA kodiert (Kadenbach und Merle, 1981; Capaldi, 1983; Hatefi, 1985, Chan und Li, 1990; Malmström, 1990). Die Cytochrom-c-Oxidase verfügt über vier redoxaktive prosthetische Gruppen, Cytochrom_a, Cytochrom_{a₃} und zwei Kupferionen (Cu_A und Cu_B), die in den Untereinheiten I und II lokalisiert sind (Capaldi, 1982; Hatefi, 1985; Azzi und Müller, 1990; Chan und Li, 1990).

Jeweils zwei prosthetische Gruppen bilden zusammen die beiden katalytischen, redoxaktiven Zentren des Enzyms (Hatefi, 1985; Chan et al., 1990). Das erste redoxaktive, bimetallische Zentrum (Cytochrom_a Cu_A) von Komplex IV übernimmt das Elektron von Cytochrom c (Capaldi, 1983) und überträgt es auf sein zweites bimetallische Zentrum (Cytochrom_{a₃} Cu_B), das zuvor molekularen O_2 gebunden hat (Capaldi, 1983; Hatefi, 1985; Chan und Li, 1990). Dies hat eine Teil-Reduktion des Cytochrom_{a₃} Cu_B -Zentrums (Cu_B^{2+} zu Cu_B^+) zur Folge. Im nächsten Reaktionsschritt reduziert ein zweites, von Cytochrom c übertragenes Elektron die Häm-Gruppe des Cytochrom a₃ (Fe^{3+} zu Fe^{2+}). Das vollständig reduzierte Cytochrom_{a₃} Cu_B -Zentrum übergibt nun die beiden Elektronen an den gebundenen Sauerstoff, wodurch ein Peroxyzwischenprodukt entsteht (Abb. 3; Chan und Li, 1990).

Durch die Einschleusung eines weiteren Elektrons über Cytochrom c und die Aufnahme von 2 H^+ wird das Peroxid abgespalten. Bei der anschließenden Übertragung eines vierten Elektrons und der erneuten Aufnahme von 2 H^+ werden schließlich zwei Moleküle H_2O freigesetzt (Abb. 3; Hatefi, 1985).

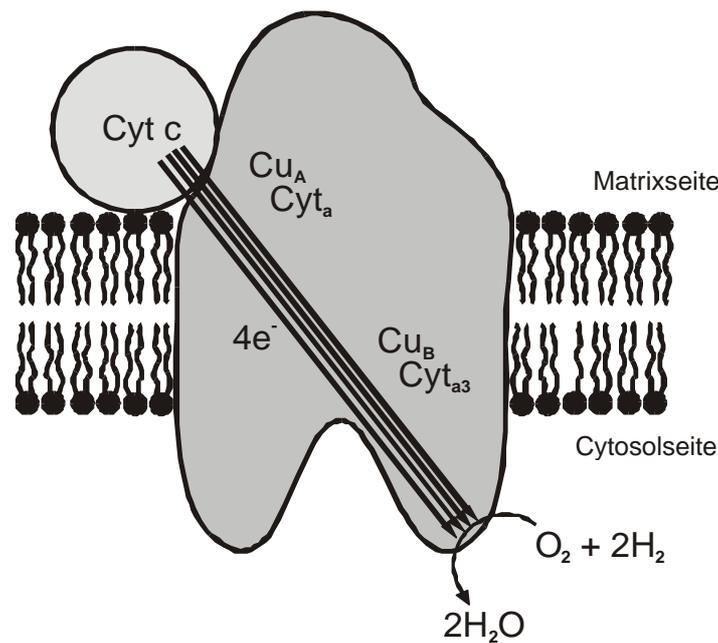


Abb. 3: Modell der Cytochrom-c-Oxidase und der Anordnung der redoxaktiven, bimetallichen Zentren Cytochrom_aCu_A und Cytochrom_{a3}Cu_B des Enzyms. Das Cytochrom_aCu_A-Zentrum übernimmt das Elektron von Cytochrom c und überträgt es auf Cytochrom_{a3}Cu_B, welches zuvor O₂ gebunden hat (nach Malmström, 1990).

2.2 Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette

Der mitochondriale Elektronentransport ist an jedem einzelnen Atmungskettenkomplex durch einen spezifischen Inhibitor blockierbar (Abb. 4).

Diphenyliodonium (DPI) ist eine Substanz (Abb. 5a), die spezifisch an die Flavoprotein-Komponente von Flavoenzymen bindet und dort den Elektronentransfer inhibiert (Abb. 1 und 4; Meier et al., 1991; Jones et al., 1996). DPI hemmt demnach Enzymsysteme, die Flavoproteine beinhalten, wie die NADPH-Oxidase (Cross und Jones, 1986; Zulueta et al., 1995; Li und Trush, 1998), Xanthin-Oxidase, Stickstoffmonoxid-Synthetase (Zulueta et al., 1995) und den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Chandel et al., 1998; Semenza, 1999).

Den klassischen Inhibitor der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase stellt allerdings Rotenon dar (Abb. 5b; Genova et al., 1997; Seaton et al., 1997), das spezifisch nur den Komplex I (Abb. 1 und 4) der mitochondrialen Atmungskette blockiert (Higuchi et al., 1998; Semenza, 1999). Dieser lipophile Hemmstoff (Marey-Semper et al., 1993) bindet an ein spezielles, von mitochondrialer DNA kodiertes (Earley et al., 1987) Komplex I-Polypeptid mit einer Molekularmasse von 33 kDa. Dadurch wird der Elektronentransfer in der NADH-Dehydrogenase zwischen den Fe-S und dem Ubiquinon inhibiert (Abb. 1 und 4; Palmer et al., 1968).

Bei NaN_3 handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Atmungsketteninhibitor der Cytochrom-c-Oxidase (Abb. 3 und 4; Petersen, 1977). In hohen Konzentrationen (5-10 mM) eingesetzt, erwirkt NaN_3 eine vollständige Komplex IV-Blockade, die mit einer gedrosselten mitochondrialen Respiration einhergeht. Niedrigere NaN_3 -Konzentrationen (<2 mM) vermindern die enzymatische Geschwindigkeit (V_{\max}) der Cytochrom-c-Oxidase. Dies führt zu einer partiellen Enzyminhibition, die unter Normoxie dem Hypoxie-Effekt auf Komplex IV gleichkommt (Budinger et al., 1998; Duranteau et al., 1998).

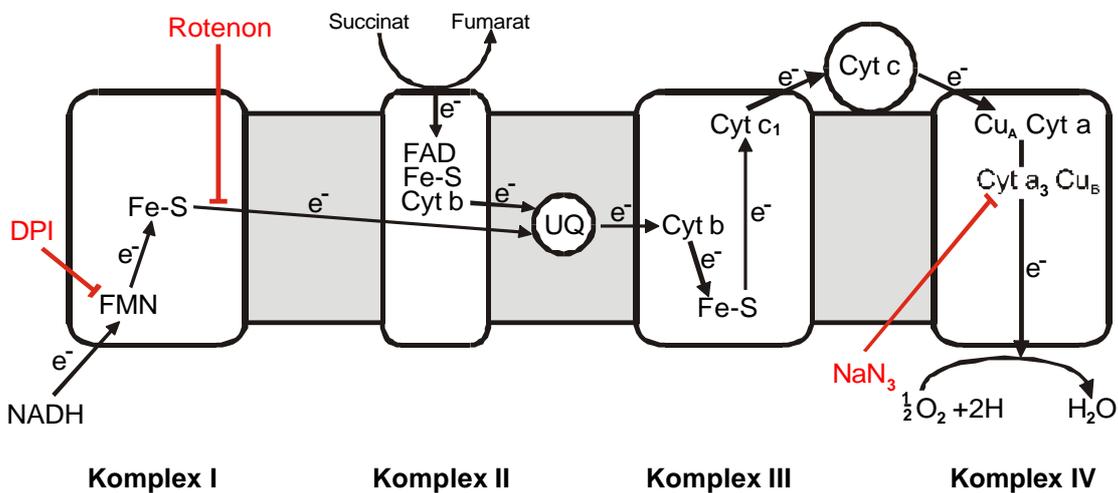


Abb. 4: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette und der Bindungsstellen der mitochondrialen Atmungsketteninhibitoren DPI, Rotenon und NaN_3 .

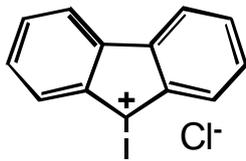


Abb.5a : Strukturformel des
Komplex I-Inhibitors DPI

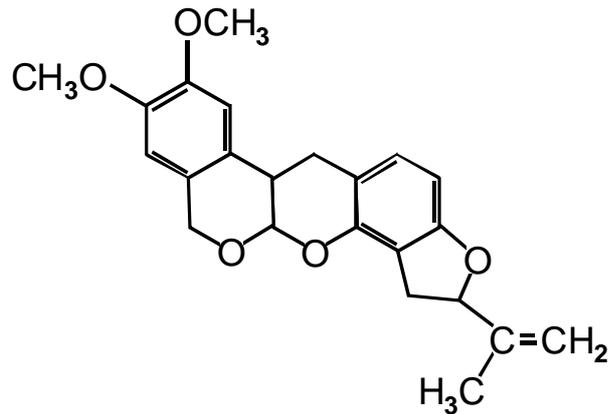


Abb. 5b: Strukturformel des Komplex I-
Inhibitors Rotenon

2.3 Mitochondriales Genom

Als biologische Besonderheit sind die Proteinkomponenten der Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette bei Säugern - mit Ausnahme von Komplex II - das Produkt von zwei verschiedenen Genomen. Dreizehn Untereinheiten mitochondrialer Enzymkomplexe (Morgan-Hughes et al., 1988; Gibb et al., 1990), darunter sieben Polypeptide von Komplex I (Chomyn et al., 1985; Morgan-Hughes et al., 1988; Attardi et al., 1991; Leif et al., 1993; Koerber et al.; 1998), werden vom mitochondrialen Genom kodiert und an mitochondrialen Ribosomen in der Mitochondrienmatrix synthetisiert (Capaldi, 1982; Morgan-Hughes et al., 1988). Die übrigen Polypeptide werden vom Kerngenom kodiert, an zytoplasmatischen Ribosomen translatiert und über ein spezifisches Transportsystem in die Mitochondrien importiert und dort integriert (Capaldi, 1983; Morgan-Hughes et al., 1988).

Der aus mehr als 41 Polypeptid-Untereinheiten bestehende Komplex I ist eines der komplexesten Enzyme, das je charakterisiert wurde (Fearnley und Walker, 1992). Anhand von Antikörpermarkierungen wurden die sieben von mitochondrialer DNA

kodierten Enzymuntereinheiten der Säuger-NADH-Dehydrogenase identifiziert (Weiss et al., 1991a). Diese sieben Polypeptid-Untereinheiten werden auch als ND-1 bis ND-6 und ND-4L-Untereinheiten bezeichnet (Chomyn et al., 1985; Nixon et al., 1989). Sie befinden sich alle innerhalb der Membran und beinhalten elektronenübertragende Komponenten, wie den N-2 Eisen-Schwefel-Cluster und die Ubiquinon-Bindungsstelle (Weiss et al., 1991). Untersuchungen von Tuschen und Mitarbeitern (1990) an *Neurospora crassa* zeigten jedoch, dass die anderen drei Fe-S N-1, N-3 und N-4, sowie das FMN-Molekül und das intern gebundene Ubiquinon vom Kerngenom kodiert werden.

Neben den Komplex I-Untereinheiten kodiert die mitochondriale DNA außerdem die als CO I, CO II und CO III bezeichneten Proteineinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Capaldi, 1983; Morgan-Hughes et al., 1988; Chan und Li, 1990; Malmström, 1990; Fearnley und Walker, 1992) und die Cytochrom b-Komponente der Cytochrom-c-Reduktase (Capaldi, 1983; Fearnley und Walker, 1992). Die Translation der mitochondrial kodierten Enzymuntereinheiten kann durch Chloramphenicol und sein Analogon Thiamphenicol (Kroon et al., 1976) speziell gehemmt werden (Weiss et al., 1991). Demnach kommt es nach Thiamphenicol-Behandlung der PC12-Zellen zum Verlust der mitochondrial kodierten Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe, die einen Elektronentransport durch die Atmungskette unmöglich machen. Diese Thiamphenicol-behandelten PC12-Zellen (T-PC12-Zellen) eignen sich daher besonders gut für Untersuchungen darüber, inwieweit die Mitochondrien für die Hypoxie-induzierte ROS-Bildung verantwortlich sind.

2.4 Blockade von Anionenkanälen mit 4, 4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonat (DIDS)

Verschiedene Untersuchungen deuten daraufhin, dass Anionenkanäle in den $O_2^{\cdot-}$ -Transport involviert sind (Paky et al., 1993) bzw. dass transmembrane Anionenkanäle den $O_2^{\cdot-}$ -Durchtritt durch Zellmembranen überhaupt erst ermöglichen (Takahashi und Asada, 1983). Dies folgerten Paky und Mitarbeiter (1983) aus einer intrazellulären $O_2^{\cdot-}$ -

Akkumulation nach Inkubation von Krebs-Henseleit-perfundierten Kaninchenlungen mit 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonat (DIDS). DIDS ist ein Anionenkanalblocker (Shafir et al., 1998; Wang et al., 2000), dessen Stilbene-Disulfonat-Gruppe reversibel an das Membranprotein Porin bindet (Thinnes et al., 1994). Die Arbeitsgruppe von Beavis und Davatol-Hag (1996) sowie Chandel et al. (2000a) konnten außerdem zeigen, dass DIDS auch die Anionenkanäle der inneren Mitochondrienmembran blockiert.

2.5 Messung intrazellulärer ROS-Bildung

Anhand von Fluoreszenzindikatoren kann die intrazelluläre ROS-Bildung nachgewiesen und quantifiziert werden. Dies stellt eine Alternative zu Verfahren dar, bei denen ROS im Extrazellularraum detektiert werden. Für den Nachweis der intrazellulären ROS-Produktion müssen die Zellen mit einem Indikator behandelt werden, der Zellmembranen penetrieren kann und eine minimale Toxizität aufweist. Weiterhin sollte sich der farblose Indikator spezifisch bei Kontakt mit ROS in seine fluoreszierende Form umwandeln und eine möglichst geringe spontane Autokonversion zeigen (Royall et al., 1993). Verschiedene Autoren berichteten, dass sich die farblosen Fluoreszenzindikatoren Dihydrorhodamin 123 (H_2R) und 2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat (DCFH-DA) hierfür gut eignen (Abb. 6a und 6b). Durch intrazellulär gebildete ROS, insbesondere H_2O_2 , werden die beiden Substanzen in ihre fluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 und 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Cathcart et al., 1983; Rothe et al., 1988; Emmendorffer et al., 1990; Henderson et al., 1993; Royall et al., 1993; Dugan et al., 1995; Crow, 1997; Hockberger et al., 1999). Da die Rhodamin 123- bzw. DCF-Fluoreszenzintensität mit der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration korreliert, kann die H_2O_2 -Produktion in Zellen am Fluoreszenzmikroskop gemessen werden (Royall et al., 1993; Chandel und Schumacker, 2000).

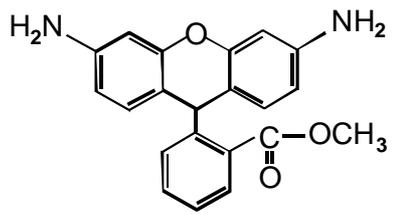


Abb. 6a: Strukturformel des Fluoreszenzindikators H₂R.

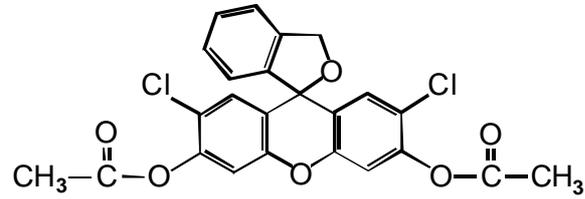


Abb. 6b: Strukturformel des Fluoreszenzindikators DCFH-DA.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie

Für die Zellkultur wurden PC12-Zellen, eine Phäochromocytom-Zelllinie der Ratte (Greene und Tischler, 1976), aus der American Tissue Type Cell Collection (Rockville, MD, USA) verwendet.

3.1.2 Kulturbedingungen

Zur Anzucht wurden 75 ml Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) für 1 Stunde mit fetalem Kälberserum (PAA, Marburg) beschichtet. Danach wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (Sigma, Deisenhofen), das je 500 ml mit 25 ml fetalem Kälberserum, 50 ml Pferdeserum (Pan Systems, Aidenbach), 5 ml Streptomycin/Penicillin (PAA) und 5 ml Glutamin (Biomol, Hamburg) angereichert wurde, suspendiert. Die PC12-Zellen wurden dreimal wöchentlich einem Mediumwechsel unterzogen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.3 Splitting

Die PC12-Zellen wurden nach 7-10 Tagen gesplittet. Hierfür wurden die adhärent wachsenden Zellen durch Zugabe von 3 ml Trypsin (PAA) von der Zellkulturflasche gelöst und 10 Minuten bei 500g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Hilfe einer silikonisierten Pasteurpipette mehrmals trituiert und dann im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

3.1.4 Kryokonservierung

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

3.1.5 Auftauen

Bei Bedarf wurden die Kryoröhrchen für 2-3 Minuten im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Der Inhalt wurde in 9 ml angewärmtes Kulturmedium pipettiert und zehn Minuten bei 500g zentrifugiert, um die Bestandteile des Einfriermediums möglichst gründlich zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Kulturmedium versetzt und in einer 75 mm^2 Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellen wie üblich inkubiert.

3.1.6 Thiamphenicol-Behandlung

Um die mitochondriale Translation der PC12-Zellen zu inhibieren, wurden dem Kulturmedium über 5 Tage 0,025 g Thiamphenicol (Sigma), 0,055 g Natrium-Pyruvat (PAA), 0,025 g Uridin (PAA) und 5 μl Penicillin/Streptomycin zugegeben. Am sechsten Tag wurden diese Thiamphenicol-behandelten PC12-Zellen (T-PC12-Zellen) in den Experimenten eingesetzt.

3.2 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren

3.2.1 Aussaat der Zellen

Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in Kulturmedium auf vier „Culture Slides“ (Falcon, Heidelberg), 30000 Zellen/Napf je Versuchsansatz ausgesät. Die Kammerung des Objektträgers in acht Näpfe ermöglichte die variable Kombination verschiedener Reagenzien an einem Versuchstag (Abb. 7).

L1	L2	R1	R2	
L3	L4	R3	R4	

Abb. 7: achtfache Kammerung eines Objektträgers für variable Substanzkombinationen (schematisch dargestellt).

3.2.2 Reagenzien

Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium von den Näpfen der „Culture Slides“ abgesaugt. In jeden Napf wurden anschließend 0,5 ml des jeweiligen Versuchsansatzes pipettiert. Abhängig vom Versuchsansatz wurden folgende Substanzen in unterschiedlicher Kombination und Anordnung in die Näpfe der „Culture Slides“ eingebracht:

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle	Vehikel	Konzentration
Dihydrorhodamin 123	H ₂ R	Sigma, Deisenhofen	Lockesche Lösung	25 µM
2',7'-Dichlorofluoreszein-Diazetat	DCFH-DA	Sigma, Deisenhofen	Kulturmedium	1 µM
Diphenyleniodonium	DPI	ICN, Aurora, USA	Lockesche Lösung	20 µM
Rotenon		Sigma, Deisenhofen	Lockesche Lösung	20 µM
Natriumazid	NaN ₃	Sigma, Deisenhofen	Lockesche Lösung	2,5 mM
4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonat	DIDS	ICN, Aurora, USA	Lockesche Lösung/ Kulturmedium	200 µM

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

3.2.3 Kombination der eingesetzten Substanzen

Fluoreszenz-indikator	Versuchsansatz + Experimentanzahl					
	20% O ₂ / 1% O ₂	20% O ₂ + DPI	20% O ₂ + Rotenon	20% O ₂ + Rotenon + DPI	20% O ₂ / 1% O ₂ + NaN ₃	20% O ₂ / 1% O ₂ + DIDS
H ₂ R	22	7	7	6	7	6
DCF	11					5

Tabelle 2: Kombination der eingesetzten Substanzen in unterschiedlichen Versuchsansätzen Angabe der Anzahl der jeweilig durchgeführten Experimente bei PC12-Zellen.

	Versuchsansatz + Experimentanzahl			
Fluoreszenz-indikator	20% O ₂ / 1% O ₂	20% O ₂ + Rotenon	20% O ₂ + Rotenon + DPI	20% O ₂ / 1% O ₂ + NaN ₃
H2R	11	3	3	3
DCF	6			

***Tabelle 3:** Kombination der eingesetzten Substanzen in unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Angabe der Anzahl der jeweilig durchgeführten Experimente bei T-PC12-Zellen.*

3.2.4 Inkubation der Zellen

Zwei Objektträger wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen, (Raumluft, 20% O₂) inkubiert. Die beiden anderen Objektträger wurden in einer abgedichteten Plastikbox mit einem Volumen von 300 ml unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Hierfür wurde über eine Schlauchkonstruktion im Deckel der Plastikbox ein Festgasgemisch, bestehend aus 1% O₂, 5% CO₂ und N₂ als Balance, aus einer Gasflasche (Messer-Griesheim, Duisburg) kontinuierlich in die Box geleitet.

Nach 60 Minuten wurden alle Objektträger mit 4%igem Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (siehe Rezepturen eingesetzter Lösungen) fixiert. Das Plastikgefäß wurde über eine weitere Öffnung im Deckel mit Hilfe eines Injektionssystems mit dem Fixiermittel geflutet, um die Zellen vor einer Reoxygenierung zu fixieren. Nach zehn Minuten wurde die Fixierung der Zellen und des Fluoreszenzindikators abgeschlossen.

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

3.2.5 ROS-Messungen

3.2.5.1 Laserscanning

Zur Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Objektträger mit Hilfe eines „Laser Scan Mikroskops“ (LSM 10, Zeiss, Jena) im nicht-konfokalen Modus analysiert. Die Laserwellenlänge betrug 488 nm. Es wurden das 40er Objektiv und der zweier Zoom benutzt. An jedem Versuchstag wurden zu Beginn der Messungen der Kontrast und die Helligkeit separat für jeden der beiden Fluoreszenzindikatoren neu eingestellt. Dafür wurden alle vier Objektträger kurzzeitig gescannt und geeignete Kontrast- und Helligkeitswerte ermittelt, die sowohl bei Objektträgern mit sehr hoher, als auch mit sehr niedriger Fluoreszenzintensität eine Auswertung ermöglichten. Die Scanzeit betrug 32 Sekunden.

3.2.5.2 Messreihenfolge

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

Die kodierten Objektträger wurden in definierter gleicher Reihenfolge durchgemustert, um alle Näpfe während der Messungen den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen auszusetzen. Da die Redox-sensitiven Fluoreszenzindikatoren H₂R und DCFH-DA bei unterschiedlichen Kontrast- und Helligkeitseinstellungen gemessen werden mussten, wurden die Messungen der Näpfe in der gleichen Reihenfolge erst bei dem einen, dann bei dem anderen Fluoreszenzindikator vorgenommen.

3.2.5.3 Messvorgang

Zunächst wurden die Nöpfe im Transmissionsmodus kurz betrachtet, um geeignete Zellen auszuwählen. Die Wahl fiel auf Zellen, die sich in der Mitte der Nöpfe befanden und nicht übereinander lagen. Die gewählten Zellen wurden fokussiert und in einer Scanzeit von 32 Sekunden eingescannt. Von jedem Napf wurden die Umrisse von zehn Zellen umfahren und deren Fluoreszenzintensität gemessen. Die ermittelten Werte für die Fluoreszenzintensität wurden in Graustufen auf einer Skala von null bis 255 wiedergegeben.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Versuche wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SSPS 9.0 einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Für die Auswertung der Daten einzelner Versuchstage wurden die nicht-parametrischen Tests für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney durchgeführt. Anschließend wurden die dabei erzielten Ergebnisse in den nicht-parametrischen Tests für abhängige Stichproben nach Friedman und zwei abhängige Stichproben nach Wilcoxon auf Signifikanz geprüft. Beobachtete Differenzen wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant eingestuft.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Einfachimmunfluoreszenz

Die T-PC12-Zellen wurden zur Überprüfung des Erfolgs der Thiamphenicol-Behandlung auf das Vorkommen der Cytochrom-Oxidase (Komplex IV) untersucht.

Die T-PC12-Zellen wurden am Vortag wie bereits beschrieben auf „Culture-Slides“ ausgesät. Am Versuchstag wurden sie zunächst mit 4%igem Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer zehn Minuten lang fixiert. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung des Fixiermittels zweimal fünf Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und für eine Stunde mit 200 µl einer Lösung zum Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen inkubiert. Nach Absaugen der Blocklösung wurde auf die T-PC12-Zellen ein Antiserum vom Kaninchen gegen Rinderherz-Cytochrom-c-Oxidase (Prof. Dr. Kadenbach, Philipps-Universität, Marburg) in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen und über einen Zeitraum von mindestens zwölf Stunden inkubiert. Das Antiserum ist gegen das Holenzym gerichtet, reagiert jedoch vorwiegend mit der in Mitochondrien-DNA kodierten Untereinheit II. Nach Abschluss der Inkubation wurden die „Culture Slides“ zweimal im Abstand von fünf Minuten mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (siehe Rezepturen eingesetzter Lösungen) gespült.

Anschließend wurden die Objektträger für eine weitere Stunde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)) gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG [Ziege; Cappel, Aurora, USA]) inkubiert. Die Objektträger wurden hierauf erneut zweimal im Abstand von fünf Minuten mit PBS gewaschen und danach mit gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt.

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Objektträger wurden am Fluoreszenzmikroskop (BX 60, Olympus, Hamburg) ausgewertet. Als Fluoreszenzfilter wurden für FITC ein Erregerfilter mit einer Bandbreite von 470-490 nm und ein Sperrfilter mit einer Bandbreite von 515-550 nm eingesetzt.

3.4 Rezepturen eingesetzter Lösungen

Phosphatpuffer (PP)

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

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

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

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

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

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

22,4 g Natriumchlorid (Merck)

ad 5000 ml

gepuffertes Glycerol

Pufferlösung: 50 ml Natriumhydrogencarbonat (Merck)

mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Merck) auf pH 8,6 einstellen.

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

Fixationslösung

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

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

Einige Tropfen 2 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird. Erkalten lassen, 500 ml 0,2 M PP zugeben. Anschließend den pH auf 7,2-7,4 einstellen, membranfiltrieren (3 µm) und bei 20°C lagern.

Blocklösung

10% Normales Schweineserum (Schlachthof, Gießen)

0,5% Tween 20 (Sigma)

0,1% Bovines Serumalbumin (Sigma)

in 0,005 M PBS lösen.

Lockesche Lösung

Ansatz für 125 ml:

0,34 g Natriumchlorid

0,51 g Hepes (Sigma)

0,44 g Saccharose (Merck)

0,13 g Glucose in 125 ml Aqua dest. lösen und pH auf 7,28 einstellen, danach

0,039 g Calciumchlorid (Merck) zugeben und membranfiltrieren (0,2 µm).

Anschließend bei -20°C lagern.

4 Ergebnisse

4.1 Dihydrorhodamin 123

4.1.1 PC12-Zellen

In 22 Kontrollversuchen wurde bei PC12-Zellen unter Verwendung von H₂R die Fluoreszenzintensität unter Normoxie und Hypoxie verglichen. Es konnte bei allen Messungen ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität, d.h. der ROS-Bildung, unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden (Abb. 8a, 8b, 9 und 10).

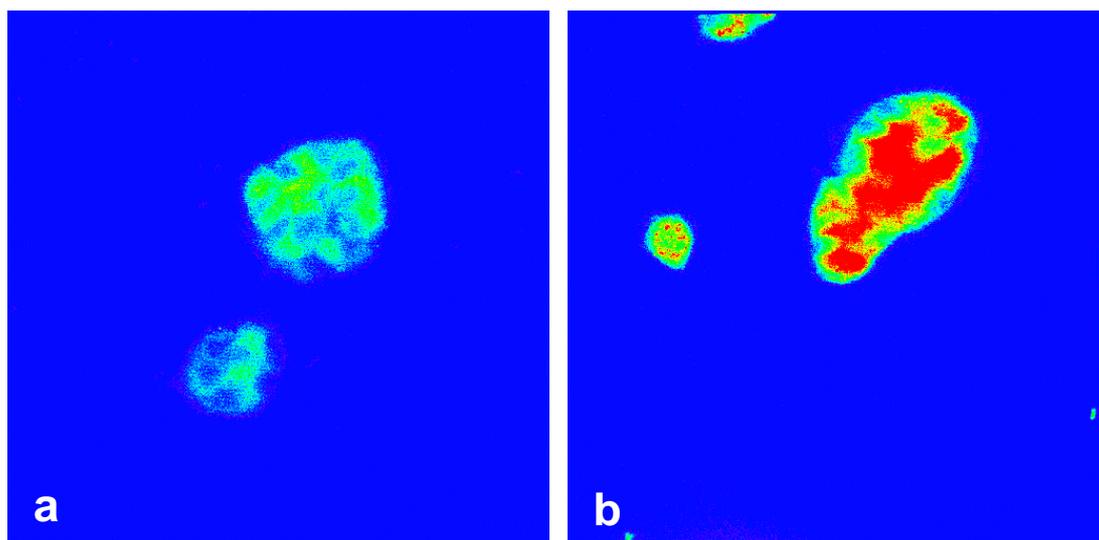


Abb. 8a: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

Abb. 8b: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1% O₂).

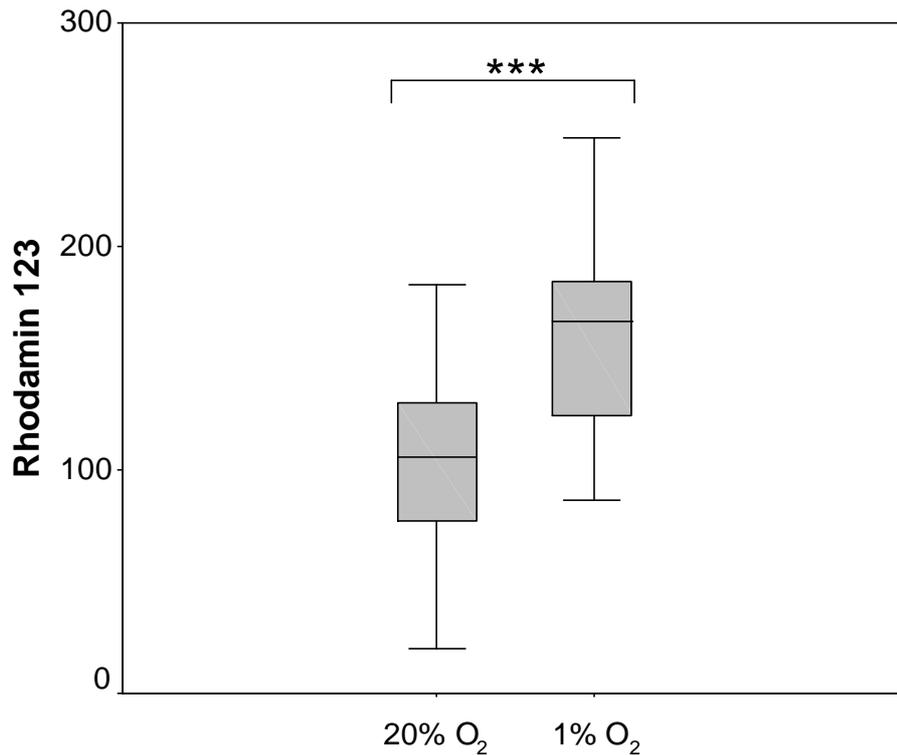


Abb. 9: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz von PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) in 22 Messreihen (***) $p < 0,001$.

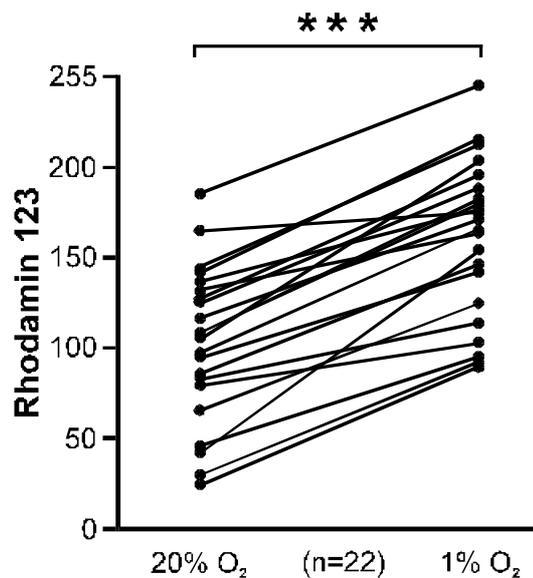


Abb. 10: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%) bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (***) $p < 0,001$.

4.1.2 T-PC12-Zellen

Der Erfolg der Thiamphenicolbehandlung wurde mittels Immunfluoreszenz kontrolliert. Nach Inkubation der T-PC12-Zellen mit Antikörpern gegen die Cytochrom-c-Oxidase, den vierten Komplex der Atmungskette, zeigten T-PC12-Zellen eine stark verminderte Immunreaktion (Abb. 11a und 11b).

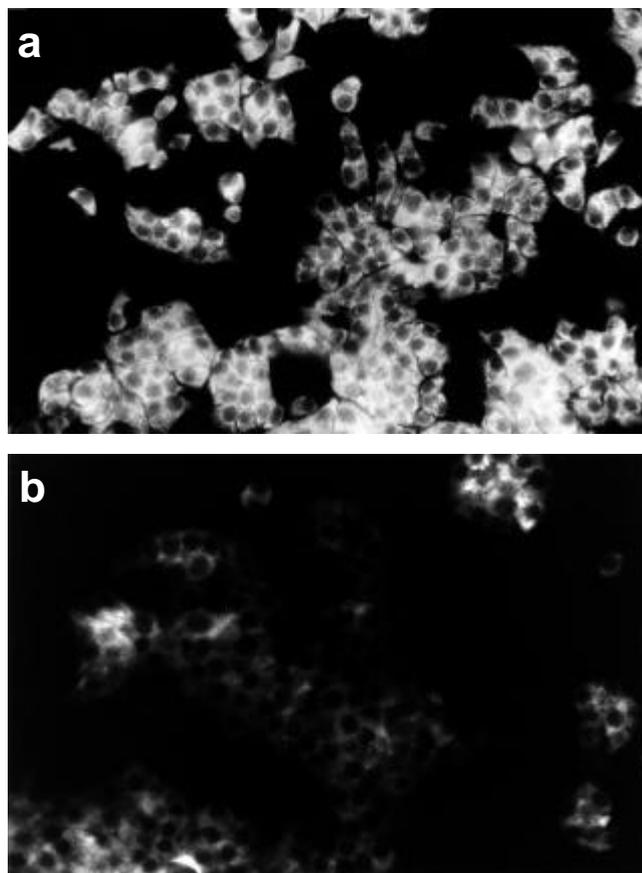


Abb. 11a: PC12-Zellen nach Inkubation mit einem Antikörper gegen die Cytochrom-c-Oxidase.

Abb. 11b: T-PC12-Zellen nach Inkubation mit einem Antikörper gegen die Cytochrom-c-Oxidase.

Bei elf Messungen wiesen T-PC12-Zellen im Gegensatz zu unbehandelten PC12-Zellen eine Abnahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität auf (Abb. 12 und 13).

In allen elf Experimenten verhielten sich T-PC12-Zellen unter normoxischen Bedingungen wie unbehandelte PC12-Zellen (Abb. 12 und 13). Unter Hypoxie war jedoch bei T-PC12-Zellen gegenüber unbehandelten PC12-Zellen ein signifikanter Abfall der ROS-Bildung zu erkennen (Abb. 12 und 13), die Inkubation bei 1% O₂ induzierte in T-PC12-Zellen keine vermehrte ROS-Bildung.

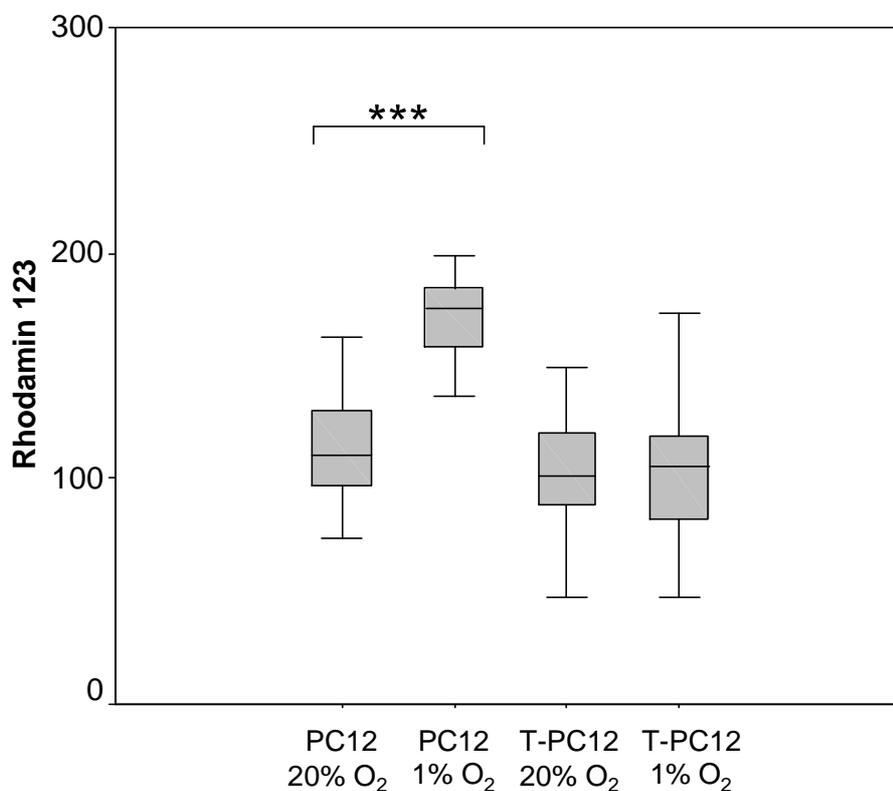


Abb. 12: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und T-PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). Je Bedingung wurden 40 Zellen ausgewertet (***) $p < 0,001$.

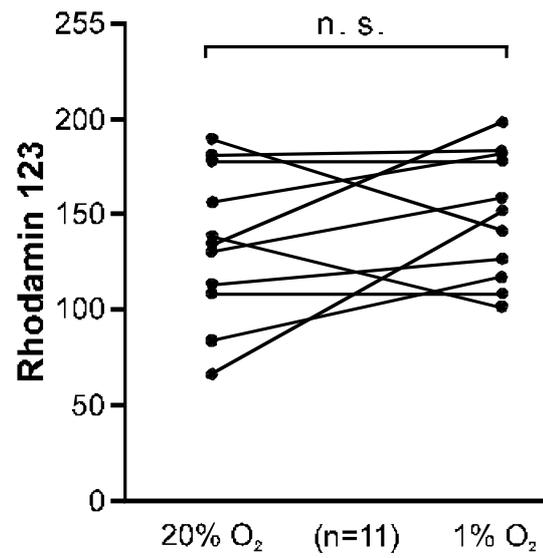


Abb. 13: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei T-PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,05$).

4.1.3 Inkubation von PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren

4.1.3.1 DPI

Der Flavoproteinhemmer DPI wurde bei PC12-Zellen unter normoxischen Bedingungen eingesetzt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen war eine geringe, nicht signifikante Abschwächung der ROS-Bildung feststellbar (Abb. 14, 19a und 19d, Tabelle 4).

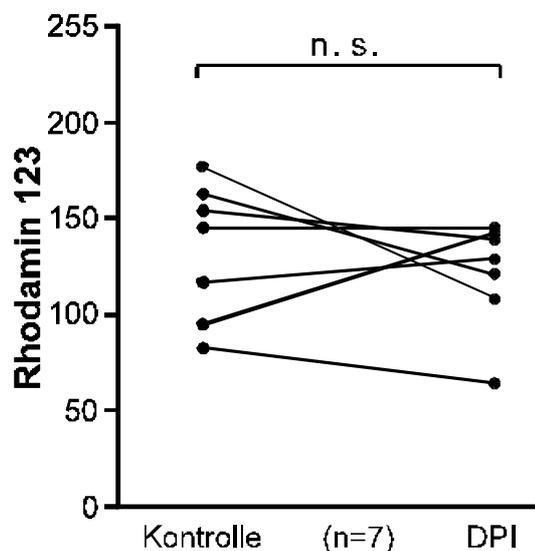


Abb. 14: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und DPI-Inkubation bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (**n.s.** $p > 0,05$).

PC12 20%	PC12 20% + DPI
169	106
151	137
161	118
144	144
81	61
94	140
115	127

Tabelle 4: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und DPI-inkubierten Zellen in sieben Messreihen.

4.1.3.2 Rotenon

Unter Normoxie konnte bei Zugabe des Atmungsketteninhibitors Rotenon (Komplex I) ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 15, 19a und 19c, Tabelle 5).

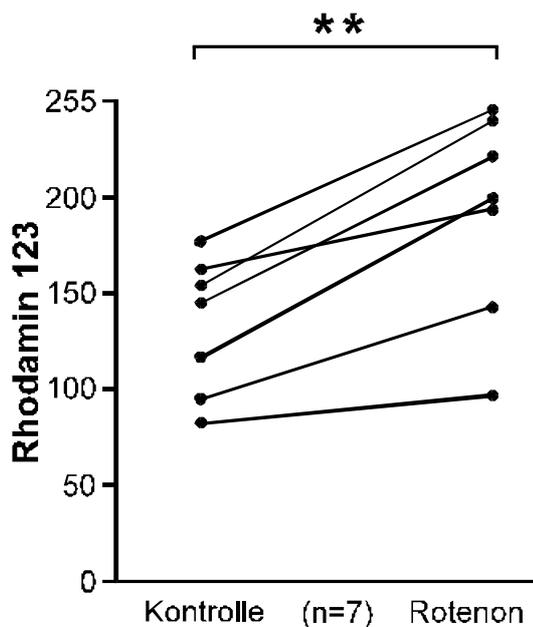


Abb. 15: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Rotenon-Inkubation bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (** $p < 0,05$).

PC12 20%	PC12 20% + Rotenon
169	242
151	236
161	193
144	221
81	96
94	140
115	198

Tabelle 5: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und Rotenon-inkubierten Zellen in sieben Messreihen.

4.1.3.3 Rotenon und DPI

Gegenüber unbehandelten Kontrollzellen konnte unter Normoxie nach gleichzeitiger Inkubation mit Rotenon und DPI kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 16,17,19a und 19e).

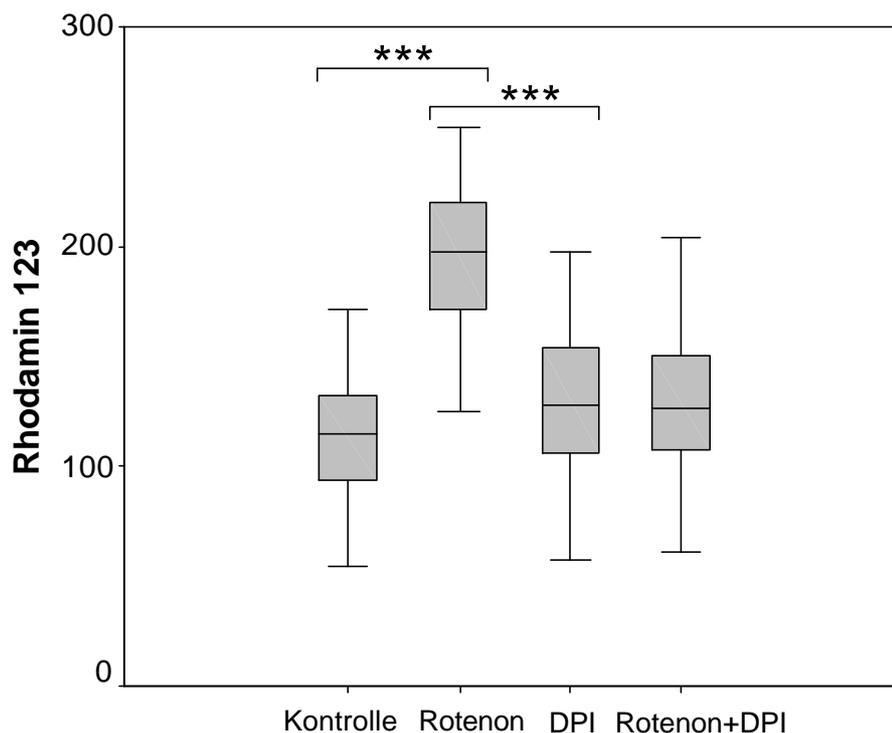


Abb. 16: Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz eines Versuchstages nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei PC12-Kontrollzellen, bei Rotenon-inkubierten, DPI-inkubierten und Rotenon + DPI-inkubierten PC12-Zellen. (***) $p < 0,001$.

Die gleichzeitige Anwendung von Rotenon und DPI führte zu einer nicht-signifikanten Abschwächung der ROS-Bildung gegenüber der Rotenon-Behandlung (Abb. 16 und 18).

Ein Vergleich der Messwerte nach gleichzeitiger Zugabe von Rotenon und DPI mit den Ergebnissen nach DPI-Inkubation zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16, 18, 19d und 19e).

Mit Rotenon inkubierte PC12-Zellen zeigten bei 20% O₂ gegenüber DPI-behandelten PC12-Zellen einen signifikanten Anstieg der ROS-Bildung (Abb. 16, 18, 19c und 19d).

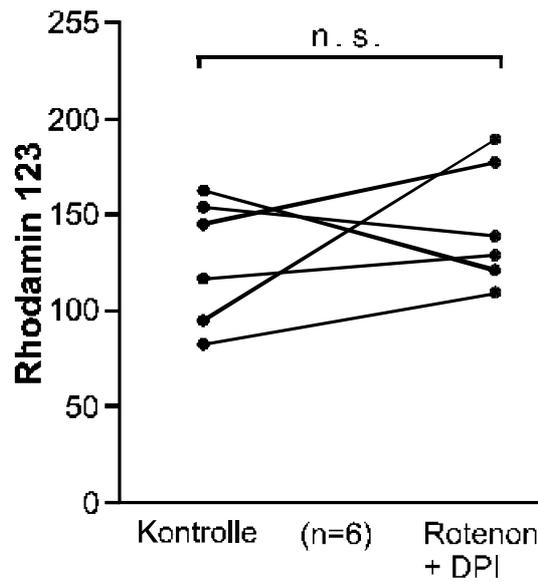


Abb. 17: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Rotenon+DPI-Inkubation bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,05$).

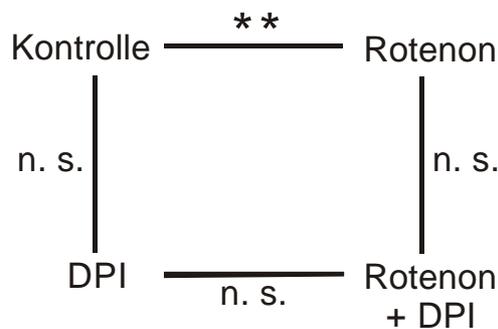


Abb. 18: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei PC12-Kontrollzellen, mit Rotenon-, DPI- und Rotenon+DPI-inkubierten PC12-Zellen (** $p > 0,001$; n. s. $p > 0,05$).

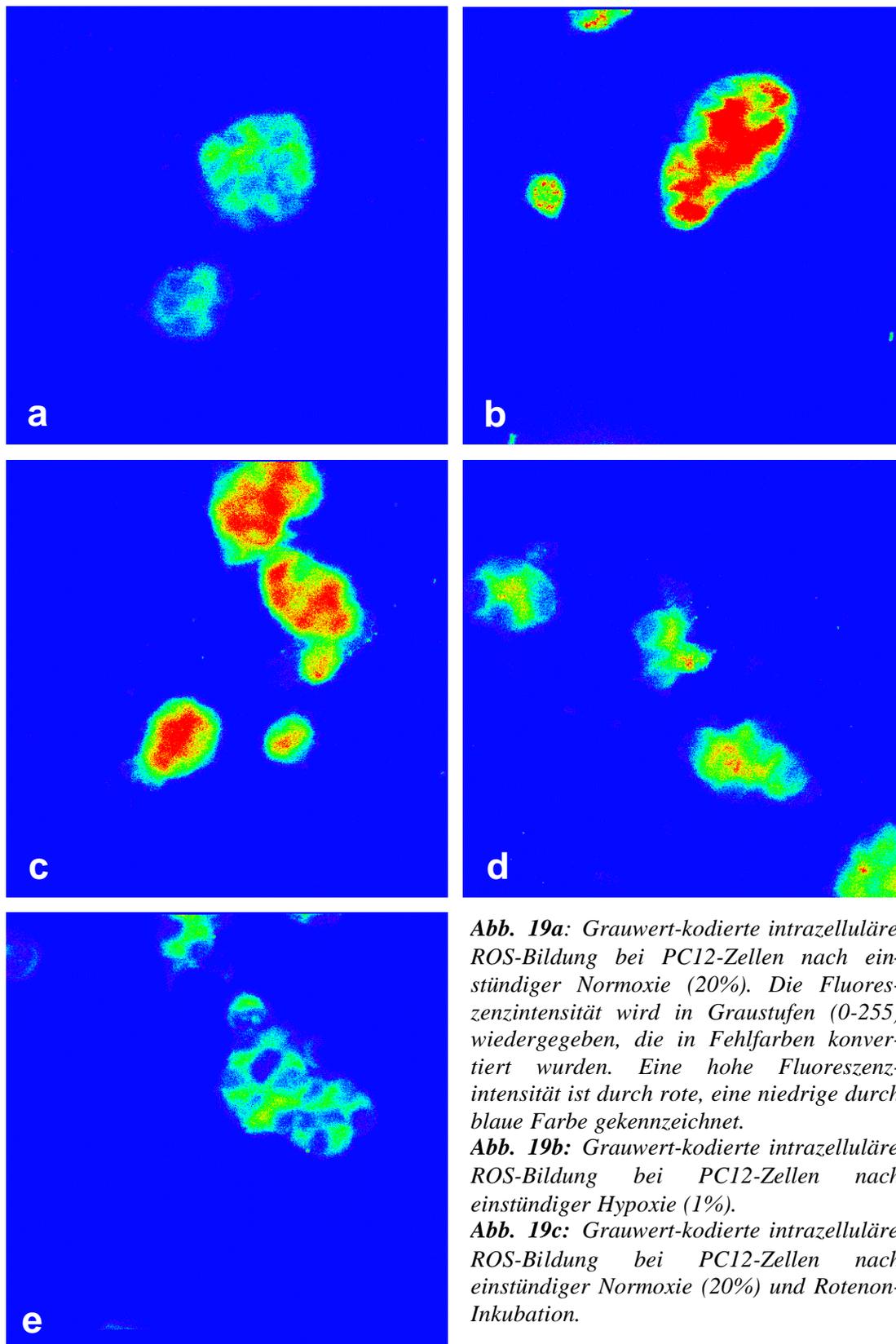


Abb. 19a: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20%). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

Abb. 19b: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1%).

Abb. 19c: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20%) und Rotenon-Inkubation.

Abb. 19d: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20%) und DPI-Inkubation.

Abb. 19e: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20%) und Rotenon+DPI-Inkubation.

4.1.1.5 NaN_3

Auch unter Zugabe von NaN_3 , einem Inhibitor von Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette, kam es bei PC12-Zellen zu einer signifikanten, Hypoxie-bedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 20 und 21).

Die Messergebnisse von NaN_3 -behandelten PC12-Zellen und unbehandelten Kontrollzellen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenso verhielt es sich nach Inkubation unter hypoxischen Konditionen (Abb. 20, 22 und Tabelle 6).

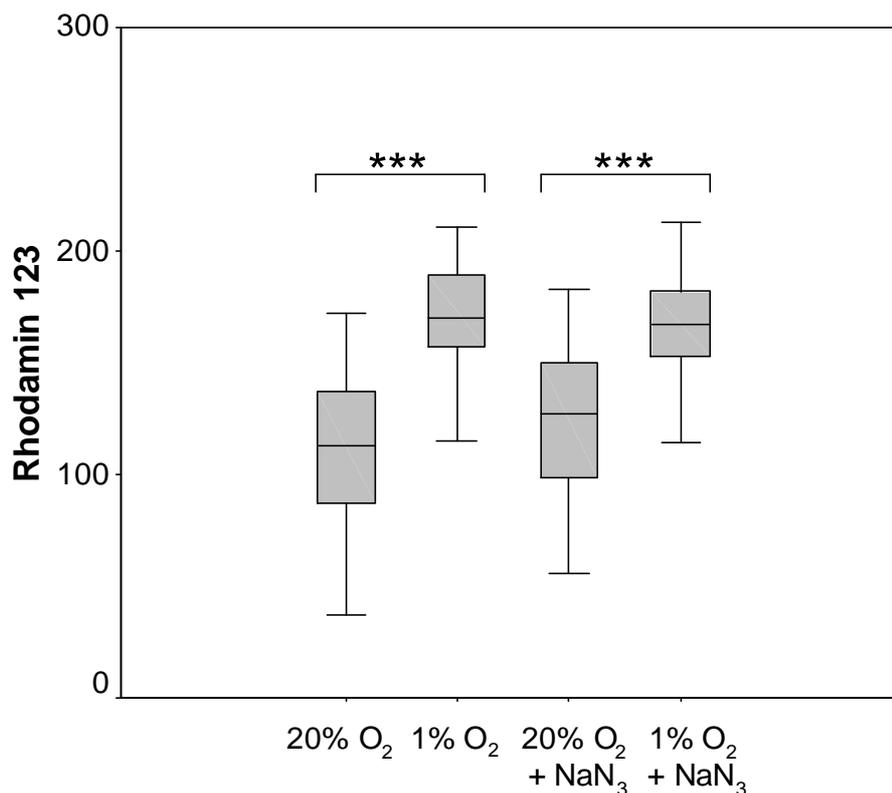


Abb. 20: Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz eines Versuchstages bei Kontrollzellen und NaN_3 -inkubierten PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). Je Bedingung wurden 80 Zellen ausgewertet (***) $p < 0,001$.

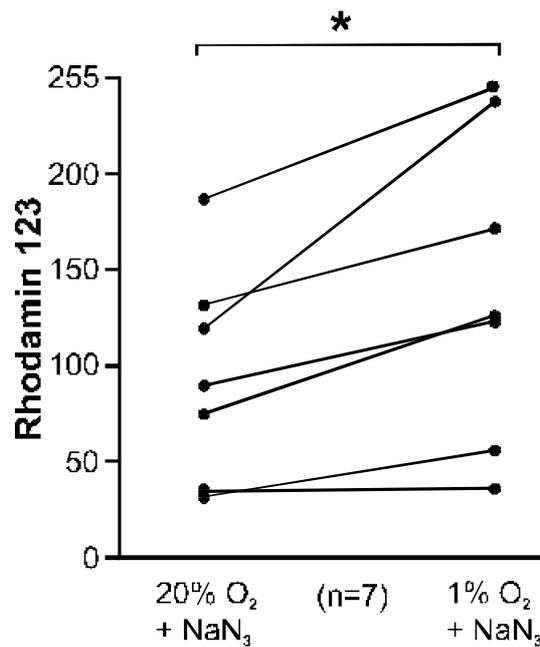


Abb. 21: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) und NaN₃-Inkubation bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (* p < 0,05).

PC12 20%	PC12 1%	PC12 20% +NaN ₃	PC12 1% +NaN ₃
183	249	183	249
130	158	72	125
142	211	117	236
114	169	127	169
105	201	87	122
40	151	31	53
85	144	33	33

Tabelle 6: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und NaN₃-inkubierten PC12-Zellen.

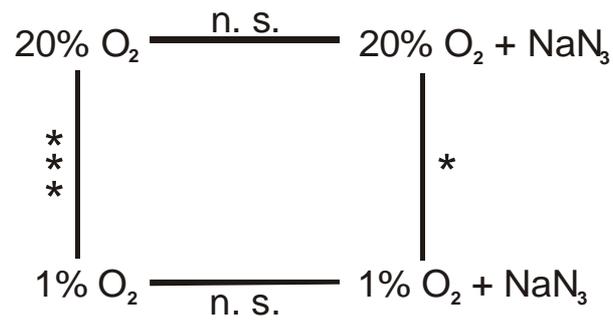


Abb. 22: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und NaN₃-inkubierten PC12-Zellen. (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$; n. s. $p > 0,05$).

4.1.4 Inkubation von T-PC12-Zellen mit Atmungsketteninhibitoren

4.1.4.1 Rotenon

Unter normoxischen Bedingungen führte die Zugabe von Rotenon zu keiner signifikanten Veränderung der ROS-Produktion in T-PC12-Zellen (Abb. 23, 25a und 25b). Im Gegensatz zu den PC12-Kontrollzellen wurde allerdings eine Tendenz zu verminderter ROS-Bildung nach Rotenon-Inkubation beobachtet.

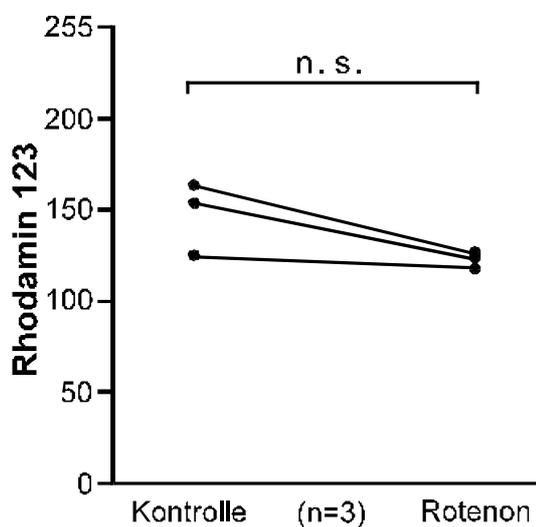


Abb. 23: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O_2 und Rotenon-Inkubation bei T-PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,05$).

4.1.4.2 Rotenon und DPI

Nach gleichzeitiger Zugabe von Rotenon und DPI zu T-PC12-Zellen waren gegenüber T-PC12-Kontrollzellen unter Normoxie keine signifikanten Unterschiede bei der ROS-Bildung feststellbar.

Die Gegenüberstellung der Resultate von T-PC12-Zellen nach Rotenoninkubation und von T-PC12-Zellen nach gleichzeitiger Rotenon- und DPI-Behandlung ließ ebenfalls keinen signifikanten Unterschied erkennen (Abb. 24, 25a-c und Tabelle 7).

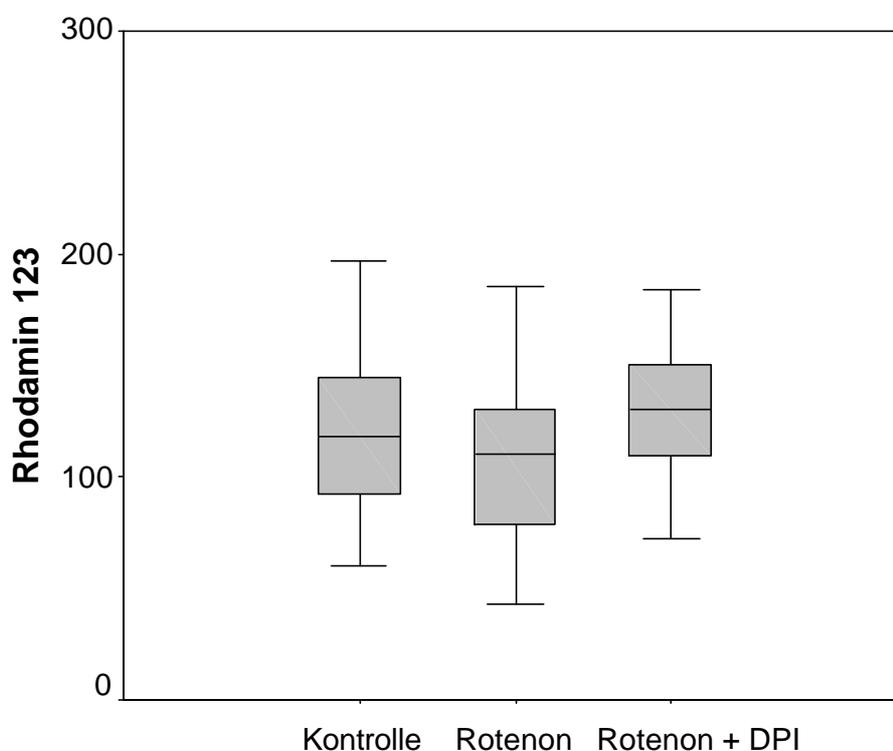
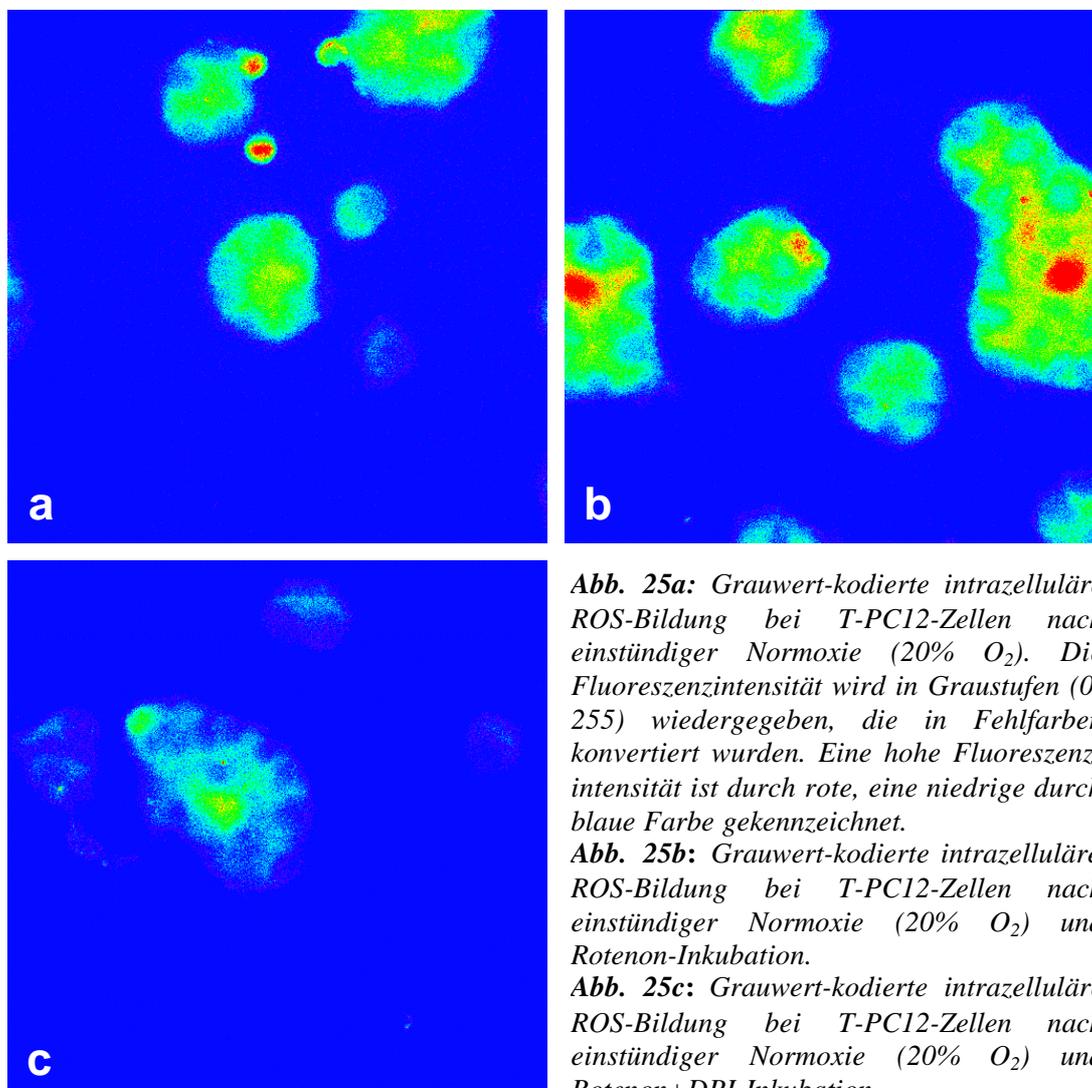


Abb. 24: Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile inkubierten T-PC12-Zellen der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz eines Versuchstages nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei T-PC12-Kontrollzellen, Rotenon-inkubierten, und Rotenon + DPI-inkubierten T-PC12-Zellen.

T-PC12 20%	T-PC12 20% + Rotenon	T-PC12 20% + Rotenon +DPI
150	116	116
119	111	131
157	117	157

Tabelle 7: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) bei T-PC12-Kontrollzellen, Rotenon-inkubierten und Rotenon + DPI-inkubierten T-PC12-Zellen.



4.1.4.3 NaN_3

Nach Zugabe von NaN_3 zu T-PC12-Zellen konnte keine signifikante Änderung der ROS-Bildung bei 1% O_2 gegenüber 20% O_2 festgestellt werden (Abb. 26, 27 und 28).

Mit NaN_3 -behandelte T-PC12-Zellen zeigten gegenüber T-PC12 Kontrollzellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie keine signifikanten Unterschiede (Abb. 27, 28 und Tabelle 8).

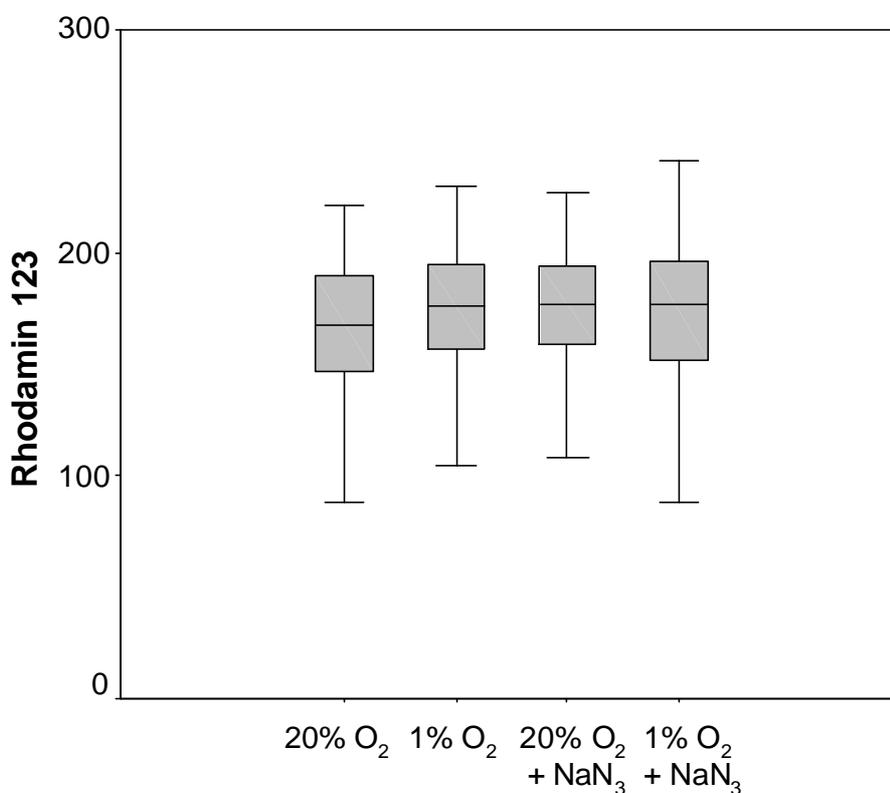


Abb. 26: Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz eines Versuchstages bei T-PC12-Kontrollzellen und NaN_3 -inkubierten T-PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O_2) und Hypoxie (1% O_2). Je Bedingung wurden 80 Zellen ausgewertet.

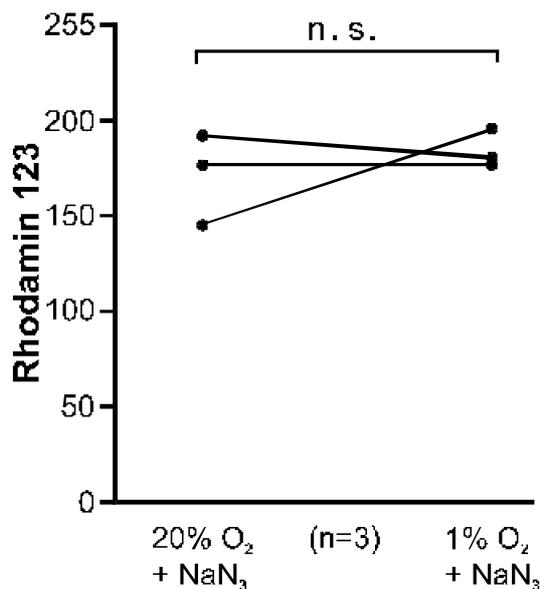


Abb. 27: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%) und NaN₃-Inkubation bei T-PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,05$).

T-PC12 20%	T-PC12 1%	T-PC12 20% + NaN ₃	T-PC12 1% + NaN ₃
130	198	145	198
179	179	196	179
175	175	175	175

Tabelle 8: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei T-PC12-Kontrollzellen und NaN₃-inkubierten T-PC12-Zellen.

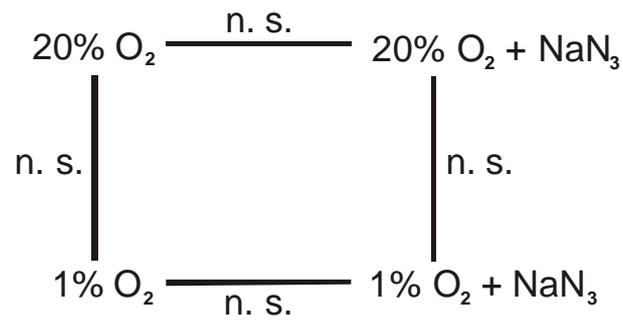


Abb. 28: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei T-PC12-Kontrollzellen und NaN₃-inkubierten T-PC12-Zellen (n. s. $p > 0,05$).

4.1.3 Inkubation von PC12-Zellen mit dem Anionenkanalblocker DIDS

Die Auswertung der Meßergebnisse, die nach Inkubation von PC12-Zellen mit dem Anionenkanalblocker DIDS gewonnen wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie (Abb. 29 und 30).

Nur in einem einzelnen Experiment wurde unter Hypoxie eine höhere Fluoreszenzintensität gemessen als unter Normoxie. In den übrigen Versuchen wurden bei 20% O₂ höhere Fluoreszenzwerte ermittelt als bei 1% O₂ und einmal der gleiche Wert für Normoxie und Hypoxie (Abb. 29 und Tabelle 9).

Mit DIDS behandelte PC12-Zellen zeigten unter Normoxie gegenüber unbehandelten Kontrollzellen einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Unter Hypoxie war zwischen den beiden Zellgruppen jedoch keine unterschiedliche ROS-Bildung zu erkennen (Abb. 30, 31a-d und Tabelle 9).

PC12 20%	PC12 1%	PC12 20% + DIDS	PC12 1% + DIDS
96	163	163	163
77	101	255	189
140	214	245	214
44	92	252	179
92	139	241	204
129	194	114	165

Tabelle 9: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und DIDS-inkubierten PC12-Zellen.

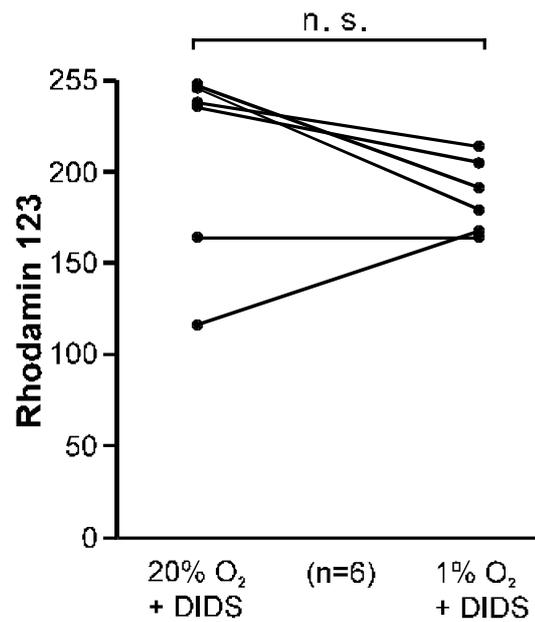


Abb. 29: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%) und DIDS-Inkubation bei PC12-Zellen. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,05$).

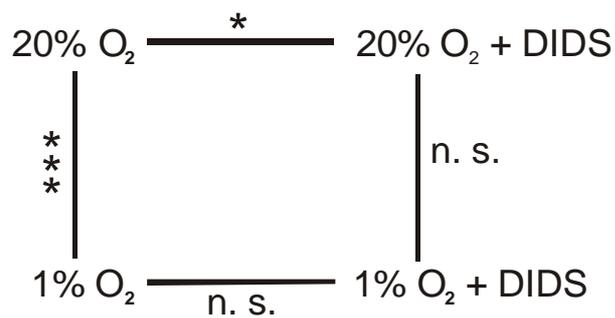


Abb. 30: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären DCF-Fluoreszenz bei PC12-Kontrollzellen und DIDS-inkubierten PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). (** $p > 0,001$; * $p < 0,05$; n. s. $p > 0,05$).

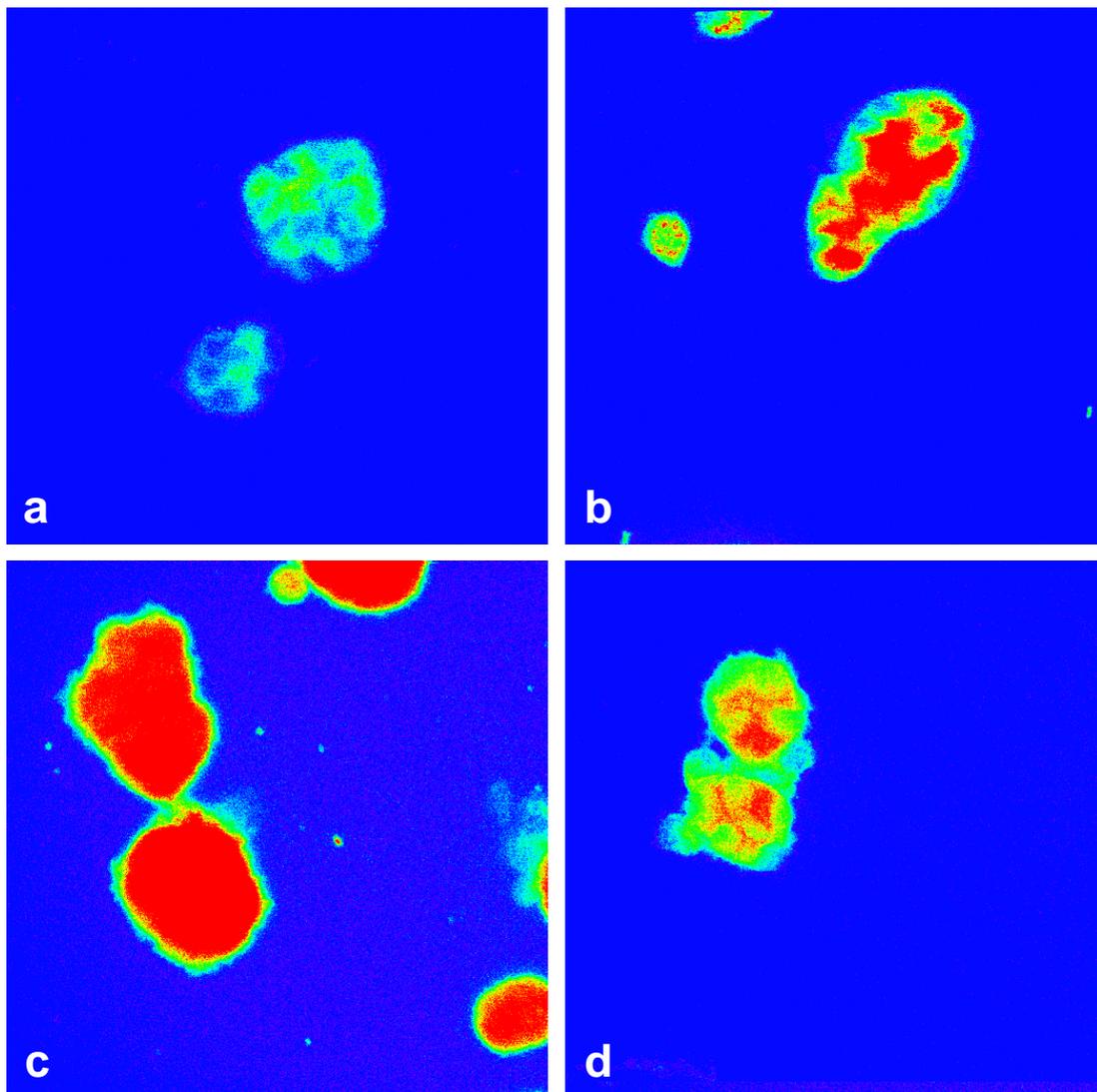


Abb. 31a: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität (0-255) wird in Graustufen wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

Abb. 31b: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1% O₂).

Abb. 31c: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und DIDS-Inkubation.

Abb. 31d: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1% O₂) und DIDS-Inkubation.

4.2 2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat (DCFH-DA)

4.2.1 PC12-Zellen

Bei PC12-Zellen wurde unter Anwendung von DCFH-DA die Fluoreszenzintensität unter Normoxie und Hypoxie verglichen. In elf Messungen konnte, ebenso wie bei H₂R, unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 32a, 32b, 33 und 34).

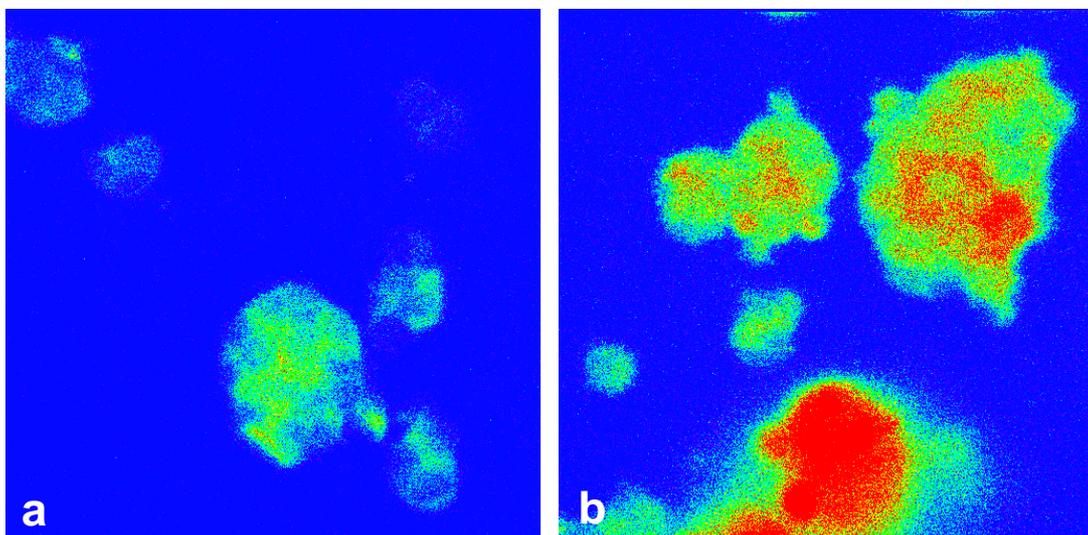


Abb. 32a: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

Abb. 32b: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1% O₂).

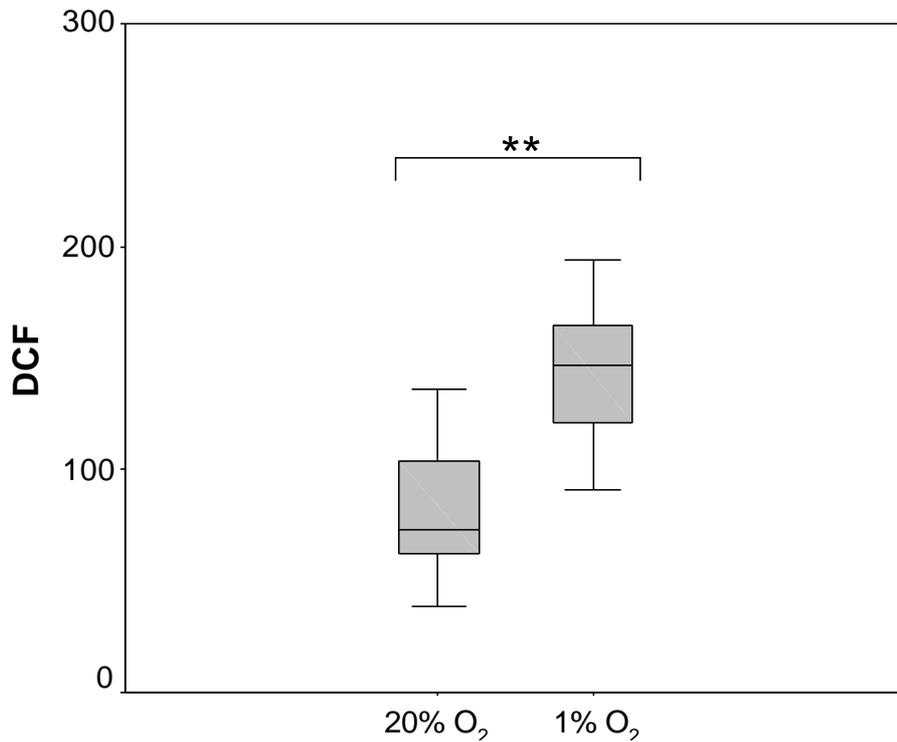


Abb. 33: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) in 22 Messreihen (** $p > 0,001$).

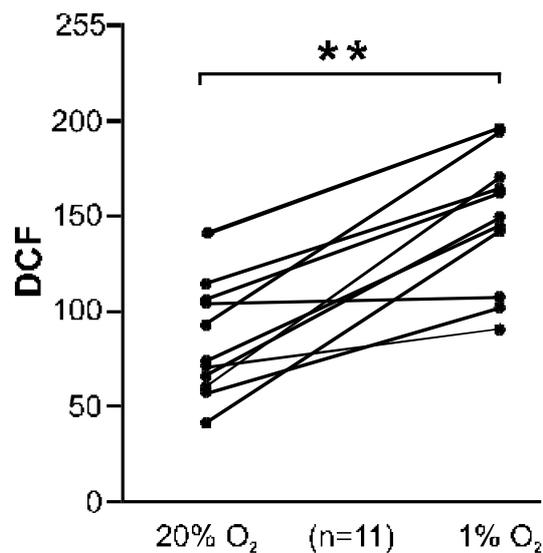


Abb. 34: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%). Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (** $p > 0,001$).

4.2.2 T-PC12-Zellen

An T-PC12-Zellen konnte unter Einsatz von DCFH-DA in sechs Testreihen kein signifikanter hypoxiebedingter Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden (Abb. 35, 36, und Tabelle 10).

Während in drei Versuchen unter hypoxischen Bedingungen die ROS-Bildung niedriger war als unter Normoxie, wurden bei zwei Messungen unter Hypoxie höhere Meßwerte ermittelt. In einer Versuchsreihe wurde sowohl für 20% O₂ als auch für 1% O₂ das gleiche Ergebnis festgehalten (Abb. 35).

Die unter normoxischer Bedingungen gewonnenen Messergebnisse von T-PC12-Zellen und unbehandelten PC12-Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Gegenüberstellung der bei 1% O₂ erzielten Messwerte beider Gruppen führte zu dem gleichen Resultat (Abb. 36).

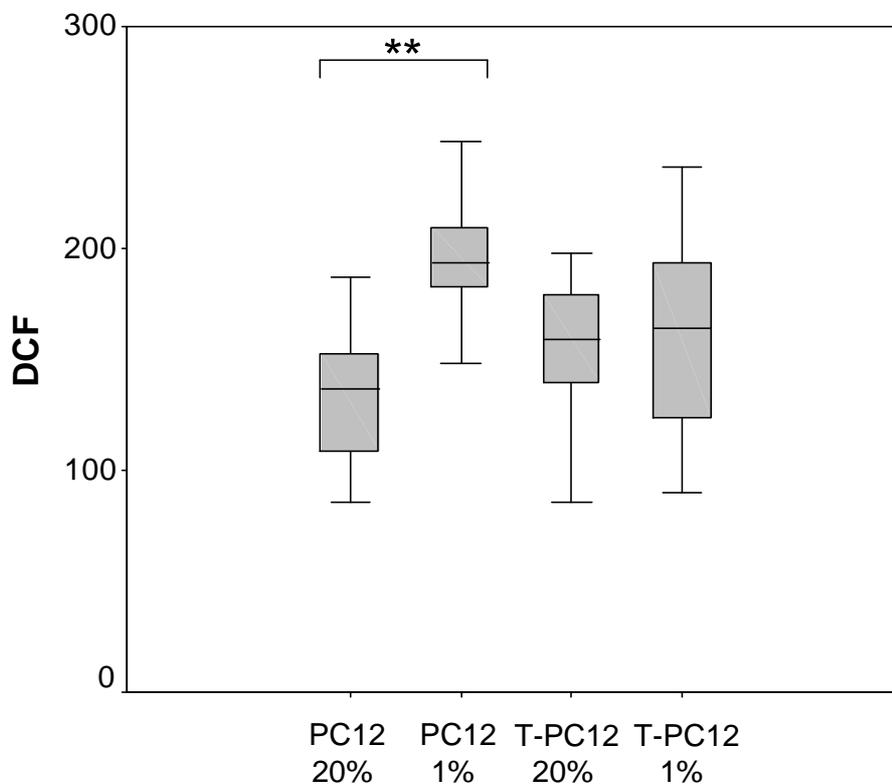


Abb. 35: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz eines Versuchstages bei PC12-Kontrollzellen und T-PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). Je Bedingung wurden 40 Zellen ausgewertet (** $p > 0,001$).

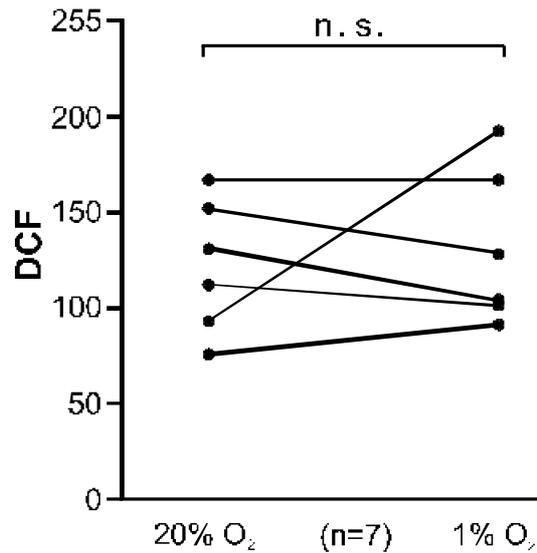


Abb. 36: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz bei T-PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%). Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (n. s. $p > 0,001$).

PC12 20%	PC12 1%	T-PC12 20%	T-PC12 1%
112	163	112	101
92	192	92	192
104	160	151	126
72	91	72	91
103	103	129	103
136	194	162	162

Tabelle 10: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und T-PC12-Zellen.

4.2.3 Inkubation von PC12 Zellen mit dem Anionenkanalblocker DIDS

PC12-Zellen wurden ebenfalls unter Verwendung von DCFH-DA mit DIDS inkubiert. Beim Vergleich der gewonnenen Messergebnisse aus normoxischen und hypoxischen Bedingungen fiel keine signifikante Differenz auf (Abb. 37 und 38).

Unter Normoxie zeigte sich bei den mit DIDS inkubierten PC12-Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen eine signifikante Zunahme der Radikalbildung, unter Hypoxie hingegen konnte kein signifikanter Unterschied bei der ROS-Produktion festgestellt werden (Abb. 38, 39a-d und Tabelle 11).

PC12 20%	PC12 1%	PC12 20% +DIDS	PC12 1% + DIDS
60	101	81	101
39	139	99	151
65	147	156	118
73	141	155	96
61	167	137	174

Tabelle 11: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) bei PC12-Kontrollzellen und DIDS-inkubierten PC12-Zellen.

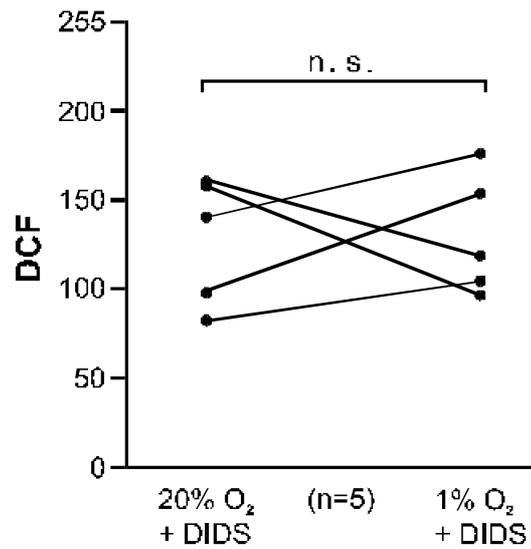


Abb. 37: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1%) und DIDS-Inkubation. Die Punkte geben die ermittelten Medianwerte eines Versuchstages wieder (*n. s.* $p > 0,001$).

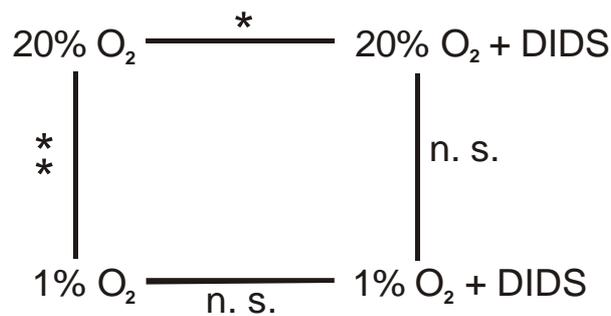


Abb. 38: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären DCF-Fluoreszenz bei PC12-Kontrollzellen und DIDS-inkubierten PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂). (** $p > 0,001$; * $p < 0,05$; *n. s.* $p > 0,05$).

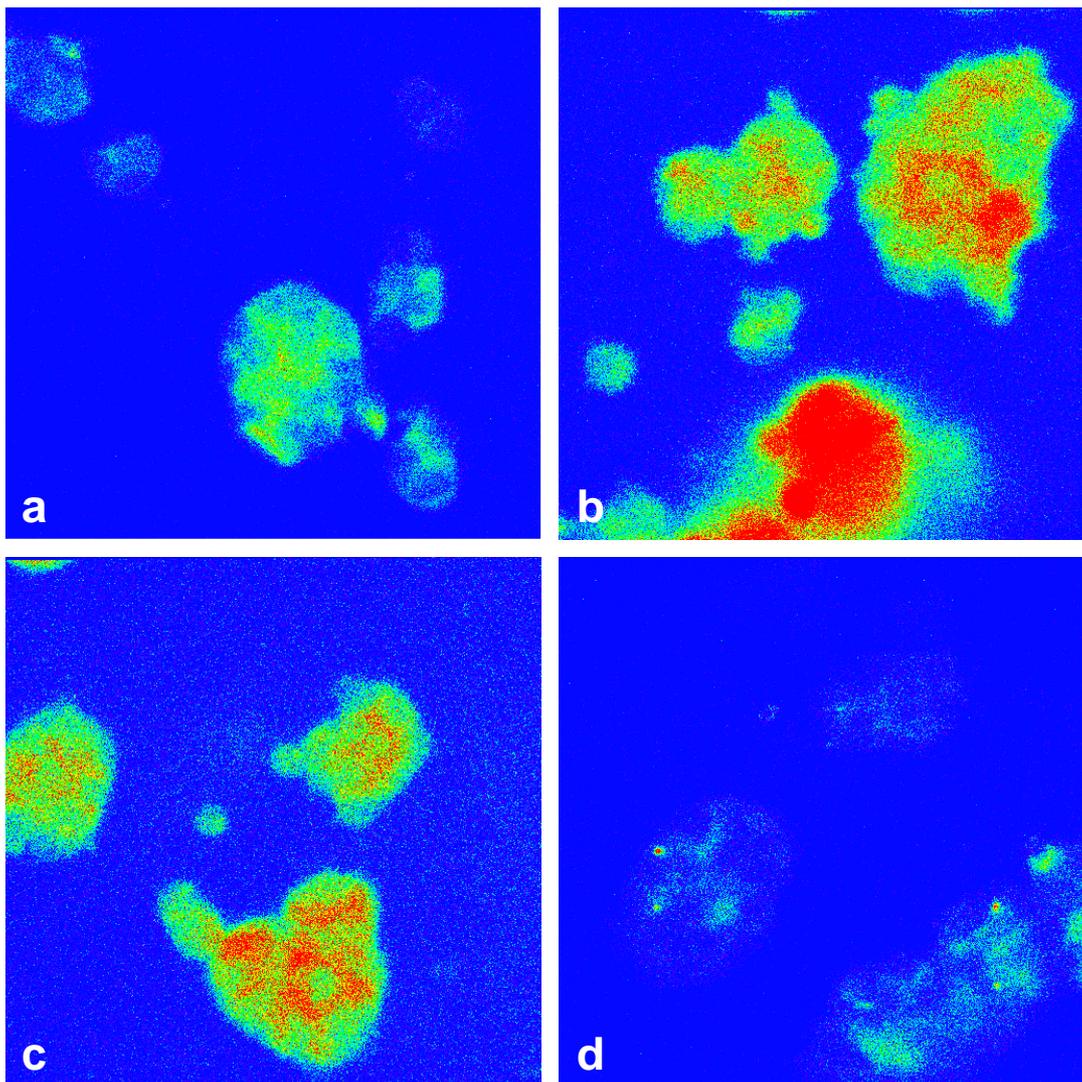


Abb. 39a: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach ein-stündiger Normoxie (20% O₂). Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen (0-255) wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

Abb. 39b: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach ein-stündiger Hypoxie (1% O₂).

Abb. 39c: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach ein-stündiger Normoxie (20% O₂) und DIDS-Inkubation.

Abb. 39d: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei PC12-Zellen nach ein-stündiger Hypoxie (1% O₂) und DIDS-Inkubation.

5 Diskussion

5.1 Vergleich der intrazellulären Fluoreszenzindikatoren H₂R und DCFH-DA

Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien ergaben, dass die farblosen Fluoreszenzindikatoren H₂R und DCFH-DA durch intrazellulär gebildete ROS, insbesondere durch H₂O₂, in ihre fluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 und 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert werden (Cathcart et al., 1983; Rothe et al., 1988; Emmendorffer et al., 1990; Henderson und Chappell, 1993; Royall und Ischiropoulos, 1993; Crow, 1997; Hockberger et al., 1999). Anhand der Rhodamin 123- bzw. DCF-Fluoreszenzintensität kann die H₂O₂-Produktion in Zellen am LSM gemessen werden (Royall und Ischiropoulos, 1993; Chandel und Schumacker, 2000).

Um festzustellen, ob sich DCFH-DA bei PC12-Zellen als ebensoguter intrazellulärer Fluoreszenzindikator erweist, wie es Höhler et al. (1999) von H₂R bei PC12-Zellen berichteten, wurden PC12-Zellen und T-PC12-Zellen mit beiden Fluoreszenzindikatoren inkubiert. Mit beiden Substanzen konnte in allen Versuchen an PC12-Zellen und T-PC12-Zellen eine vergleichbare Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Es fiel jedoch auf, dass sich die H₂R-Fluoreszenz vor allem auf den perinukleären Bereich konzentrierte, während sich die DCF-Fluoreszenz diffus in der ganzen Zelle verteilte. Diese besondere Verteilung der Rhodamin 123-Fluoreszenz ist wohl darauf zurückzuführen, dass die intrazelluläre Oxidation des farblosen, ungeladenen H₂R zum fluoreszierenden Rhodamin 123 (Royall und Ischiropoulos, 1993) in Kernnähe stattzufinden scheint. Ehleben und Mitarbeiter (1997) beobachteten bei ihren Untersuchungen an H₂R-inkubierten HepG2-Zellen ebenfalls dieses besondere Verteilungsmuster der Rhodamin 123-Fluoreszenz. Es gelang ihnen sogar, die Rhodamin 123-Fluoreszenz in einer 3D-Rekonstruktion als perinukleäre Wolken in den Zellen darzustellen. Im Gegensatz zu Rhodamin 123 scheint sich DCF in der ganzen Zelle und geringgradig auch extrazellulär (Royall und Ischiropoulos, 1993) zu verteilen, was die auffällig diffuse Fluoreszenzverteilung nach DCFH-DA-Inkubation erklärt. DCFH-DA wird von intrazellulären Esterasen zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) deazetyliert (Rothe und Valet, 1988; Royall und Ischiropoulos, 1993) und anschließend durch H₂O₂ zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert.

Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der beiden Fluoreszenzindikatoren hatten jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Fluoreszenzmessungen. Ein Vergleich der

Messergebnisse beider Substanzen ergab, dass sich H₂R und DCFH-DA gleich gut für den Nachweis von intrazellulär gebildeten ROS bei PC12-Zellen eignen.

5.2 Abgrenzung mitochondrialer von nicht-mitochondrialer ROS-Produktion unter Hypoxie

5.2.1 PC12-Zellen

In allen Experimenten wurde bei PC12-Zellen mit den beiden intrazellulären Fluoreszenzindikatoren H₂R und DCFH-DA eine signifikant erhöhte ROS-Bildung unter Hypoxie gegenüber Normoxie gemessen. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von Höhler et al. (1999; 2000), in denen sowohl die gleiche Zelllinie als auch die beiden genannten Fluoreszenzindikatoren verwendet wurden. Bei den Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Duranteau (1998) und Vanden Hoek (1998) an Kardiomyozyten mit DCFH-DA als Fluoreszenzindikator wurde ebenfalls eine Hypoxie-bedingte gesteigerte ROS-Bildung nachgewiesen. Das gleiche Resultat ergaben Studien von Chandel und Mitarbeitern (1998; 2000b) an Hep3B-Zellen.

Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) hingegen stellten bei ihren Experimenten an PC12-Zellen eine verminderte ROS-Bildung unter Hypoxie fest. Hierbei wurden die Zellen jedoch erst nach Beendigung der Hypoxie-Inkubation für weitere fünf Minuten mit dem Fluoreszenzindikator DCFH-DA inkubiert und dann ausgewertet. Ähnlich verhielt es sich bei den Hypoxie-Reoxygenierungsversuchen von Zulueta et al. (1995) an pulmonalen Endothelzellen, bei denen die ROS-Produktion unter hypoxischen bzw. anoxischen Bedingungen geringer ausfiel als unter Normoxie. Allerdings wurden die ROS-Messungen hierbei erst 120 Minuten nach der Reoxygenierung vorgenommen, um die Zellvitalität zu erhalten. Wie bei Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) lässt sich dieser hypoxiebedingte ROS-Abfall vermutlich darauf zurückführen, dass die ROS-Messungen erst einige Zeit nach den Hypoxie-Inkubationen stattfanden. Während in dieser Studie die PC12-Zellen noch im hypoxischen Zustand fixiert und anschließend ausgewertet wurden, könnte ein Hypoxie-bedingter ROS-Anstieg aufgrund der Reoxygenierung vor den ROS-Messungen bei Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) und Zulueta et al. (1995) wieder abgenommen haben. Außerdem wurde bei dem Messverfahren von

Zulueta und Mitarbeitern (1995) nur extrazellulär gebildetes H_2O_2 erfasst, wohingegen H_2R und DCFH-DA intrazellulär produziertes H_2O_2 nachweisen.

5.2.2 T-PC12-Zellen

Neben zytosolischen Enzymsystemen stellen auch die Mitochondrien einen potentiellen Entstehungsort für ROS dar (Zulueta et al., 1995; Kummer und Acker, 1997; Vanden Hoek et al., 1998; Chandel et al., 1998; Chandel und Schumacker, 2000). Um festzustellen, ob die Mitochondrien für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg bei PC12-Zellen verantwortlich sind, wurden Tests an T-PC12-Zellen durchgeführt.

Mit Ausnahme von Komplex II werden die Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette nicht nur vom Kerngenom kodiert. 13 Proteinuntereinheiten dieser Enzymsysteme werden von mitochondrialer DNA kodiert und an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert (Morgan-Hughes et al., 1988; Gibb et al., 1990). Das Antibiotikum Chloramphenicol und sein Analogon Thiamphenicol (Kroon et al., 1976) sind in der Lage, speziell diese mitochondriale Proteinbiosynthese zu inhibieren (Kuzela und Luciakova, 1983; Kuzela et al., 1988). Eine Studie von Weiss und Mitarbeitern (1991b) an *Neurospora crassa* ergab nach Chloramphenicol-Inkubation, dass ihre Wirkung auf einer Hemmung der Translation mitochondrial kodierter Enzymuntereinheiten beruht. Spektroskopische Untersuchungen von Wang et al. (1991) an *Neurospora crassa* zeigten außerdem, dass nach Chloramphenicol-Behandlung eine kleinere Komplex I-Form gebildet wird. Dieses Enzym besitzt keine mitochondrial kodierten Untereinheiten mehr, zu denen auch der N-2 Eisen-Schwefel-Cluster und die Ubiquinon-Bindungsstelle zählen (Tuschen et al., 1990; Wang et al., 1991).

Bei T-PC12-Zellen war daher ebenfalls das Fehlen mitochondrial kodierter Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe zu erwarten, die einen Elektronentransport durch die Atmungskette unmöglich machen. Um den Erfolg der Thiamphenicol-Behandlung abzusichern, wurden die T-PC12-Zellen vor Versuchsbeginn im Rahmen einer Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen die Cytochrom-c-Oxidase kontrolliert. Die T-PC12-Zellen wiesen eine stark herabgesetzte Immunreaktion gegenüber der Cytochrom-c-Oxidase auf, was auf einen Verlust der Multienzymkomplexe der Atmungskette zurückzuführen ist.

Bei T-PC12-Zellen induzierte die Inkubation unter Hypoxie im Gegensatz zu unbehandelten PC12-Zellen keine vermehrte ROS-Produktion. Mit keinem der beiden Fluoreszenzindikatoren konnte eine signifikante, hypoxiebedingte erhöhte Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Das Gleiche ergaben Untersuchungen von Chandel et al. (1998; 2000a) an Hep3B-Zellen, die zuvor mit Ethidiumbromid behandelt worden waren. Ethidiumbromid-inkubierte Hep3B Zellen (p^0 Zellen) besitzen keine mitochondriale DNA mehr (King und Attardi, 1989). Durch den Verlust von Schlüsselkomponenten der Elektronentransportkette findet in p^0 Zellen kein mitochondrialer Elektronentransport statt (Chandel et al., 1998), bei T-PC12-Zellen verhält es sich genauso. Dies kommt bei beiden Zelltypen in einer verminderten ROS-produktion unter Hypoxie gegenüber unbehandelten Kontrollen zum Ausdruck.

Die Hypoxie-Versuche an T-PC12-Zellen haben deutlich ergeben, dass die unter Hypoxie gebildeten ROS bei PC12-Zellen aus den Mitochondrien stammen und extra-mitochondriale Enzymsysteme als Quelle des Hypoxie-induzierten ROS-Anstiegs ausscheiden. Die Studien von Duranteau et al. (1998) an Kardiomyozyten und von Chandel et al. (1998) an Hep3B Zellen identifizierten ebenfalls die Mitochondrien als Ort der Hypoxie-bedingten ROS-Zunahme.

5.3 ROS-Produktion einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette

1971 zeigte Loschen das erste Mal, dass ROS von der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Obwohl nur 1-2% der Elektronen den physiologischen Transferweg der Atmungskette verlassen, produzieren die Mitochondrien aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität beachtliche Mengen an O_2^- (Cross und Jones, 1990). Während des Elektronentransfers durch die mitochondriale Atmungskette können ROS an allen vier Multienzymkomplexen entstehen. Anhand der oben genannten Hypoxie-Versuche konnten die Mitochondrien zwar als die ROS-Produzenten in PC12-Zellen ermittelt werden, allerdings ohne einen Hinweis darauf zu geben, welcher Atmungskettenkomplex genau für die Hypoxie-bedingte ROS-Produktion verantwortlich ist. Um dies herauszufinden, wurden PC12-Zellen und T-PC12-Zellen mit den Atmungsketteninhibitoren DPI, Rotenon und NaN_3 inkubiert.

5.3.1 Die Rolle der Komplexe III und IV bei der ROS-Produktion

Die Cytochrom-c-Reduktase katalysiert die Elektronenübertragung vom Ubiquinol auf das Cytochrom c, gleichzeitig werden Protonen von der negativ geladenen Matrix- auf die positiv geladene Cytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt (Hatefi, 1985; Trumpower, 1990). Die Cytochrom-c-Oxidase transferiert anschließend vier Elektronen vom reduzierten Cytochrom c auf molekularen O_2 , während sie außerdem acht Protonen von der Matrix- auf die Cytosolseite der inneren Mitochondrienmembran pumpt (Chan und Li, 1990).

Verschiedene Autoren vertreten die Theorie, dass unter hypoxischen Bedingungen die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase gehemmt wird (Budinger et al., 1996; Chandel und Schumacker, 1996; Duranteau et al., 1998; Semenza, 1999). Duranteau und Mitarbeiter (1998) haben zudem gezeigt, dass diese Hypoxie-bedingte Wirkung auf Komplex IV bei Kardiomyozyten unter Normoxie mit NaN_3 imitierbar ist. NaN_3 ist ein nicht-kompetitiver Hemmstoff der Cytochrom-c-Oxidase (Petersen, 1977) mit konzentrationsabhängiger Wirkung. Hohe NaN_3 -Konzentrationen (5-10 mM) inhibieren den Komplex IV vollständig und führen zu einer gedrosselten mitochondrialen Respiration. Niedrigere NaN_3 -Konzentrationen (<2 mM) verringern die V_{max} der Cytochrom-c-Oxidase ohne jedoch die basale, mitochondriale Respiration zu behindern. In niedriger NaN_3 -Konzentration kommt es daher nur zu einer partiellen Enzyminhibition, die unter Normoxie dem Effekt von Hypoxie auf die Cytochrom-c-Oxidase gleichkommt (Budinger et al., 1998; Duranteau et al., 1998). Eine Verminderung von V_{max} hervorgerufen durch Hypoxie oder NaN_3 , soll eine Erhöhung des Reduktionsstatus mitochondrialer Elektronencarrier zur Folge haben, die vor Komplex IV lokalisiert sind (Chandel et al., 1997). Es kommt folglich zu einer gesteigerten Bildung von Ubisemiquinon an Komplex III, was wiederum mit einer erhöhten ROS-Produktion einhergeht (Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Duranteau (1998) bekräftigten diese Theorie. Sowohl unter Hypoxie als auch unter NaN_3 -Inkubation konnte bei Kardiomyozyten ein ROS-Anstieg, gemessen mittels DCF-Fluoreszenz, beobachtet werden.

Bei NaN_3 -inkubierten PC12-Zellen kam es, wie bei unbehandelten Kontrollzellen, zu einer Hypoxie-bedingten Steigerung der ROS-Produktion. Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten (Duranteau et al., 1998) war unter Normoxie jedoch kein NaN_3 -

induzierter ROS-Anstieg festzustellen. Auch nach NaN_3 -Inkubation von T-PC12-Zellen war keine Differenz zwischen NaN_3 -behandelten und -unbehandelten T-PC12-Zellen zu erkennen. Da NaN_3 keine Wirkung auf die ROS-Bildung bei PC12-Zellen und T-PC12-Zellen zeigte, ist davon auszugehen, dass weder die Cytochrom-c-Reduktase noch die Cytochrom-c-Oxidase bei PC12-Zellen einen Einfluss auf die Hypoxie-bedingte ROS-Bildung haben.

5.3.2 Die Rolle der Komplexe I und II bei der ROS-Produktion

Anhand der bisherigen Experimente mit PC12-Zellen und T-PC12-Zellen konnte eine Beteiligung der Komplexe III und IV bei der Hypoxie-bedingten ROS-Bildung eindeutig ausschlossen werden. Bei den Tests an T-PC12-Zellen, denen die mitochondrial kodierten Schlüsselkomponenten der Atmungskette fehlen, konnte unter Hypoxie keine ROS-Zunahme erfasst werden. Dies zeigte einerseits, dass der Hypoxie-induzierte ROS-Anstieg aus den Mitochondrien stammt. Andererseits schied damit auch der Komplex II in PC12-Zellen als Hypoxie-bedingte ROS-Quelle aus, da dieser Atmungskettenkomplex ausschließlich vom Kerngenom kodiert wird (Morgan-Hughes et al., 1988) und nach Thiamphenicol-Behandlung noch vollständig vorhanden ist. Daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf Komplex I der Atmungskette.

Dieser Multi-Polypeptidkomplex verfügt über verschiedene prosthetische Gruppen, mit denen er die Elektronenübergabe vom NADH auf das Ubiquinon katalysiert (Morgan-Hughes et al., 1988; Ragan, 1990; Friedrich et al., 1990; Leif et al., 1993). Die NADH-Dehydrogenase ist bei den meisten mitochondrialen Krankheiten und vielen neurodegenerativen Erkrankungen betroffen (Barrientos und Moraes, 1999), weshalb sie nach wie vor Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist. Neueren Ergebnissen zufolge stellt Komplex I die mitochondriale ROS-Quelle in neuronalen Zellen dar, was unter anderem durch den Einsatz von Rotenon herausgefunden wurde (Barja und Herrero, 1998; Hensley et al., 1998; Barrientos und Moraes, 1999). Bei Rotenon handelt es sich, ebenso wie bei DPI, um einen Inhibitor der NADH-Dehydrogenase (Zulueta et al., 1995). Die beiden Hemmstoffe binden allerdings an zwei verschiedenen Stellen des Enzymkomplexes.

5.3.2.1 Wirkung von Rotenon auf die ROS-Produktion von Komplex I

PC12-Zellen, die unter Normoxie mit dem Atmungsketteninhibitor Rotenon inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine signifikante Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenz. Dies lässt sich auf eine gesteigerte ROS-Bildung durch die Rotenon-inhibierte NADH-Dehydrogenase zurückführen.

Bei Rotenon handelt es sich um einen klassischen und spezifischen Komplex I-Inhibitor (Genova et al., 1997; Seaton et al., 1997; Higuchi et al., 1998), der als natürlich vorkommendes Pestizid aus Derris- und Lochorcarpusrinden und -wurzeln gewonnen wird (Lindahl und Oberg, 1961). Der lipophile Hemmstoff (Marey-Semper et al., 1993) bindet zwischen den Eisen-Schwefel-Clustern und dem Ubiquinon an die NADH-Dehydrogenase (Palmer et al., 1968). Dabei reagiert Rotenon in der Nähe der Ubiquinon-Bindungsstelle (Fearnley und Walker, 1992) bzw. an der Ubichinon-Bindungsstelle selbst (Okun et al., 1999) mit der hydrophoben (Genova et al., 1997) ND 1 Proteinuntereinheit der NADH-Dehydrogenase, einem 33 kD Protein (Smith und Ragan, 1980), das von mitochondrialer DNA kodiert wird (Earley et al., 1987). Infolgedessen wird der Elektronentransfer zwischen den Eisen-Schwefel-Clustern und dem Ubiquinon blockiert, was zu einer Reduktion aller Fe-S (Palmer et al., 1968) und zu einer Blockade der Rückoxidation von NADH zu NAD⁺ (Lindahl und Ogun, 1961) führt. In diesem reduzierten Zustand transferiert Komplex I die Elektronen direkt auf molekularen O₂, was mit einer gesteigerten O₂⁻-Bildung und eine verminderte ROS-Produktion an Komplex III einhergeht (Turrens und Boveris, 1980).

Nicht nur bei Rotenon-behandelten PC12-Zellen, sondern auch bei anderen Zelltypen konnte von verschiedenen Autoren ein ROS-Anstieg nach Rotenon-Inkubation beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe von Barrientos und Moraes (1999) stellte beispielsweise bei Experimenten an einer humanen Osteosarkom-Zelllinie (143B) nach Rotenon-Behandlung eine erhöhte ROS-Bildung fest. Hensley und Mitarbeiter (1998) inkubierten isolierte Gehirnmitochondrien ebenfalls mit Rotenon. Hierbei konnten sie die Blockade der NADH-Oxidation und gleichzeitig eine gesteigerte NADH-gekoppelte H₂O₂-Produktion nachweisen. Sie folgerten daher aus ihren Resultaten, dass die H₂O₂-Synthese in Gehirnmitochondrien am Komplex I stattfindet, der noch vor der Rotenon-Bindungsstelle über ein „Elektronenleck“ verfügen muss, an der die Elektronen die Elektronentransportkette verlassen und bei Kontakt mit O₂ ROS bilden. Auch Barja und

Herrero (1998) dokumentierten bei Rotenon-inkubierten, nicht-synaptischen Gehirnmitochondrien eine gesteigerte ROS-Bildung durch die NADH-Dehydrogenase. Andere Autoren hingegen konnten bei ihren Studien an nicht-neuronalen Zelllinien keine Beteiligung von Komplex I bei der ROS-Produktion nachweisen (Zulueta et al., 1995; Duranteau et al., 1998). Dies weist daraufhin, dass in neuronalen Zellen, zu denen ebenfalls PC12-Zellen gehören, ROS von der NADH-Dehydrogenase gebildet werden.

Im Gegensatz zu PC12-Zellen konnte bei T-PC12-Zellen kein Rotenon-induzierter ROS-Anstieg registriert werden. Gegenüber PC12-Zellen wurde bei T-PC12-Zellen sogar ein tendenzieller ROS-Abfall nach Rotenon-Inkubation erfasst. Durch die Thiamphenicol-Behandlung fehlen diesen Zellen alle mitochondrial kodierten Enzymuntereinheiten. Dazu zählt auch die Rotenon-bindende ND 1-Untereinheit, der N-2 Cluster und die Ubiquinon-Bindungsstelle (Tuschen et al., 1990; Wang et al., 1991). Dadurch kann weder Rotenon an Komplex I binden noch kann ein Elektronentransport durch das Enzym katalysiert werden, die ROS-Produktion bleibt daher aus. Dass Rotenon bei T-PC12-Zellen nicht die gleiche Wirkung wie bei PC12-Zellen erzielte, deutet wiederum auf die Beteiligung von Komplex I bei der ROS-Bildung hin.

5.3.2.2 Wirkung von DPI auf die ROS-Produktion von Komplex I

DPI hemmt Enzymsysteme, die Flavoproteine beinhalten. Hierzu zählen unter anderem die NADPH-Oxidase (Cross und Jones, 1986; Zulueta et al., 1995; Li und Trush, 1998), die Xanthin-Oxidase, die Stickstoffmonooxid-Synthetase (Zulueta et al., 1995) und außerdem die NADH-Dehydrogenase der mitochondrialen Atmungskette (Chandel et al., 1998; Semenza, 1999).

In einer frühen Studie von Ragan und Bloxham (1977) wurde der inhibitorische Effekt von DPI auf die NADH-Q-Reduktase zunächst auf genau die gleiche Wirkungsweise von Rotenon zurückgeführt. Majander et al. (1994) zeigten jedoch anhand von Untersuchungen am Komplex I von *Paracoccus denitrificans* und *Escherichia coli*, dass DPI die NADH-Dehydrogenase zwischen der NADH-Bindungsstelle und den Fe-S blockiert. Es gelang ihnen, eine irreversible, kovalente Bindung zwischen DPI und dem

FMN-Molekül des Enzymkomplexes nachzuweisen, was zuvor Tew (1993) schon an der NADPH Cytochrom P-450 Oxidoreduktase demonstriert hatte. Im DPI-blockierten Komplex I liegen alle Eisen-Schwefel-Zentren in oxidiertem Zustand vor, während sich die proteingebundene FMN-Komponente in einem stabilen, reduzierten Zustand befindet (Majander et al., 1994). Hierdurch kommt der mitochondriale Elektronentransfer zum Erliegen; dies erklärt die von Li und Trush (1998) festgestellte verminderte ROS-Produktion nach Inhibition der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase mit DPI.

Das gleiche Phänomen wurde von zahlreichen Autoren ebenfalls bei DPI-inhibierten extra-mitochondrialen NAD(P)H-Oxidasen in unterschiedlichen Zelllinien beobachtet (Cross und Jones, 1990; Meier et al., 1991; Zulueta et al., 1995; Jones et al., 1996; Degli-Eposti und Mc Lennan, 1998; Wolin et al., 1999). Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) hingegen berichten von präliminären Experimenten an PC12-Zellen, bei denen sie weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen ROS-Abfall nach DPI-Inkubation erkennen konnten. Zudem konnten sie bei diesen Versuchen keine veränderte Genexpression der TH, dem Geschwindigkeits-bestimmenden Enzym der Katecholaminsynthese (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998) feststellen. Sie vermuteten daher, dass DPI bei PC12-Zellen keinerlei Wirkung habe. Die ausführlichen Untersuchungen von Höhler et al. (1999) demonstrierten jedoch bei PC12-Zellen einen inhibitorischen Effekt von DPI auf die Hypoxie-induzierte Genexpression der TH und damit grundsätzlich eine Wirkung von DPI auf PC12-Zellen.

In dieser Studie wurden PC12-Zellen nur unter Normoxie mit DPI inkubiert. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen konnte nur eine geringe, nicht signifikante Abschwächung der ROS-Bildung erfasst werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem von zahlreichen Autoren beschriebenen ROS-Abfall nach DPI-Inkubation von verschiedenen Zelltypen (Cross und Jones, 1990; Meier et al., 1991; Zulueta et al., 1995; Jones et al., 1996; Wolin et al., 1999). Es widerspricht außerdem der vielfach geäußerten Meinung, dass die zytosolische NAD(P)H-Oxidase für die Hypoxie-induzierte ROS-Produktion verantwortlich ist (Bastian und Hibbs, 1994; Acker und Xue, 1995; Kummer und Acker, 1995; Jones et al., 1996; López-Barneo et al., 1997; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Wolin et al., 1999). Die Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase bei der Hypoxie-bedingten ROS-Bildung ist demzufolge, auch in Verbindung mit den bei T-PC12-Zellen gewonnenen Resultaten, bei PC12-Zellen auszuschließen.

Dass die unter Hypoxie vermehrt gebildeten ROS dem Komplex I der Mitochondrien entstammen, wurde zudem durch die erzielten Testergebnisse nach gleichzeitiger Rotenon + DPI-Inkubation von PC12-Zellen bestätigt. Bei diesen Zellen war im Vergleich zu Rotenon-behandelten PC12-Zellen ein signifikanter ROS-Abfall erkennbar. Diese verminderte ROS-Bildung ist auf ein „Abfangen“ der Elektronen am FMN-Molekül von Komplex I durch das kovalent gebundene DPI (Tew, 1993; Majander et al., 1994) zurückzuführen. Als Folge der kovalenten DPI-Bindung verbleiben die Eisen-Schwefel-Zentren in oxidiertem Zustand (Majander et al., 1994), weshalb keine Elektronen mehr zu den Eisen-Schwefel-Zentren übertragen werden und eine ROS-Bildung ausbleibt. Außerdem können ROS vermutlich nur an Eisen-Schwefel-Zentren entstehen, die sich in reduziertem Zustand befinden. Die Tatsache, dass DPI offensichtlich in der Lage ist, den Rotenon-Effekt zu löschen, weist die Eisen-Schwefel-Zentren von Komplex I als ROS-Entstehungsort aus.

Nach gleichzeitiger Zugabe von Rotenon + DPI zu T-PC12-Zellen war gegenüber unbehandelten T-PC12-Zellen und Rotenon-inkubierten T-PC12-Zellen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dies lässt sich darin begründen, dass den T-PC12-Zellen mitochondrial kodierte, elektronenübertragende Atmungskettenproteine fehlen, zu denen auch die DPI-Bindungsstelle und die Rotenon-bindene ND 1 Untereinheit von Komplex I gehört. Demzufolge ist einerseits ein physiologischer Elektronentransport, andererseits wahrscheinlich auch die Bindung von DPI und Rotenon an die NADH-Dehydrogenase nicht möglich.

Alle gewonnenen Ergebnisse weisen daraufhin, dass der Hypoxie-bedingte ROS-Anstieg in PC12-Zellen auf die mitochondriale NADH-Dehydrogenase zurückzuführen ist. Die Inkubationen mit den Atmungsketteninhibitoren Rotenon und DPI lassen weiterhin darauf schließen, dass der Komplex I von PC12-Zellen ebenfalls über das von Hensley und Mitarbeitern (1998) beschriebene „Elektronenleck“ vor der Rotenon-Bindungsstelle verfügen muss, an dem die Elektronen als ROS die Elektronentransportkette verlassen.

5.4 Wirkung von DIDS auf die mitochondriale ROS-Produktion

Takahashi und Asada (1983) berichteten, dass der Durchtritt von O_2^- durch Zellmembranen vermutlich nur durch Anionenkanäle hindurch erfolgen kann. Auch die Arbeitsgruppe von Paky (1993) kam zu dem Schluss, dass Anionenkanäle in den O_2^- -Transport involviert sein müssen, da der Anionenkanalblocker DIDS bei Krebs-Henseleit-perfundierten Kaninchenlungen zu einem intrazellulären O_2^- -Anstieg führte. Beavis und Davatol-Hag (1996) führten Studien an Anionenkanälen der inneren Mitochondrienmembran (IMAC) durch, die sich durch ihre Selektivität für ein weites Anionen-Spektrum auszeichnen. Dabei konnten sie demonstrieren, dass IMAC - wie andere Anionenkanäle auch - reversibel durch DIDS inhibierbar sind.

Um festzustellen, ob mitochondriale Anionenkanäle am O_2^- -Durchtritt ins Cytosol beteiligt sind, inkubierten Vanden Hoek et al. (1998) Kardiomyozyten unter Hypoxie mit DIDS. DIDS verhinderte hierbei die Hypoxie-induzierte ROS-Bildung. Sie folgerten daraus, dass durch die DIDS-Blockade O_2^- nicht mehr ins Zytosol gelangen kann, um dort von zytosolischen Superoxid-Dismutasen in H_2O_2 umgewandelt zu werden. Auch die Arbeitsgruppe von Chandel (2000a) inkubierte humane Karzinomzellen (MCF-7 Zellen) und diploide Fibroblastenzellen (IMR-90 Zellen) mit DIDS unter hypoxischen Bedingungen. Sie konnten gleichermaßen einen DIDS-induzierten ROS-Abfall beobachten.

Die PC12-Zellen wurden ebenfalls unter Hypoxie mit dem Anionenkanalblocker DIDS inkubiert. Mit beiden Fluoreszenzindikatoren war kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie erfassbar, allerdings war auch hier unter Hypoxie eine tendenziell verminderte ROS-Bildung zu erkennen. Beim Vergleich DIDS-inkubierter und unbehandelter Kontrollzellen wurde unter Hypoxie ebenfalls kein signifikanter ROS-Anstieg erfasst. Unter Normoxie hingegen konnte bei DIDS-behandelten PC12-Zellen gegenüber unbehandelten PC12-Kontrollzellen eine signifikant erhöhte ROS-Bildung registriert werden.

Die beobachtete ROS-Zunahme unter Normoxie scheint daran zu liegen, dass DIDS nicht nur die mitochondrialen Anionenkanäle (Beavis und Davatol-Hag, 1996), sondern alle zellulären Anionenkanäle blockiert (Wang et al., 2000). Ein Austritt von intrazellulär gebildeten, auch aus extra-mitochondrialen Enzymsystemen stammenden ROS in den Extrazellarraum wird vermutlich unterbunden. Dies kommt in dem

messbaren intrazellulären ROS-Anstieg bei DIDS-inkubierten PC12-Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen unter Normoxie zum Ausdruck. Unter Hypoxie hingegen kann von den Mitochondrien vermehrt produziertes O_2^- nicht in das Cytosol gelangen, da die mitochondrialen Anionenkanäle durch DIDS blockiert sind. Der intrazelluläre, Hypoxie-bedingte ROS-Anstieg kommt daher nicht zustande.

6 Zusammenfassung

Der O₂-messende Mechanismus chemosensitiver Paraganglien von Säugetieren ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Als Modell für Studien am O₂-messenden Mechanismus Hypoxie-sensitiver Paraganglien dient eine Tumorzelllinie aus dem Nebennierenmark der Ratte (PC12-Zellen), da sie eine sehr hohe Sensitivität gegenüber O₂-Schwankungen aufweist. In PC12-Zellen konnte unter Hypoxie ein intrazellulärer Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet werden. Es ist jedoch noch nicht bekannt, welches zelluläre Enzymsystem für diese Hypoxie-bedingte ROS-Produktion in PC12-Zellen verantwortlich ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mitochondriale von nicht-mitochondrialen ROS-Quellen unter Hypoxie in PC12-Zellen zu differenzieren. Die PC12-Zellen wurden in Gegenwart der Redox-sensitiven Fluoreszenzindikatoren Dihydrorhodamin 123 und 2',7'-Dichlorofluorescein Diazetat unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Durch intra-zellulär gebildete ROS werden beide Substanzen in ihre fluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 und 2',7'-Dichlorofluorescein oxidiert. Anhand der Rhodamin 123- bzw. 2',7'-Dichlorofluorescein-Fluoreszenzintensität konnte die intrazelluläre ROS-Produktion in den PC12-Zellen am LSM gemessen werden. Beide Fluoreszenzindikatoren eigneten sich gleichermaßen für die Messung intrazellulär gebildeter ROS.

In allen Experimenten wurde bei PC12-Zellen ein Hypoxie-bedingter ROS-Anstieg festgestellt. Um die Beteiligung der Mitochondrien bei der ROS-Produktion nach-zuweisen, wurden die PC12-Zellen mit Thiamphenicol behandelt (T-PC12-Zellen) und mit dem Anionenkanalblocker 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonat (DIDS) inkubiert.

Mit Ausnahme von Komplex II werden die Proteinkomponenten der vier mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei Säugtieren sowohl von mitochondrialer als auch von Kern-DNA kodiert. Thiamphenicol inhibiert die Translation der dreizehn mitochondrial kodierten Proteinuntereinheiten der Atmungskette. Nach der Thiamphenicol-Behandlung induzierte Hypoxie keinen ROS-Anstieg in den PC12-Zellen. Dies zeigt eine Beteiligung mitochondrial kodierter Proteine bei der Hypoxie-bedingten ROS-Zunahme in den PC12-Zellen.

Auch die Ergebnisse DIDS-inkubierter PC12-Zellen deuten auf die Mitochondrien als die verantwortliche Quelle für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg hin. DIDS-inkubierte PC12-Zellen zeigten durch die Blockade aller zellulären Anionenkanäle eine signifikante ROS-Zunahme unter Normoxie. Ein Austritt von intrazellulär gebildeten, auch aus extra-mitochondrialen Enzymsystemen stammenden ROS in den Extrazellularraum wird unterbunden. Unter Hypoxie hingegen konnte keine signifikante ROS-Zunahme nach DIDS-

Inkubation beobachtet werden. Da DIDS die mitochondrialen Anionenkanäle blockiert, können die von den Mitochondrien unter Hypoxie vermehrt produzierten ROS nicht ins Cytosol gelangen. Der intrazelluläre, Hypoxie-bedingte ROS-Anstieg wird verhindert.

Nach der erwiesenen Beteiligung der Mitochondrien bei der ROS-Produktion in PC12-Zellen wurde der ROS-generierende mitochondriale Atmungskettenkomplex ermittelt. Hierfür wurden die PC12-Zellen und T-PC12-Zellen mit speziellen Atmungsketteninhibitoren inkubiert. Die Behandlung von PC12-Zellen und T-PC12-Zellen mit NaN_3 , einem Inhibitor von Komplex IV, hatte keinerlei Einfluss auf die Hypoxie-bedingte ROS-Produktion. Daher schieden die Komplexe III und IV als ROS-Quellen in PC12-Zellen aus. Der Komplex II wird ausschließlich vom Kerngenom kodiert und bleibt damit auch nach Thiamphenicol-Behandlung funktionell aktiv. Er konnte nach dem ausbleibenden ROS-Anstieg bei T-PC12-Zellen unter Hypoxie ebenfalls nicht für die Hypoxie-bedingte ROS-Zunahme verantwortlich sein.

Der spezifische Inhibitor Rotenon blockiert den Komplex I zwischen den Fe-S-Clustern und dem Ubiquinon. Rotenon-behandelte PC12-Zellen zeigten unter Normoxie eine gesteigerte ROS-Bildung. Dieser Effekt von Rotenon wurde jedoch durch die gleichzeitige Inkubation mit dem Flavoproteininhibitor DPI reduziert. DPI hemmt den Komplex I zwischen der NADH-Bindungsstelle und den Fe-S-Clustern durch Bindung an die FMN-Komponente von Komplex I. DPI alleine führte unter Normoxie zu keiner veränderten ROS-Produktion in PC12-Zellen. Ebenso verhielt es sich bei T-PC12-Zellen, die mit Rotenon und Rotenon + DPI gleichzeitig inkubiert wurden.

Diese Untersuchungsergebnisse identifizieren den Komplex I als ROS-Quelle in PC12-Zellen. Er scheint vor der Rotenon-Bindungsstelle über ein „Elektronenleck“ zu verfügen, an dem die Elektronen die Elektronentransportkette verlassen.

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen, dass die Mitochondrien für den Hypoxie-bedingten ROS-Anstieg in den PC12-Zellen verantwortlich sind und die ROS in den PC12-Zellen vom mitochondrialen Komplex I gebildet werden.

7 Summary

The O₂-sensor mechanism of mammalian chemosensitive paraganglia is still unresolved. A tumor cell line (PC12-cells) derived from the rat adrenal medulla is highly sensitive to changes in pO₂ and serves as a model to investigate this O₂-sensor mechanism. In PC12 cells, an intracellular increase of reactive oxygen species (ROS) was observed during hypoxia, but it is still unknown, which cellular enzyme system is responsible for this hypoxia-induced increase of ROS.

It was the aim of this study to differentiate mitochondrial from non-mitochondrial sources of increased ROS-generation during hypoxia in PC12-cells. PC12-cells were exposed to the redox-sensitive indicators dihydrorhodamine 123 and 2',7'-dichloro-fluorescein-diacetate during normoxia and hypoxia. These non-fluorescent dyes are oxidized by intracellular ROS to their fluorescent metabolites rhodamine 123 and 2',7'-dichlorofluorescein. By measuring this fluorescence by laser scanning microscopy (LSM) the intracellular production of ROS in PC12-cells was detected.

In all experiments an increased ROS-production was observed in PC12-cells exposed to hypoxia. To determine the involvement of mitochondria in this hypoxia-induced ROS-generation, PC12-cells were treated with thiamphenicol (T-PC12-cells) and incubated with the anion channel blocker 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS).

With the exception of complex II, the mammalian mitochondrial respiratory chain complexes are encoded by both mitochondrial and nuclear DNA. Thiamphenicol inhibits the translation of the 13 mitochondrially encoded subunits of the respiratory chain. After treatment of PC12-cells with thiamphenicol hypoxia did not induce an increased ROS-production. This shows that mitochondrially encoded proteins are involved in the hypoxia-induced augmented ROS-generation in PC12- cells.

The results obtained from PC12-cells after incubation with DIDS also demonstrate mitochondria as the source of the hypoxia-induced increase of ROS. PC12-cells treated with DIDS showed a significantly enhanced ROS-production under normoxia because the efflux of all intracellularly, both from mitochondrial and non-mitochondrial enzyme systems produced ROS is inhibited. During hypoxia DIDS did not induce a significantly increased ROS-generation in PC12-cells. As DIDS is blocking the mitochondrial anion channels, the ROS that are increasingly produced within the mitochondria under hypoxia do not cross the

mitochondrial membrane in sufficient amount to be detectable in the cytosol. Thus, an intracellular, hypoxia-induced increase of ROS is prevented.

After the involvement of mitochondria in ROS-production in PC12-cells was shown, the ROS-generating mitochondrial complex was identified by incubating PC12-cells and T-PC12-cells with specific inhibitors of the respiratory chain. Treating PC12-and T-PC12-cells with sodium azide, a complex IV inhibitor, had no influence on hypoxia-induced ROS-production. Therefore, the complexes III and IV seemed not to cause the augmented ROS-generation during hypoxia in PC12-cells. Complex II is encoded only by nuclear DNA and, therefore, is still functionally active after treatment with thiamphenicol. Because of the absence of an increase of ROS in T-PC12-cells, complex II is also not responsible for the hypoxia-induced enhanced ROS-production.

Rotenone blocks complex I between the Fe-S-clusters and ubiquinone. Rotenone-treated PC12-cells showed an increased ROS-production during normoxia. This effect of rotenone was reduced by the additional incubation with the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium (DPI). DPI inhibits complex I between the binding site of NADH and the Fe-S-clusters by binding to the FMN-compound of complex I. DPI alone did not change the ROS-generation under normoxia. The same was observed in T-PC12-cells after incubation with rotenone or with rotenone in the additional presence of DPI.

From the present data it can be deduced that the source of hypoxia-induced ROS-production is the mitochondrial complex I in PC12-cells. Complex I seems to possess an electron leak site upstream from the rotenone binding site, where the electrons leave the electron transport chain.

In conclusion, mitochondria are responsible for the hypoxia-induced increase of ROS in PC12-cells, and ROS are produced by the mitochondrial complex I in PC12-cells.

8 Literaturverzeichnis

Acker H & Xue D (1995)

Mechanisms of O₂ sensing in the carotid body in comparison with other O₂-sensing cells.
News Physiol Sci; 10: 211-216

Acker H (1993)

Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism.
Respir Physiol; 95: 1-10

Acker H, Bölling B, Delpiano MA, Dufau E, Görlach A & Holtermann G (1992)

The meaning of H₂O₂ generation in carotid body cells for pO₂ chemoreception.
J Auton Nerv Syst; 41: 41-51

Attardi G, Chomyn A & Polosa PL (1991)

Developmental regulation of expression of mitochondrial DNA encoded ND5 subunit of NADH Dehydrogenase.
Biol Chem Hoppe Seyler; 372: 547-555

Azzi A & Müller M (1990)

Cytochrome *c* oxidases: polypeptide composition, role of subunits and location of active metal centers.
Arch Biochem Biophys; 280: 242-251

Barja G & Herrero A (1998)

Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon.
J Bioenerg Biomembr; 30: 235-243

Barrientos A & Moraes CT (1999)

Titration of the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology.

J Biol Chem; 274: 16188-16197

Bastian NR & Hibbs JB (1994)

Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase.

Curr Opin Immunol; 6: 131-139

Beavis AD & Davatol-Hag H (1996)

The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS.

J Bioenerg Biomembr; 28: 207-214

Bellative P (1988)

The superoxide-forming enzymatic system of phagozytes.

Free Radic Biol Med; 4: 225-261

Boveris A & Chance B (1973)

The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.

Biochem J; 134: 707-716

Budinger GRS, Duranteau J, Chandel NS & Schumacker PT (1998)

Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂-sensor.

J Biol Chem; 273: 3320-3326

Budinger GR, Chandel N, Shao ZH, Li CQ, Melmed A, Becker LB & Schumacker PT (1996)

Cellular energy utilization and supply during hypoxia in embryonic cardiac myocytes.

Am J Physiol; 270: L44-53

Bunn HF & Poyton RO (1996)

Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.

Physiol Rev; 76: 839-885

Capaldi RA (1991)

Structural features of the mitochondrial electron-transfer chain.

Curr Opin Struct Biol; 1: 562-568

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

Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain.

J Bioenerg Biomembr; 20: 291-311

Capaldi RA, Malatesta & Darley-USmar VM (1983)

Structure of cytochrome *c* oxidase.

Biochim Biophys Acta; 726: 135-148

Capaldi RA (1982)

Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane.

Biochim Biophys Acta; 694: 291-306

Cathcart R, Schwiers E & Ames BN (1983)

Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay.

Anal Biochem; 134: 111-116

Chan SI & Li PM (1990)

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

Biochemistry; 29: 1-12

Chandel NS & Schumacker PT (2000)

Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight.

J Appl Physiol; 88: 1880-1889

Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB & Schumacker PT (2000a)

Redox regulation of p53 during hypoxia.

Oncogene; 19: 3840-3848

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

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

J Biol Chem; 275: 25130-25138

Chandel NS & Schumacker PT (1999)

Cells depleted of mitochondrial DNA (p^0) yield insight into physiological mechanisms.

FEBS Lett; 454: 173-176

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC & Schumacker PT (1998)

Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.

Proc Natl Acad Sci USA; 95: 11715-11720

Chandel NS, Budinger GR, Choe SH & Schumacker PT (1997)

Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes.

J Biol Chem; 272: 18808-18816

Chandel NS, Budinger GRS & Schumacker PT (1996)

Molecular oxygen modulates cytochrome *c* oxidase function.

J Biol Chem; 271: 18672-18677

Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolittle RF & Attardi G (1985)

Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase.

Nature; 314: 592-599

Conforti L, Kobayashi S, Beitner-Johnson D, Conrad PW, Freeman T & Millhorn DE (1999)

Regulation of gene expression and secretory functions in oxygen-sensing pheochromocytoma cells.

Respir Physiol; 115: 249-260

Cross AR & Jones OTG (1990)

Enzymic mechanisms of superoxide production.

Biochim Biophys Acta; 1057: 281-298

Cross AR & Jones OTG (1986)

The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils.

Biochem J; 237: 111-116

Crow JP (1997)

Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamin 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species.

Nitric oxide; 1: 145-157

Czyzyk-Krzeska MF (1997)

Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia.

Respir Physiol; 110: 99-111

Czyzyk-Krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE & Millhorn DE (1994)

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

J Biol Chem; 269: 760-764

Davis KA & Hatefi Y (1971)

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

Biochemistry; 10: 2509-2516

Degli-Eposti M & Mc Lennan H (1998)

Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis.

FEBS Lett; 430: 338-342

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothmann SM, Lin TS, Goldberg MP & Choi DW (1995)

Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate.

J Neurosci; 15: 6377-6388

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Zuohui S & Schumacker PT (1998)

Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes.

J Biol Chem; 273: 11619-11624

Earley FGP, Salil D, Patel C, Ragan CI & Attardi G (1987)

Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [³H]dihydrorotenone.

FEBS Lett; 219: 108-113

Ehleben W, Porwol T, Fandrey J, Kummer W & Acker H (1997)

Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen pathway in HepG2 cells.

Kidney International; 51: 483-491

Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Mathes ML & Roesler J (1990)

A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123.

J Immunol Methods; 131: 269-275

Fearnley IM & Walker JE (1992)

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

Biochim Biophys Acta; 1140: 105-135

Friedrich T, Strohdeicher M, Hofhaus G, Preis D, Sahn H & Weiss H (1990)

The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase.

FEBS Lett; 265: 37-40

Genova ML, Bovina C, Marchetti M, Pallotti F, Tietz C, Biagini G, Pugnali A, Viticchi C, Gorini A, Villa RF & Lenaz G (1997)

Decrease of rotenone inhibition is a sensitive parameter of complex I damage in brain non-synaptic mitochondria of aged rats.

FEBS Lett; 410: 467-469

Geiszt M, Kopp JB, Várnai P & Leto TL (2000)

Identification of Renox a NAD(P)H oxidase in kidney.

PNAS; 97: 8010-8014

Gibb GM & Ragan I (1990)

Identification of the subunits of bovine NADH dehydrogenase which are encoded by the mitochondrial genome.

Biochem J; 265: 903-906

Görlach A, Holtermann G, Jelkmann W, Hancock JT, Jones SA, Jones OTG & Acker H (1993)

Photometric characteristics of haem proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2).

Biochem J; 290: 771-776

Greene LA & Tischler AS (1976)

Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.

Proc Natl Acad Sci USA; 73: 2424-2428

Hanstein WG, Davis KA, Ghalambor MA & Hatefi Y

Succinate dehydrogenase. II. Enzymatic properties.

Biochemistry; 10: 2517-2524

Hatefi Y (1985)

The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.

Ann Rev Biochem; 54: 1015-1069

Hawes EM & Watts JA (1993)

Xanthine oxidase/dehydrogenase release following ischemia in isolated rat hearts.

Am J Cardiovasc Pathol; 4: 326-335

Henderson LM & Chappell JB (1993)

Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation ?

Eur J Biochem; 217: 973-980

Hensley K, Pye QN, Maitt ML, Stewart CA, Robinson KA; Jaffrey F & Floyd RA (1998)

Interaction of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and alternative electron acceptors with complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site.

J Neurochem; 71: 2549-2557

Higuchi M, Proske RJ & Yeh ET (1998)

Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome *c* release, membrane permeability transition, and apoptosis.

Oncogene; 17: 2515-2524

Hille R & Nishino T (1995)

Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase.

FASEB J; 9: 995-1003

Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, Reddy JK & Withe JG (1999)

Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells.

Proc Natl Acad Sci USA; 96: 6255-6260

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

Mitochondriale Atmungskette und ROS-Produktion in PC12 Zellen.

Ann Anat; 182 (Suppl.): 123

Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Tastan H, Möller W & Kummer W (1999)

Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells.

FEBS Lett; 457: 53-56

Isenberg JS & Klaunig JE (2000)

Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells.

Toxicol Sci; 53: 340-351

Jones SA, O'Donnel VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ & Jones OTG (1996)

Expression of phagozyte NADPH oxidase components in human endothelial cells.

Am J Physiol; 271: H1626-1634

Kadenbach & Merle (1981)

On the function of multiple subunits of cytochrome *c* oxidase from higher eukaryotes.

FEBS Lett; 135: 1-11

Karnovsky MJ (1994)

Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective.

Biochemistry; 102: 15-27

King MP & Attardi G (1989)

Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation.

Science; 246: 500-503

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

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

Mol Reprod Dev; 49: 394-399

Kroll SL & Czyzyk-Krzeska MF (1998)

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

Am J Physiol; 274: C167-174

Kroon AM, Vries H & Nijhof W (1976)

Protein synthesis in heart mitochondria: mechanism and metabolic aspects.

Acta Cardiol; 31: 1-13

Kumar GK, Overholt JL, Bright GR, Hui KY, Lu H, Gratzl M & Prabhakar NR (1998)

Release of dopamine and norephidrine by hypoxia from PC-12 cells.

Am J Physiol; 274: C1592-1600

Kummer W, König P & Höhler B (1999)

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

Microsc Res Tech; 47: 215-220

Kummer W & Acker H (1997)

Cytochrome b₅₅₈ and hydrogen peroxide production in small intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia.

Histochem Cell Biol; 107: 151-157

Kummer W (1996) in:

Autonomic-endocrine interactions

(Unsicker K, Ed.), Harwood Academic Publisher, Chur.: 315-356

Kummer W & Acker H (1995)

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

J Appl Physiol; 78: 1904-1909

Kuzela S, Mutvei A & Nelson BD (1988)

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

Biochim Biophys Acta; 936: 372-376

Kuzela S & Luciakova K (1983)

Energy deprivation of Zajdela hepatoma cells upon in vitro treatment with thiamphenicol.

Neoplasma; 30: 651-657

Lagercrantz H (1996)

Stress, arousal, and gene activation at birth.

News Physiol Sci; 11: 214-218

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

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

Biochem Soc Trans; 21: 998-1001

Li Y & Trush M (1998)

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

Biochem Biophys Res Com; 253: 295-299

Lindahl PE & Oberg KE (1961)

The effect of rotenone on respiration and its point of attack.

Exp Cell Res; 23: 228-237

Littauer A & De Groot H (1992)

Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria.

Am J Physiol; 262: G1015-1020

Lloreta-Trull J & Serrano S (1998)

Biology and pathology of the mitochondrion.

Ultrastruct Pathol; 2: 357-367

López-Barneo J, Pardal R & Ortega-Sáenz P (2001)

Cellular mechanism of oxygen sensing.

Annu Rev Physiol; 63: 259-287

López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, Molina A, Franco-Obregón A, Ureña J & Castellano A (1997)

Ion channels and heme proteins as oxygen sensors. Oxygen sensing by ion channels.

Kidney Int; 51: 454-461

Majander A, Moshe F & Wikström M (1994)

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

J Biol Chem; 269: 21037-21042

Malmström BG (1990)

Cytochrome oxidase: some unresolved problems and controversial issues.

Arch Biochem Biophys; 280: 233-241

Marey-Semper I, Gelman M & Lévi-Strauss M (1993)

The high sensitivity to rotenone of strial dopamine uptake suggests the existence of a constitutive metabolic deficiency in dopaminergic neurons from the substantia nigra.

Eur J of Neurosci; 5: 1029-1034

Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ & Jones OTG (1991)

Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts.

Biochem J; 275: 241-245

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

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

J Bioenerg Biomembr; 20: 365-382

Nixon PJ, Gounaris K, Coomber SA, Hunter CN, Dyer TA & Barber J (1989)

psbG is not a photosystem two gene but may be an ndh gene.

J Biol Chem; 264: 14129-14135

Okun JG, Lümmen P & Brandt U (1999)

Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase).

J Biol Chem; 274: 2625-2630

Palmer G, Horgan DJ, Tisdale H, Singer TP & Beinert H (1968)

Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy.

J Biol Chem; 243: 844-847

Paky A, Michael JR, Burke-Wolin TM, Wolin MS & Gurtner GH (1993)

Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors.

J Appl Physiol; 74: 2868-2874

Petersen LC (1977)

The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrom *c* oxidase.

Biochim Biophys Acta; 460: 299-307

Ragan CI (1990)

Structure and function of an archetypal respiratory chain complex: NADH-ubiquinone reductase.

Biochem Soc Trans; 18: 515-516

Ragan CI & Bloxham DP (1977)

Specific labelling of a constituent polypeptide of bovine heart mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone reductase by the inhibitor diphenyleneiodonium.

Biochem J; 163: 605-615

Rothe G, Oser A & Valet G (1988)

Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes.

Naturwissenschaften; 75: 354-355

Royall JA & Ischiropoulos H (1993)

Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamin 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells.

Arch Biochem Biophys; 302: 348-355

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB & Marsden CD (1989)

Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson`s disease.

Lancet; 1: 1269

Seaton TA, Cooper JM & Schapira AHV (1997)

Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors.

Brain research; 777: 110-118

Semenza GL (1999)

Perspectives on oxygen sensing.

Cell; 98: 281-284

Shafir I, Feng W & Shoshan-Barmataz V (1998)

Voltage-dependent anion channel proteins in synaptosomes of the torpedo electric organ: immunolocalization, purification, and characterization.

J Bioenerg Biomembr; 30: 499-510

Sharp RE & Chapman SK (1999)

Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins.

Biochim Biophys Acta; 1432: 143-158

Shults CW, Haas RH, Passov D & Beal MF (1997)

Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complex I and II/ III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects.

Ann of Neurol; 42: 261-264

Skulachev VP (1998)

Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades (1998)

FEBS Lett; 423: 275-280

Smith S & Ragan CI (1980)

The organization of NADH dehydrogenase polypeptides in the inner mitochondrial membrane.

Biochem J; 185: 315-326

Takahashi M-A & Asada K (1983)

Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids.

Arch Biochem Biophys; 226: 558-566

Takamiya S, Lindorfer MA & Capaldi RA (1987)

Purification of bovine fetal heart cytochrome *c* oxidase from one aliquot of enzyme. Characterization of bovine fetal heart cytochrome *c* oxidase.

Biochemistry; 32: 10209-10215

Thinnes FP, Florke H, Winkelbach H, Stadtmuller U, Heiden M, Karabinos A, Hesse D, Kratzin HD, Fleer E & Hilschmann N (1994)

Channel active mammalian porin, purified from crude membrane fractions of human B lymphocytes or bovine skeletal muscle, reversibly binds the stilbene-disulfonate group of the chloride channel blocker DIDS.

Biol Chem Hoppe Seyler; 375: 315-322

Trumpower BL (1990)

The protonmotive Q cycle.

J Biol Chem; 265: 11409-11412

Turrens JF & Boveris A (1980)

Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.

Biochem J; 191: 421-427

Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavet UB & McCord JM (1991)

Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues.

Free Radic Commun; 12-13: 681-689

Tuschen G, Sackmann U, Nehls U, Haiker H, Buse G & Weiss H (1990)

Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in Neurospora mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits.

J Mol Biol; 213: 845-857

Ullrich V & Bachschmidt M (2000)

Superoxide as a messenger of endothelial function.

Biochem Biophys Res Com; 278: 1-8

Vanden Hoek TL, Becker LB, Zuohui S, Changqing L & Schumacker PT (1998)

Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes.

J Biol Chem; 273: 18092-19098

Vervoort J (1991)

Electron-transferring proteins

Curr Opin Str Biol; 1: 889-894

Wang BS, Chen YJ, Liu SH & Lin-Shiau SY (2000)

An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils.

Proc Natl Sci Counc Repub China B; 24: 178-186

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

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

Eur J Biochem; 197: 257-264

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

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

Eur J Biochem; 197: 563-576

Weiss H, Schmiede A & Schulte U (1991b)

Assembly of NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora* mitochondria.

Biol Chem Hoppe Seyler; 372: 547-555

Wolin MS, Burke-Wolin TM & Mohazzab-H. KM (1999)

Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms.

Respir Physiol; 115: 229-238

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Curnutte JT, Vollmer C, Wong V & Cutz E (1997)

Immunocytochemical localization of O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells.

Micros Res Tech; 37: 101-106

Yue W-H, Zou Y-P, Yu L & Yu C-A (1991)

Crystallization of mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase.

Biochemistry; 30: 2303-2306

Zhu WH, Conforti L, Czyzyk-Krzeska MF & Millhorn DE (1996)

Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current.

Am J Physiol; 271: C658-665

Zulueta JJ, Feng-Sheng Y, Hertig IA, Thannickal VJ & Hassoun PM (1995)

Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane.

Am J Respir Cell Mol Biol; 12: 41-49

9 Anhang

9.1 Eigene Veröffentlichungen zum Thema

1. Veröffentlichung

Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Tastan H, Möller W & Kummer W (1999)

Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells.

FEBS Lett; 457: 53-56

2. Abstract

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

Mitochondriale Atmungskette und ROS-Produktion in PC12 Zellen.

Ann Anat; 182 (Suppl.): 123

9.2 Danksagung

An diese Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

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

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

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Brigitte Höhler für die gute Betreuung bei der praktischen Durchführung und dem Schreiben dieser Arbeit sowie Frau Anna Goldenberg für ihre ständige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Bei Frau Karola Michael bedanke ich mich sehr für ihre ständige Unterstützung bei der Anfertigung der Grafiken und bei computertechnischen Problemen. Allen „Jungs und Mädels of the Anatomische Institut“ danke ich außerdem herzlich für den tollen, familiären Teamgeist.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums. Ich möchte mich bei ihnen und meiner Schwester Christina auch ganz besonders für ihre moralische Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit bedanken. Christina danke ich außerdem sehr herzlich für die Korrektur der Rechtschreibung.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Freunden Christine Hihn und Andreas Reiser sowie Henrike Könneker, die mich in einer sehr schwierigen Zeit bei sich berherbergt haben. Sie waren, ebenso wie Elke Tomaschek, Mona Hoffmann, Christina Schmidt und Axel Neubauer schon seit dem Studium immer in allen Lebenslagen für mich da und haben sehr zum Entstehen dieser Dissertation beigetragen. Außerdem danke ich herzlich meinen Freunden Egbert Andräß, Britt Wüsten, Nadine Volk, Yvonne Ehrenfels und Marthe-Katharina Feurer, ohne deren ständige, unermüdliche Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.