

**Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit auf
die Produktion Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies
in der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH SY5Y**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
der Doktorin der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Lys Kronenberger

Saarbrücken

2024

Tag des Kolloquiums: 19.12.2024

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Uli Müller
Prof. Dr. Bruce Morgan

Akad. Mitglied: Dr. Jens Neunzig

Vorsitz: Prof. Dr. Julia Schulze-Hentrich

Sobald wir unsere Grenzen akzeptieren,
gehen wir über sie hinaus.

- Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Glucose-Metabolismus im Gehirn	8
1.1.1 Glucose-Aufnahme im Gehirn	8
1.1.2 Glucose metabolisierende Wege in Neuronen.....	9
1.1.3 Abnormaler Glucose-Metabolismus und neurodegenerative Erkrankungen.....	11
1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies	14
1.2.1 Antioxidative Verteidigung	15
1.2.2 Quellen Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies	16
1.2.3 Produktion Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies unter gestörtem Glucose-Metabolismus	23
2. Zielsetzung	27
3. Material & Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Chemikalien.....	28
3.1.2 Puffer und Verbrauchslösungen	30
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	35
3.1.4 Geräte.....	36
3.1.5 Antikörper	38
3.1.6 Zelllinie.....	39
3.2 Methoden	40
3.2.1 Kultivierung der Zellen	40
3.2.2 In-situ Zellzählung mittels BioTek Cytation 5 System.....	41
3.2.3 Bestimmung von Proteinmengen mittels BCA Protein Assay	42
3.2.4 Proteinnachweis mittels Western Blot.....	43
3.2.5 Protein-Quantifizierung mittels ELISA.....	45
3.2.6 Immunohistologische Färbung	49

3.2.7 Quantifizierung der mitochondrialen Masse mittels CellLight Mitochondria-GFP	51
3.2.8 Messung des intrazellulären Calcium-Signals	53
3.2.9 Messung der Energieträger im Medium-Überstand mittels Amplex Red	60
3.2.10 Ermittlung der zellulären ATP-Produktion mittels Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay	64
3.2.11 Messung des intrazellulären RONS-Signals mittels H ₂ DCFDA	67
3.2.12 Messung des mitochondrialen Superoxid-Signals mittels MitoSOX Red	70
3.2.13 Messung des extrazellulären H ₂ O ₂ -Signals mittels Amplex Red	72
4. Ergebnisse	75
4.1 Protein-Nachweis und Lokalisation der NADPH-Oxidasen	75
4.2 Lokalisation der Myeloperoxidase	82
4.3 Lokalisation der Superoxide-Dismutase 3	84
4.4 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie	87
4.4.1 Hypo- und Hyperglykämie wirken sich auf den Glucose-Verbrauch und die Laktat-Produktion aus	87
4.4.2 Hypoglykämie beeinflusst die mitochondriale ATP-Produktion	90
4.4.3 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie wirken sich auf die Mitochondrien aus	94
4.4.4 Die AMPK beeinflusst die intrazelluläre RONS-Produktion	98
4.4.5 Langzeitige Hypoglykämie stimuliert die Superoxid-Produktion über NOX3	102
4.4.6 Langzeitige Hyperglykämie stimuliert die MPO-vermittelte HOCl-Produktion	108
4.4.7 Der Einfluss 24-stündiger Hypo- und Hyperglykämie auf das extrazelluläre H ₂ O ₂ -Signal lässt Aussagen über die intrazelluläre H ₂ O ₂ -Konzentration zu	111

4.4.8 48-stündige Hypoglykämie beeinflusst die Proteinmenge der NOX5	114
4.5 Kurzzeitiger Glucose-Entzug	116
4.5.1 Glucose-Entzug hat keinen Einfluss auf die ATP-Produktion	116
4.5.2 Kurzer Glucose-Entzug aktiviert die AMPK	118
4.5.3 Kurzzeitiger Glucose-Entzug hat keine nachweisbare Wirkung auf die intrazelluläre O ₂ ⁻ -Produktion	120
4.5.4 Kurzer Glucose-Entzug hat keinen Einfluss auf extrazelluläres H ₂ O ₂	122
4.6 Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit auf Acetylcholin-induzierte intrazelluläre Calcium-Signale	124
4.6.1 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie beeinflussen Transmitter-induzierte Calcium-Signale	124
4.6.2 Kurzzeitiger Glucose-Entzug beeinflusst Acetylcholin-induzierte Calcium-Signale	127
5. Diskussion	129
5.1 Hyperglykämie wirkt über Myeloperoxidase-vermittelte HOCl-Produktion auf physiologische Prozesse	130
5.2 Hypoglykämie moduliert über die Aktivierung der NOX3 physiologische Funktionen	135
5.2.1 Kurzzeitiger Glucose-Entzug wirkt sich auf die AMPK-Aktivität und die Calcium-Homöostase aus	141
5.3 Ausblick	144
6. Zusammenfassung	147
7. Summary	148
8. Verzeichnisse	149
8.1 Abbildungsverzeichnisse	149
8.2 Tabellenverzeichnisse	152
8.4 Literaturverzeichnis	158
9. Anhang	176

9.1 ImageJ-Macros	176
9.2 Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit auf die Zell-Viabilität	176
9.3 Energieträger-Messungen	177
9.4 Charakterisierung der Mitochondrien mittels CellLight Mitochondria-GFP	180
9.5 Quantifizierung der Komponenten des „RONS-Netzwerks“ mittels ELISA	181
9.6 Messungen der RONS-Signale mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe	183
9.6.1 Exemplarische Steigungsverläufe der RONS-Fluoreszenzfarbstoffe	183
9.6.2 Etablierung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung verschiedener RONS-Signale.....	185
9.6.3 Auswirkung der Inhibitoren auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells	187
9.6.4 Auswirkung der Behandlungsdauer auf die Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung verschiedener RONS.....	189
9.6.5. Identifizierung des Beitrags verschiedener Komponenten des „RONS-Netzwerks“	190
9.6.6 Einfluss von Glucose-Entzug auf RONS	191
10. Danksagung.....	193
11. Lebenslauf und akademischer Werdegang	195

1. Einleitung

1.1 Glucose-Metabolismus im Gehirn

Das menschliche Gehirn ist auf Glucose als Hauptquelle für die Gewinnung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und die Aufrechterhaltung von physiologischen Funktionen angewiesen. Zur Aufrechterhaltung dieser Funktionen benötigt das menschliche Gehirn eine kontinuierliche Zufuhr von Glucose, da es nur sehr geringe Speicherkapazitäten hat. Dadurch ist das menschliche Gehirn besonders empfindlich gegenüber einer unzureichenden Glucose-Versorgung oder einem gestörten Glucose-Stoffwechsel (Mergenthaler et al., 2013).

1.1.1 Glucose-Aufnahme im Gehirn

Glucose gelangt vom Blut über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn. Die Hauptaufgabe der Blut-Hirn-Schranke ist die Limitierung der freien Diffusion zwischen dem Blut und der Gehirn-Flüssigkeit, um das Gehirn vor Molekülen und Zellen zu schützen, welche die neuronale Funktion nachteilig beeinflussen könnten. Über einen selektiven Transport über die Blut-Hirn-Schranke kann das Eintreten von essenziellen Nährstoffen wie Glucose, Ionen und Signalmolekülen sowie die Entsorgung von metabolischen Abfallprodukten kontrolliert werden. Wie bestimmte Moleküle die Blut-Hirn-Schranke passieren, hängt von der Art der gelösten Stoffe ab. Ein passiv ablaufender Transport ist nur für kleine nicht-polare Lipid-lösliche Moleküle und Gase, wie Sauerstoff (O₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂), über einen Konzentrationsgradienten möglich. Polare Moleküle gelangen durch die Interaktion mit Rezeptoren und Transportern über die Blut-Hirn-Schranke (Camandola & Mattson, 2017). In der Blut-Hirn-Schranke wird zwischen zwei Hauptfamilien von Transportern unterschieden: *ATP-binding cassette proteins* (ABC) und *solute carrier proteins* (SLC). ABCs arbeiten als aktive Transporter, welche ATP hydrolysieren, um Moleküle gegen ihren Konzentrationsgradienten zu transportieren. SLCs unterscheiden sich zwischen den Monocarboxylat-Transportern (MCTs) und den Glucose-Transportern (GLUTs). Die Aufnahme von Glucose über die Blut-Hirn-Schranke wird wie in allen Blutgefäßen über GLUT1 vermittelt. GLUT1 gewährleisten auch die Zufuhr von Glucose zu Astrozyten. GLUT3 sorgen für die Aufnahme von Glucose in Neuronen (Abb. 1). GLUT3 weisen eine höhere Glucose-Affinität und Transport-Kapazität für Glucose auf im Vergleich zu anderen GLUT-Isoformen. Dadurch wird sichergestellt, dass Neuronen eine konstante

Glucose-Zufuhr erhalten, auch wenn die Konzentration im Zwischenraum niedrig ist (Camandola & Mattson, 2017).

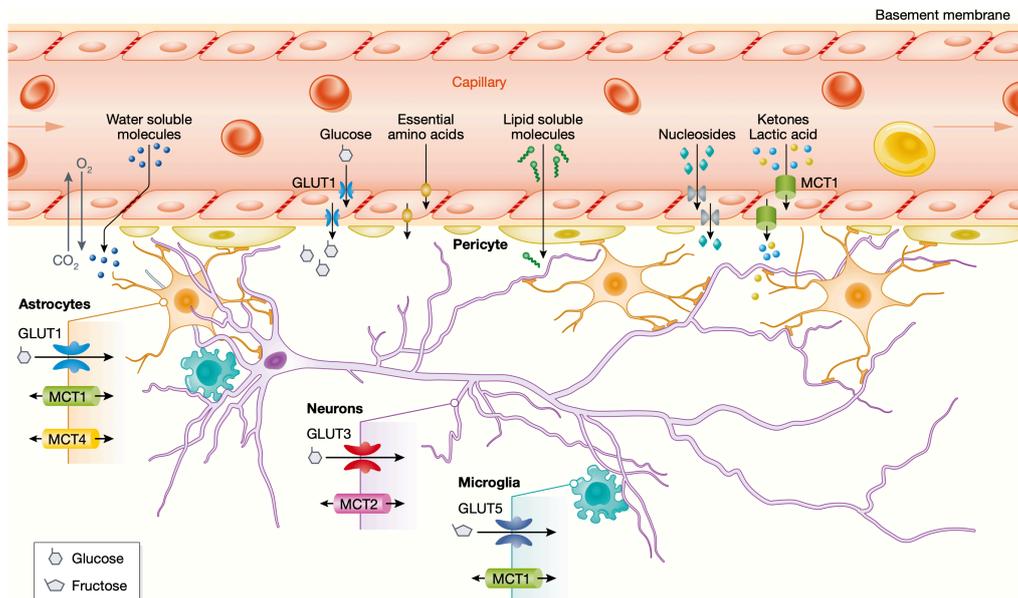


Abbildung 1 Transport von Nährstoffen über die Blut-Hirn-Schranke.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) besteht aus Endothel-Zellen, welche von einer Basalmembran umgeben sind, an welche sich Perizyten und Astrozyten anschließen. Enge Verbindungen zwischen den Endothelzellen limitieren die freie Diffusion. Kleine nicht-polare Gase und Lipide können über passive Diffusion über die BHS gelangen. Alle anderen Energieträger gelangen passiv oder aktiv über Transporter durch die BHS (Camandola & Mattson, 2017).

1.1.2 Glucose metabolisierende Wege in Neuronen

In Neuronen wird ein Molekül Glucose durch die Hexokinase (HK) in Glucose-6-Phosphat (G6P) konvertiert und im Cytosol weiter metabolisiert über den Pentose-Phosphat-Weg (PPP) oder die Glykolyse zu Pyruvat. Während der Glykolyse kommt es zur Reduktion von NAD^+ zu NADH und der Produktion von 2 Molekülen ATP pro Molekül Glucose. Der bevorzugte Weg des G6P-Metabolismus ist in Neuronen der PPP. Über den PPP wird aus G6P Ribulose-5-Phosphat (R5P) und reduziertes NADPH produziert. Das NADPH kann verwendet werden, um freie Reaktive Sauerstoff-Spezies zu eliminieren. R5P kann durch die Konvertierung in Fructose-6-Phosphat (F6P) und Glyceraldehyd-3-Phosphat (G3P) wieder in die Glykolyse eingeschleust werden. Die lokalen Raten der Glucose-Verwertung werden durch die funktionelle Aktivität ATP-verbrauchender und ADP-erzeugender Reaktionen bestimmt. Denn der glykolytische Fluss wird, neben der HK, durch die Phosphofruktokinase 1 (PFK1) reguliert. Die PFK1 wird durch Metabolite, wie ATP, inhibiert, die mit einem hohen Energiestatus assoziiert werden und durch Metabolite,

wie ADP oder AMP, aktiviert. Das Gleichgewicht zwischen Glykolyse und PPP ist wichtig, da eine reine Verwertung von Glucose über die Glykolyse zu einer reduzierten Verfügbarkeit von NADPH und damit zu erhöhtem oxidativem Stress führen kann.

Das aus Glucose metabolisierte Pyruvat kann entweder über die Laktat-Dehydrogenase 1 (LDH1) in Laktat umgewandelt und aus den Zellen ausgeschleust werden oder aktiv in die Mitochondrien transportiert werden. In den Mitochondrien wird Pyruvat zum Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) metabolisiert. Acetyl-CoA wird im TCA-Zyklus einer Reihe enzymatischer Reaktionen unterzogen, wobei reduziertes NADH und FADH₂ gebildet wird. Das produzierte NADH und FADH₂ wird in der Elektronen-Transport-Kette (ETK) über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) oxidiert. Die aus dem Transfer von Elektronen über die Komplexe der ETK gewonnene Energie wird genutzt, um Protonen durch die innere Membran der Mitochondrien in den Intermembranraum zu transportieren. Der Protonenfluss zurück in die mitochondriale Matrix wird über die ATP-Synthase vermittelt, wobei ATP entsteht (Abb. 2). Bei der OXPHOS in der ETK entstehen unter O₂-Verbrauch etwa 30 Molekülen ATP pro Molekül Glucose, ein deutlich höherer ATP-Ertrag im Vergleich zur Glykolyse (Camandola & Mattson, 2017; Mergenthaler et al., 2013).

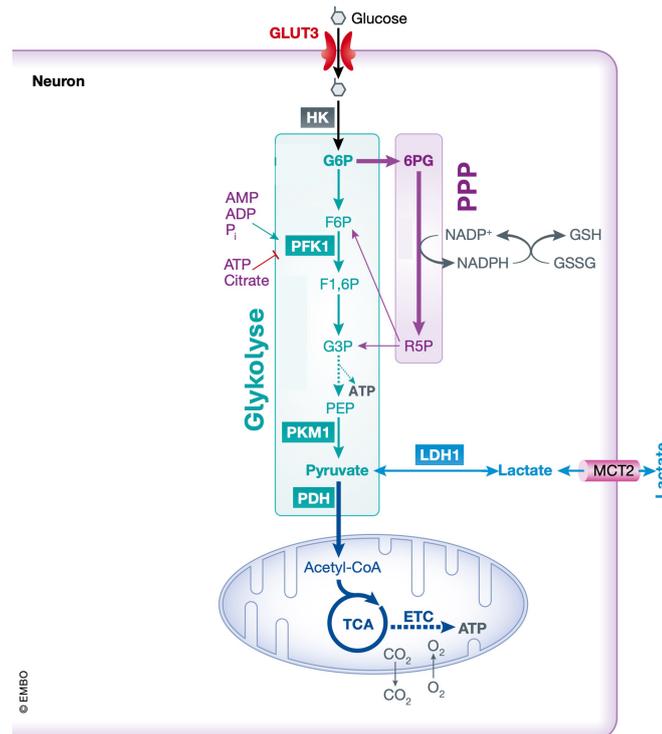


Abbildung 2 Glucose metabolisierende Wege in Neuronen.

Nach Aufnahme von Glucose in Neuronen wird Glucose über die HK irreversibel in G6P umgewandelt. G6P kann über die Glykolyse oder den PPP im Cytosol weiter zu Pyruvat metabolisiert werden. Während der Glykolyse werden 2 Moleküle ATP pro Molekül Glucose gebildet. Über den PPP wird NADPH produziert. Pyruvat kann dann über die LDH1 in Laktat umgewandelt werden und aus den Zellen ausgeschleust werden oder aktiv in die Mitochondrien transportiert werden. In den Mitochondrien wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches über den TCA-Zyklus metabolisiert wird. Das dabei entstandene NADH und FADH_2 wird dann in der Elektronentransport-Kette (ETC) über die OXPHOS zur Bildung von 30 Molekülen ATP pro Molekül Glucose verwendet, wobei O_2 verbraucht und CO_2 gebildet wird (verändert nach Camandola & Mattson, 2017).

Neben Glucose und Laktat/ Pyruvat dient die Aminosäure L-Glutamin zur Gewinnung von Energie. Unter bestimmten Bedingungen ist L-Glutamin in der Lage Glucose zu kompensieren, um die Funktionen des TCA-Zyklus aufrechtzuerhalten. L-Glutamin gelangt in die Zelle und wird durch die mitochondriale Glutaminase 1 (GLS1) in L-Glutamat umgewandelt. Das L-Glutamat wird dann über eine Zwei-Stufen-Reaktion in α -Ketoglutarat konvertiert und in den TCA-Zyklus eingespeist, wo Oxalacetat und weiter Citrat gebildet werden können (Yang et al., 2014).

1.1.3 Abnormaler Glucose-Metabolismus und neurodegenerative Erkrankungen

Abnormalitäten des Glucose-Metabolismus wie ein gestörter Glucose-Transport oder eine reduzierte Umsetzung von Glucose führen zu pathophysiologischen

Veränderungen, welche zur Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen können.

Bei Diabetes mellitus, eine chronische Erkrankung des Stoffwechsels, führen verschiedene pathophysiologische Mechanismen, wie ein Insulin-Ungleichgewicht und eine Hypo- oder Hyperglykämie, zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen.

Ein Insulin-Ungleichgewicht, verursacht durch Insulin-Resistenz und dem damit einhergehenden Hyperinsulinismus bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, führt zu einer Dysregulation des Glucose-Transport über GLUTs und der Glucose metabolisierenden Wege, wie die Glykolyse und die OXPHOS. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Verfügbarkeit und Verstoffwechslung von Glucose, welches zur Beeinträchtigung der neuronalen Funktion, zum Neuronen-Verlust und langfristig zu der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führt (Zhang et al., 2023).

Die Insulin-Resistenz bei Diabetes mellitus hat einen erhöhten Blut-Glucose-Spiegel, Hyperglykämie, zur Folge. Ein erhöhter Blut-Glucose-Spiegel im Blut-Plasma wirkt sich direkt auf den Glucose-Spiegel im Gehirn aus. Denn der Gehirn-Glucose-Wert entspricht 20 bis 30 % des Blut-Plasma-Werts. Ab einem Blut-Glucose-Wert von mehr als 10 mM wird von einer Hyperglykämie gesprochen (Robertson et al., 2003). Beträgt also der Blut-Plasma-Wert bei einer Hyperglykämie zum Beispiel 22 mM Glucose sind im Gehirn etwa 7,5 mM Glucose nachweisbar. Unter normoglykämischen Bedingungen sind im Gehirn nur 2,1 mM Glucose und im Blut-Plasma 8 mM Glucose enthalten (Abi-Saab et al., 2002). Dadurch kann eine chronische Hyperglykämie den Glucose-Transport und/oder den Glucose-Metabolismus im Gehirn nachteilig verändern (Hwang et al., 2017). Zusätzlich stellt bei der Behandlung von Diabetes mellitus die Einstellung einer Normoglykämie mit gleichzeitiger Verhinderung des Auftretens einer Hypoglykämie, definiert als ein Blut-Glucose-Wert von unter 2,8 mM, eine große Herausforderung dar (Bonds et al., 2012; Papachristoforou et al., 2020).

Zu den bekannten Faktoren, welche zu der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen in diabetischen Modellen beiträgt, zählt Calcium. Unter Hypo- und Hyperglykämie konnte eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration festgestellt werden, welche zu Gedächtnisstörungen und neuronalen Schäden beitrug (Hauser & Cornelius, 1976; Huang et al., 2005; Li et al., 2022). Die starke Ansammlung von intrazellulärem Calcium beeinträchtigt die mitochondrialen Funktionen, welche zu synaptischen Dysfunktionen und damit zu neurodegenerativen Erkrankungen führt

(Cho et al., 2010). Des Weiteren konnten in diabetischen Modellen Dysregulationen der OXPHOS und des TCA-Zyklus in den Mitochondrien beobachtet werden. Ein reduzierter TCA-Zyklus und eine verminderte Proteinmenge von OXPHOS-Komponenten wie dem Komplex III und der ATP-Synthase resultieren in einer verringerten ATP-Produktion (Zhang et al., 2023). Durch die Abnahme der ATP-Produktion verändert sich das AMP/ ATP-Verhältnis, dass zur Aktivierung des zellulären Energiesensor AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) führt. Die Aktivierung der AMPK fördert das Zellüberleben über die Inhibition von apoptotischen Prozessen. In diabetischen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK zur Verbesserung neuronale Störungen beitrug (Entezari et al., 2022). Des Weiteren vermittelt die AMPK die Umstellung des Metabolismus. Dabei werden ATP-verbrauchende Prozesse inhibiert und Stoffwechselwege wie die Fettsäure-Oxidation oder die Glykolyse aktiviert (Tang et al., 2019). Neben dem gestörten Glucose-Transport konnte in diabetischen Modellen auch eine Dysregulation der Glykolyse, eine erhöhte Aktivität des Pentose-Phosphat-Weges und der G6P-Dehydrogenase (G6PD) festgestellt werden. Die dadurch erhöhte Bildung von NADPH führt im diabetischen Tiermodell zu einer erhöhten Produktion von Reaktiven Sauerstoff-Spezies über die NADPH-Oxidasen. Die gleichzeitig beobachtete erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen konnte Proteinschäden im Gehirn nicht verhindern (Zhang et al., 2023).

Unter extremen Bedingungen wie bei einem ischämischen Schlaganfall führt die Unterbrechung des Blutflusses zu einer reduzierten Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glucose. Dadurch kommt es zur Schädigung oder dem Absterben von Gehirnzellen. Die bei einem ischämischen Schlaganfall verursachten akuten Hirnschäden können zur Bildung von Proteinaggregaten, einem Ungleichgewicht der intrazellulären Calcium-Konzentration und der erhöhten Produktion Reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) führen. Diese Faktoren erhöhen das Risiko für die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (Ahsan et al., 2021; Jang et al., 2023).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass neben Calcium und der AMPK die Produktion Reaktiver Sauerstoff-Spezies eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen nach einem ischämischen Schlaganfall oder bei chronischer Diabetes mellitus spielt. Die Ursachen und Quellen der erhöhten

Produktion Reaktiver Sauerstoff-Spezies bei diesen Erkrankungen sind jedoch weitgehend unbekannt.

1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (RONS) sind freie Radikale, welche abgeleitet werden von molekularem Sauerstoff. Dabei entsteht zunächst Superoxid (O_2^-), welches als Vorläufer für eine Reihe weiterer Reaktionen dient. Superoxid entsteht als Nebenprodukt von zellulären Mechanismen, wie der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, oder enzymatisch. Superoxid kann dann entweder spontan über die Haber-Weiss-Reaktion zu einem Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot), katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder in der Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO) zu dem sehr starken Oxidationsmittel Peroxynitrit ($ONOO^-$) abgebaut werden. H_2O_2 wird oxidiert zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff über die Peroxidase und Katalase. In Konkurrenz zur Katalase steht die Myeloperoxidase (MPO), welche aus H_2O_2 und Chlorid (Cl^-) Hypochlorsäure (HOCl) bildet. Des Weiteren kann H_2O_2 über die Reaktion mit reduzierten Übergangsmetallen zu einem Hydroxyl-Radikal reagieren. Diese Reaktion wird Fenton-Reaktion genannt. $ONOO^-$ kann durch die Reaktion mit einem Hydrogen-Radikal (H^\cdot) in das stabile $HOONO$ umgebaut werden, welches dann schnell abgebaut wird zu einem Hydroxyl-Radikal und freien Stickstoff-Spezies (NO_2^\cdot) (Abb. 3) (Taverne et al., 2013; Zhang et al., 2003).

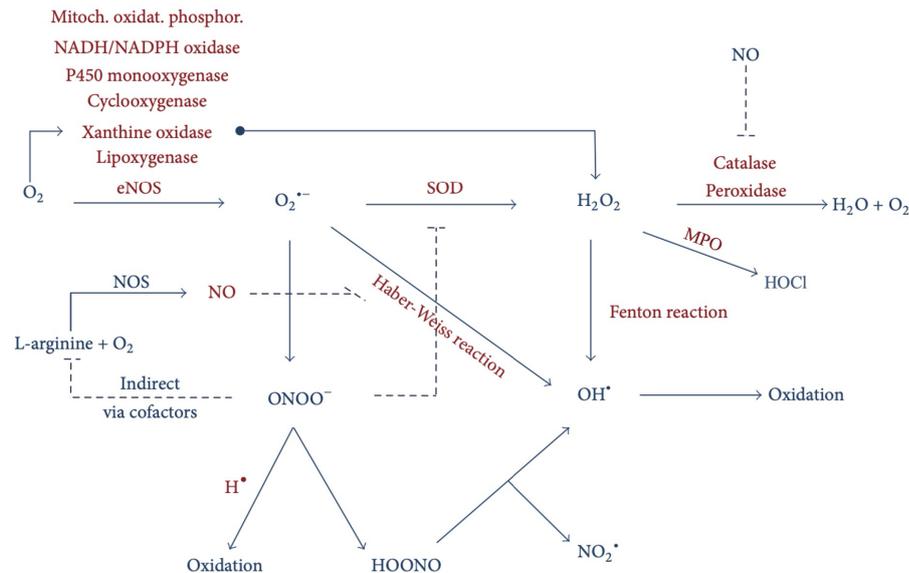


Abbildung 3 Bildung Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies.

O₂ kann enzymatisch oder als Nebenprodukt von zellulären Mechanismen zu O₂^{•-} umgewandelt werden. O₂^{•-} kann katalysiert über die SOD in H₂O₂ umgewandelt werden, spontan über die Haber-Weiss-Reaktion mit H₂O₂ ein OH[•] bilden oder in der Reaktion mit NO, produziert durch die NOS, ONOO⁻ bilden. H₂O₂ kann enzymatisch durch die Katalase und Peroxidase abgebaut werden zu H₂O + O₂ oder als Substrat für die MPO dienen, welche HOCl produziert. Über die Fenton-Reaktion wird H₂O₂ zu einem OH[•] (verändert nach Taverne et al., 2013).

1.2.1 Antioxidative Verteidigung

Die Bildung von RONS wird durch antioxidative Mechanismen eng kontrolliert, um das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht im Rahmen der zellulären Homöostase aufrecht erhalten zu können. Kommt es zu einer exzessiven Überproduktion von RONS oder einer Abnahme antioxidativer Enzyme kann dies zur Entstehung von oxidativem Stress führen.

Die primäre antioxidative Verteidigung stellt die Familie der Superoxid-Dismutasen dar, welche Superoxid durch die Umwandlung zum stabileren Wasserstoffperoxid eliminieren. Es existieren drei SOD-Isoformen, welche aufgrund ihrer zellulären Lokalisation unterschieden werden. Die im Cytosol lokalisierte Superoxid-Dismutase 1 (SOD1), die mitochondriale SOD2 und die extrazellulär vorkommende SOD3.

Glutathion (GSH), ein Antioxidant, welches überall im intra- und extrazellulären Raum exprimiert wird, liegt in reduzierter und oxidiert Form in Zellen vor. Wenn GSH reduziert vorliegt kann die Thiolgruppe des GSH ein reduziertes Äquivalent an instabile Moleküle wie RONS abgeben. Dadurch wird GSH reaktiv und reagiert mit einem anderen reaktiven GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG). Durch die Glutathion-Reduktase kann das GSH wieder reduziert werden, mit NADPH als Elektronendonator.

NADPH dient auch als Elektronendonator für andere antioxidative Prozesse wie das PRX/ TRX-System, welches H_2O_2 wegfängt, durch die Umwandlung in H_2O . NADPH dient neben der Aufgabe als Elektronendonator für antioxidative Systeme auch als Substrat für RONS-Quellen wie die NADPH-Oxidasen (Taverne et al., 2013; Ushio-Fukai et al., 2021).

1.2.2 Quellen Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies

Die Produktion von RONS findet entweder aktiv über spezifische Enzyme, wie die NADPH-Oxidasen, oder als Nebenprodukt von zellulären Mechanismen, wie der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, statt.

1.2.2.1 Mitochondrien

In Neuronen dient die oxidative Phosphorylierung der zellulären Energiegewinnung über die Produktion von ATP. Als ein Nebenprodukt dieses Prozesses entsteht Superoxid. Aufgrund der hohen metabolischen Rate von Neuronen entstehen große Mengen Superoxid in den Mitochondrien, so dass die mitochondriale OXPHOS als eine der Hauptquellen der ROS-Produktion gilt (Murphy, 2009). Die Bildung von Superoxid in Mitochondrien stammt von dem Austritt von Elektronen an den Komplexen I und III der Elektronentransportkette, was zur Reduktion von Sauerstoff und damit zur Bildung von Superoxid beiträgt. Es wird vermutet, dass etwa 0,2 bis 2 % des durch die Mitochondrien konsumierten Sauerstoffs Superoxid produziert (Madamanchi & Runge, 2007). Am Komplex I wird O_2^- durch die vermehrte Abgabe von Elektronen an Sauerstoff gebildet und in Richtung der mitochondrialen Matrix abgegeben. Am Komplex III erfolgt die Superoxid-Bildung durch den Verlust von Elektronen während der Reduktion von Ubichinon in Richtung des Intermembran-Raums und der mitochondrialen Matrix (Han et al., 2003; Madamanchi & Runge, 2007; St-Pierre et al., 2002; Zoccarato et al., 2007). Das gebildete Superoxid wird schnell abgebaut zu H_2O_2 , entweder durch die SOD2 in der mitochondrialen Matrix oder durch die im Cytoplasma lokalisierten SOD1 (Abb. 4). H_2O_2 ist stabiler als O_2^- wodurch die H_2O_2 -Konzentration in den Mitochondrien 100-fach höher liegt als die O_2^- -Konzentration. Das in den Mitochondrien gebildete H_2O_2 kann über die äußere mitochondriale Membran gelangen und als Signalmolekül fungieren. Neben der Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2 kann das mitochondrial gebildete O_2^- , welches aufgrund seiner elektrophilen Eigenschaft in den Mitochondrien verbleibt, mit NO zu ONOO^-

reagieren und zu DNA-Schäden, Störung der mitochondrialen Integrität und irreversiblen Protein-Schäden führen (Madamanchi & Runge, 2007).

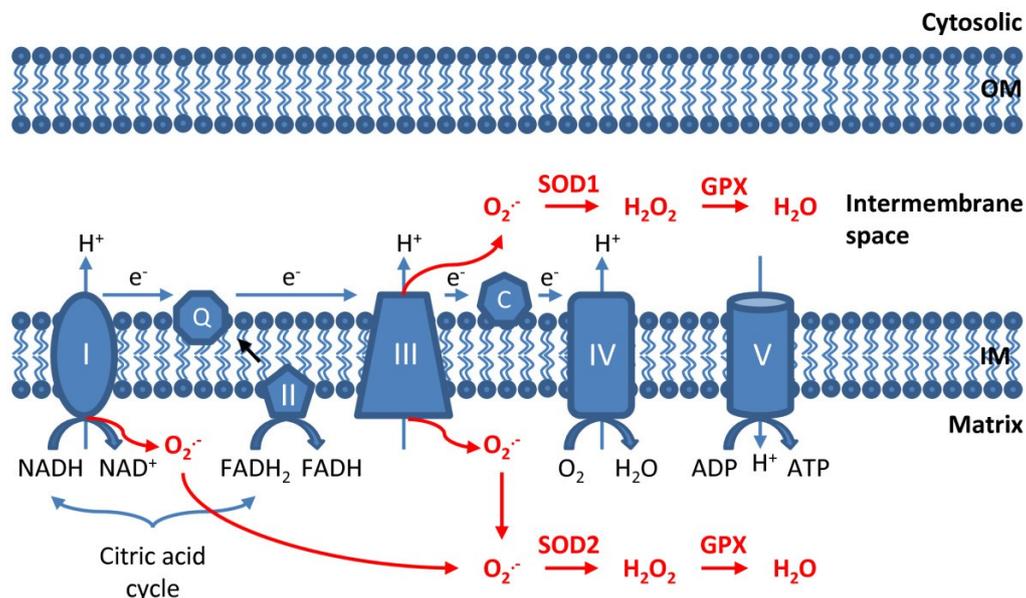


Abbildung 4 ROS-Produktion in Mitochondrien.

Elektronen (e^-) von NADH und $FADH_2$ gelangen über die ETK. Das Austreten von e^- am Komplex I und III führt zur Produktion von $O_2^{\cdot -}$. $O_2^{\cdot -}$ kann durch die SOD1 im Intermembran-Raum oder durch die SOD2 in der Matrix zu H_2O_2 umgewandelt werden. Durch die Glutathion-Peroxidase kann H_2O_2 zu H_2O abgebaut werden (Li et al., 2013).

1.2.2.2.1 Physiologische Funktionen mitochondrial produzierter ROS

Neben den pathophysiologischen Funktionen von mitochondrial produziertem $O_2^{\cdot -}$ oder H_2O_2 sind mitochondrial produzierte ROS (mtROS) wichtig für die zelluläre Homöostase, da sie über Signalwege die Adaptation der Zellen unter Stress gewährleisten. MtROS regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie die Zell-Proliferation, Apoptose oder die Calcium-Homöostase (Zhang et al., 2022). Unter anderem aktivieren mtROS den Energiesensor AMPK unabhängig vom zellulären AMP/ ATP-Verhältnis indirekt über die Hochregulation von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-Gamma-Coaktivator (PGC)-1 α -abhängigen Expression von antioxidativen Enzymen. Dadurch kann wiederum die mitochondriale ROS-Produktion gehemmt werden. Des Weiteren reguliert die mitochondriale ROS-Produktion den Prozess der mitochondrialen Dynamik und umgekehrt (Ushio-Fukai et al., 2021). Die mitochondriale Dynamik beinhaltet koordinierte Zyklen von mitochondrialer Fusion und Teilung, um sich morphologisch an den zellulären Energiestatus anzupassen (Mikhail et al., 2023). Zum Beispiel kann es bei einer Hyperglykämie, induziert durch Diabetes mellitus, zu einer erhöhten Teilung von Mitochondrien und dadurch zu einer

übermäßigen Produktion von ROS in den Mitochondrien kommen (Wang et al., 2023). Eine übermäßige ROS-Produktion kann wiederum die mitochondriale Fragmentierung weiter fördern. Eine physiologische H_2O_2 -Konzentration wirkt hingegen stimulierend auf die mitochondriale Fusion, wodurch die OXPHOS gefördert wird (Ushio-Fukai et al., 2021; Wang et al., 2023).

1.2.2.2 NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen (NOX) sind membrangebundene enzymatische Komplexe, welche aktiv Elektronen über die Membran transportieren, um Sauerstoff zu Superoxid zu reduzieren. Neben Mitochondrien gelten NOX als Hauptquelle der RONS-Produktion. Die Besonderheit der NOX ist, dass sie als ihre einzige und primäre Aufgabe Superoxid produzieren (Lambeth, 2004). Es existieren sieben NOX-Isoformen (NOX) 1-5 und Duale Oxidase (DUOX) 1 und 2, welche sich im aktiven Zustand aus verschiedenen Untereinheiten (UE) zusammenlagern. Der allgemeine Aufbau der NOX-Isoformen ist ähnlich und besteht aus einer am äußeren C-Terminus vorkommenden NADPH-Bindestelle, einer FAD-bindenden Region, sechs α -helikalen Transmembrandomänen (TMD) und vier hochkonservierten Häm-bindenden Histidinen, welche sich an der dritten und fünften TMD der NOX und an der vierten und sechsten TMD der DUOX befindet. DUOX1 und 2 besitzen eine zusätzlich TMD (Abb. 5) (Bedard & Krause, 2007). Die aus den sechs TMD bestehende UE der NOX2 wird als gp91^{phox} bezeichnet. NOX2 gilt als „Prototyp“ der NOX, da es als erste NOX-Isoform entdeckt wurde und dadurch am besten untersucht ist (Kawahara et al., 2007).

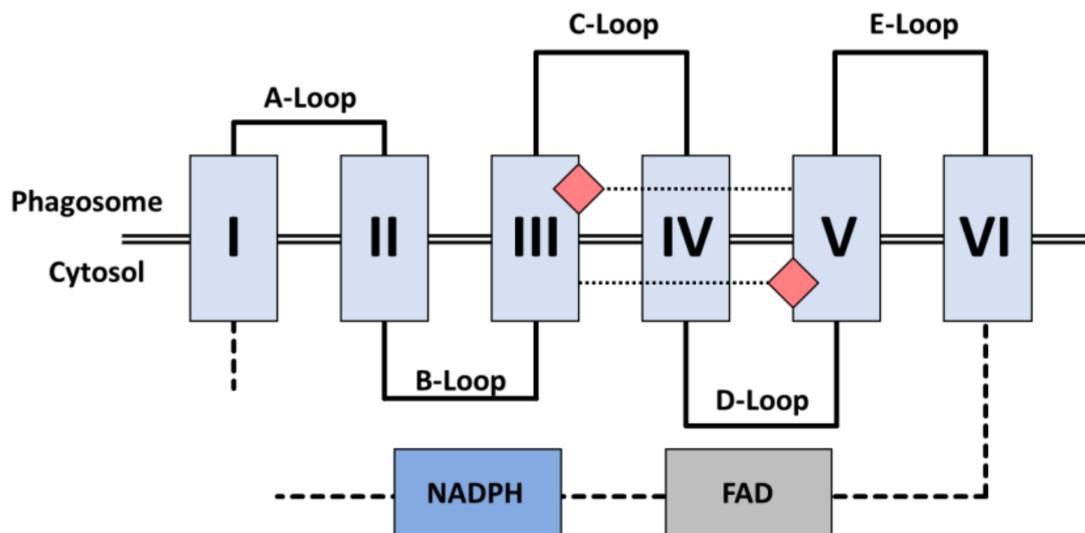


Abbildung 5 Struktur der Kern-Untereinheiten der NOX.

Alle NOX-Isoformen bestehen aus einer NADPH-Bindestelle am äußersten C-Terminus, einer FAD-bindenden Region, sechs α -helikalen TMD (I-VI) und vier Häm-bindenden Histidinen, welche sich hier an der dritten und fünften TMD befinden (Vermot et al., 2021).

NOX2 werden aktiviert durch das Zusammenlagern der komplexbildenden Untereinheiten (UE) (Abb. 6). Dazu gehören die membrangebundene UE $p22^{\text{phox}}$, welche mit $gp91^{\text{phox}}$ verbunden ist und für Stabilität sorgt sowie die cytosolischen UE $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ und die GTPase Rac1. Während der Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung von $p47^{\text{phox}}$, welches zu einer Konformationsänderung führt und die Interaktion mit $p22^{\text{phox}}$ erlaubt. $p47^{\text{phox}}$ als Organisierer-Einheit vermittelt die Translokation der cytosolischen UE zur Membran. Die Lokalisation von $p47^{\text{phox}}$ an der Membran erlaubt den Kontakt der Aktivator-Einheit $p67^{\text{phox}}$ mit $gp91^{\text{phox}}$ und bringt die kleine UE $p40^{\text{phox}}$ in den Komplex. Die GTPase Rac kann dann über einen Zwei-Stufen-Mechanismus, welcher zuerst eine Interaktion mit $gp91^{\text{phox}}$ und anschließend eine Interaktion mit $p67^{\text{phox}}$ umfasst, mit NOX2 interagieren. Sobald die Zusammenlagerung von NOX2 abgeschlossen ist, produziert der Komplex Superoxid, indem ein Elektron von NADPH auf Sauerstoff übertragen wird (Bedard & Krause, 2007) (Abb. 6).

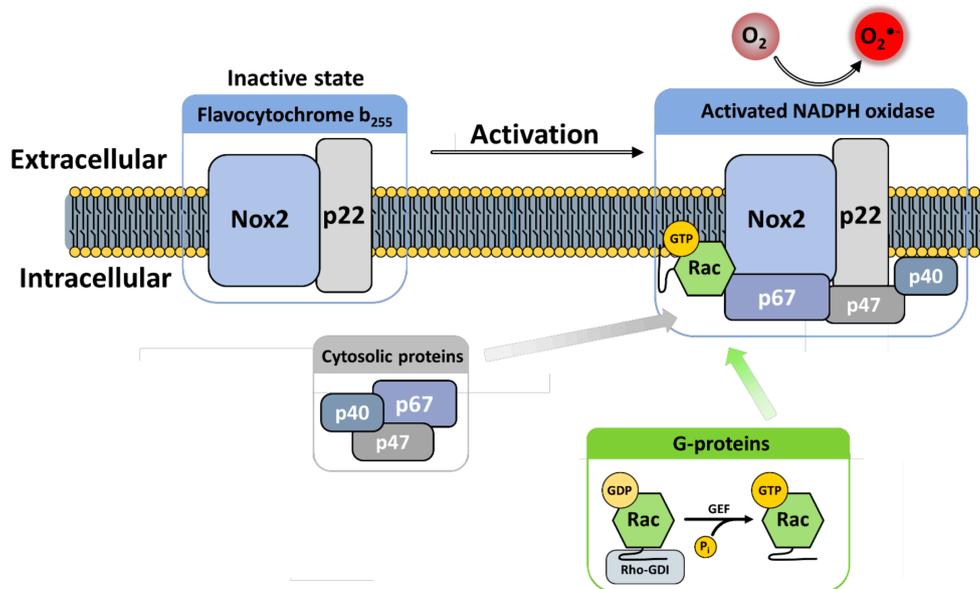


Abbildung 6 Aktivierungsmechanismus der NOX2.

In der Membran sitzen die NOX2-UE gp91^{phox} und p22^{phox}. Eine Phosphorylierung der cytosolischen Organisator-Einheit p47^{phox} leitet die Translokation der cytosolischen UE zur Membran ein und stellt den Kontakt der Aktivator-Einheit p67^{phox} und p40^{phox} mit gp91^{phox} her. Über einen Zwei-Stufen-Mechanismus interagiert die GTPase Rac mit NOX2. Nach Abschluss der Zusammenlagerung produziert NOX2 O₂⁻ (Vermot et al., 2021).

NOX1 und NOX3 sind wie NOX2 p22^{phox}-abhängige Enzyme, welche durch die Zusammenlagerung der membrangebundenen mit den cytosolischen UE aktiviert werden. NOX1 und NOX3 bestehen aus NOXO1, die Organisierer-UE, und NOXA1, als Aktivator-UE. Die NOX-Isoformen NOX1 und 3 sind aber auch in der Lage die UE p47^{phox} und p67^{phox} der NOX2 zu binden (Bedard & Krause, 2007; Vermot et al., 2021). Die Aktivität der FAD-Domäne und das Binden der cytosolischen UE der NOX1-3 kann durch die Phosphorylierung der Organisierer-Einheit, p47^{phox} oder NOXO1, durch Kinasen, wie die Protein-Kinase C (PKC), gesteigert werden (Bedard & Krause, 2007; Cheng et al., 2004; Raad et al., 2009). Einige der anderen NOX-Isoformen zeigen abweichende Aktivierungsmechanismen zu NOX2. NOX4 wird vermutlich über seine Expression reguliert und gilt als konstitutiv aktiv (Altenhöfer et al., 2015). Zusätzlich könnte die konstitutive Aktivität der NOX4 durch Co-Lokalisation von Aktivierungsfaktoren wie dem *Polymerase-δ Interacting Protein 2* (Poldip2) reguliert werden (Vermot et al., 2021). Die Aktivierung der DUOX1 und 2 sowie von NOX5 erfolgt durch einen Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels. NOX5 besitzen N-terminal vier und DUOX1 und 2 zwei EF-Hände über welche Calcium gebunden und die Enzyme aktiviert werden können (Bánfi et al., 2004) (Abb. 7).

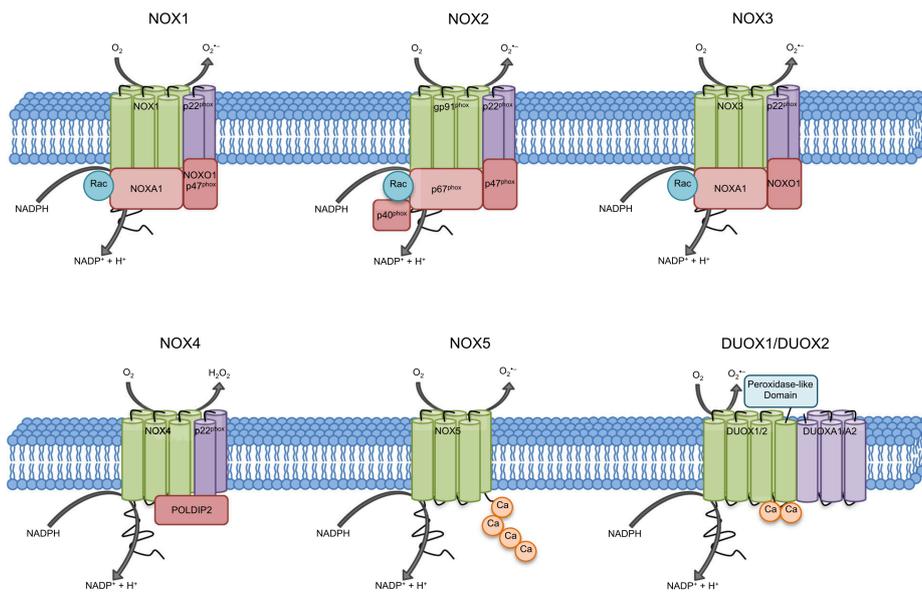


Abbildung 7 Regulatorische Untereinheiten der NOX-Isoformen.

Dargestellt wurden NOX1-5 und DUOX1 und 2. NOX1-3 werden aktiviert durch die Zusammenlagerung der Komplex-bildenden UE. NOX4 gilt als konstitutiv aktiv. NOX5, DUOX1 und 2 werden durch den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert (Ma et al., 2017).

NOX sind in der Plasmamembran und internen Membranen wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien lokalisiert. Im menschlichen Gehirn werden die NOX-Isoformen NOX2, 4 und 5 exprimiert und spezifisch in Neuronen kommen NOX1, 2, 3 und 4 vor (Belarbi et al., 2017; Terzi & Suter, 2020).

1.2.2.2.1 Physiologische Funktionen NOX-produzierter ROS

NOX-produzierte ROS können als *second messenger* in verschiedene Signalwege eingreifen und sind somit an der Regulation physiologischer Prozesse wie dem Zellwachstum oder der Apoptose beteiligt (Purisai et al., 2007; Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2018). Die kontrollierte ROS-Produktion durch NOX deutet auf die Fähigkeit hin, dass diese Enzym-Familie schnell und spezifisch auf zelluläre Stimuli reagieren kann (Quinn & Gauss, 2004). Dabei entspricht der Mechanismus der NOX-produzierten ROS nicht dem traditionellen Weg der Bindung an Rezeptoren, sondern der Oxidation von Cystein-Resten von Enzymen, wodurch ihre Aktivität moduliert wird (Bedard & Krause, 2007). Zum Beispiel kann der zelluläre Energiesensor AMPK als ein Redox-sensitives Protein unabhängig von dem zellulären AMP/ ATP-Verhältnis durch oxidative Modifikationen durch NOX-produzierte ROS aktiviert werden (Xie et al., 2006; Zmijewski et al., 2010). Durch verminderte Phosphorylierung der p47^{phox} UE der NOX sorgt die AMPK wiederum für eine Inhibition des Aktivierungsprozesses der

NOX. Des Weiteren können NOX-produzierte ROS Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase, ein weiteres System zur zellulären Kommunikation, nehmen. Dies wird vermittelt über post-translationale Modifikationen, wie Cystein-Oxidation oder S-Glutathionylierung, von Calcium-Pumpen oder -Rezeptoren oder der Depolarisation der Membran über Elektronentransfer. NOX-produzierte ROS regulieren Plasmamembran-gebundene Calcium-Ionen-Transporter, intrazelluläre Calcium-Kanäle und Calcium-ATPase-Pumpen. Auf spannungs-abhängige Calcium-Kanäle (VGCC) wirken ROS sowohl aktivierend als auch inhibierend. Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) werden durch Superoxid inhibiert und die intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum sitzenden Ryanodin-Rezeptoren (RyR) können durch ROS aktiviert werden. Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) werden von ROS in Abhängigkeit ihrer Konzentration reguliert. In einer niedrigen Konzentration wirken RONS über S-Glutathionylierung stimulierend auf Calcium-ATPase-Pumpen und bei einer hohen RONS-Konzentration kommt es zu einer irreversiblen Thiol-Oxidation, die zu einer Inaktivierung der Calcium-ATPase-Pumpen führt (Favero et al., 1998; Vermot et al., 2021).

1.2.2.3 weitere enzymatische RONS-Quellen

Neben den NADPH-Oxidasen gibt es im Gehirn noch weitere enzymatische Quellen für die Produktion von RONS, wie die Xanthin-Oxidase, die Stickstoffmonooxid-Synthase oder die Myeloperoxidase.

Die Xanthin-Oxireduktase katalysiert die Konversion von Hypoxanthin zu Xanthin oder von Xanthin zu Harnsäure. Die Xanthin-Oxireduktase kommt in zwei Formen vor. Der Xanthin-Dehydrogenase, welche NAD⁺ als Co-Faktor benötigt, oder die Xanthin-Oxidase (XO), welcher Sauerstoff zur Bildung von Superoxid verwendet. Die beiden Formen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur in der Schleife des aktiven Zentrums und der Schleife, welche die FAD-Domäne enthält (Shibuya et al., 2021). Die Superoxid-Produktion durch die XO macht unter physiologischen Bedingungen nur einen kleinen Teil der RONS-Produktion aus. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird davon ausgegangen, dass die XO schädliche Prozesse vermittelt über die Reaktion mit Purin-Substraten und molekularem Sauerstoff (Beckhauser et al., 2016).

Die Stickstoffmonooxid-Synthase (NOS) katalysiert die Produktion von NO durch die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin. Die Aktivität der NOS benötigt NADPH und

Sauerstoff als Co-Faktoren (Griffith & Stuehr, 1995). In Neuronen wird die NOS-Isoform nNOS exprimiert. Der Hauptregulator dieser NOS-Isoform ist die intrazelluläre Calcium-Konzentration über das Calcium-bindende Protein Calmodulin. NOS wird vollständig aktiviert durch die Interaktion mit Calmodulin. Die aus der Aktivierung der nNOS folgende Produktion von NO dient als kritisches Signal für die Modulation einer Vielzahl von zellulären Funktionen (Beckhauser et al., 2016).

Die Produktion von NO durch NOS kann sich auf andere enzymatische RONS-Quellen wie die Myeloperoxidase (MPO) auswirken. Die Myeloperoxidase ist ein Häm-Protein, welches die Produktion von HOCl über die Reaktion von H_2O_2 mit Cl^- katalysiert. Dadurch konkurriert die MPO mit der Katalase um das H_2O_2 , welches aus dem NOX-gebildeten O_2^- durch die SOD umgewandelt wurde. Das entstehende HOCl wirkt über die Oxidation auf verschiedene Biomoleküle und kann so unter anderem zur Erkennung von apoptotischen Material beitragen oder den intrazellulären Calcium-Spiegel beeinflussen. Die Aktivität der MPO wird durch die NO-Konzentration reguliert. NO reagiert mit dem Eisen-Zentrum des Häm-Proteins und verstärkt in einer niedrigen Konzentration die MPO-Aktivität und inhibiert die Aktivität mit steigender Konzentration. Ein Anstieg der H_2O_2 -Konzentration wirkt hingegen aktivierend auf die MPO-Aktivität. Die MPO wird intrazellulär aber auch im extrazellulären Raum von Neuronen sezerniert (Abu-Soud & Hazen, 2000; Chen et al., 2020; Ferdous et al., 2020; Zhang et al., 2003).

1.2.3 Produktion Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies unter gestörtem Glucose-Metabolismus

Die RONS-Produktion wird durch Störungen des Glucose-Metabolismus, in Form von Hypo- oder Hyperglykämie bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder im Extrem-Fall eines ischämischen Schlaganfalls durch Glucose-Entzug, gefördert. Dabei spielen eine erhöhte Aktivität glykolytischer Schlüsselenzyme, die Aktivierung von Kinasen, wie der PKC, des Pentose-Phosphat-Weges und damit der NADPH-Bildung, eine erhöhte mitochondriale oxidative Phosphorylierung und die Auto-Oxidation von Glucose eine Rolle (Chopra et al., 2012; González et al., 2023; Zhang et al., 2023) (Abb. 8).

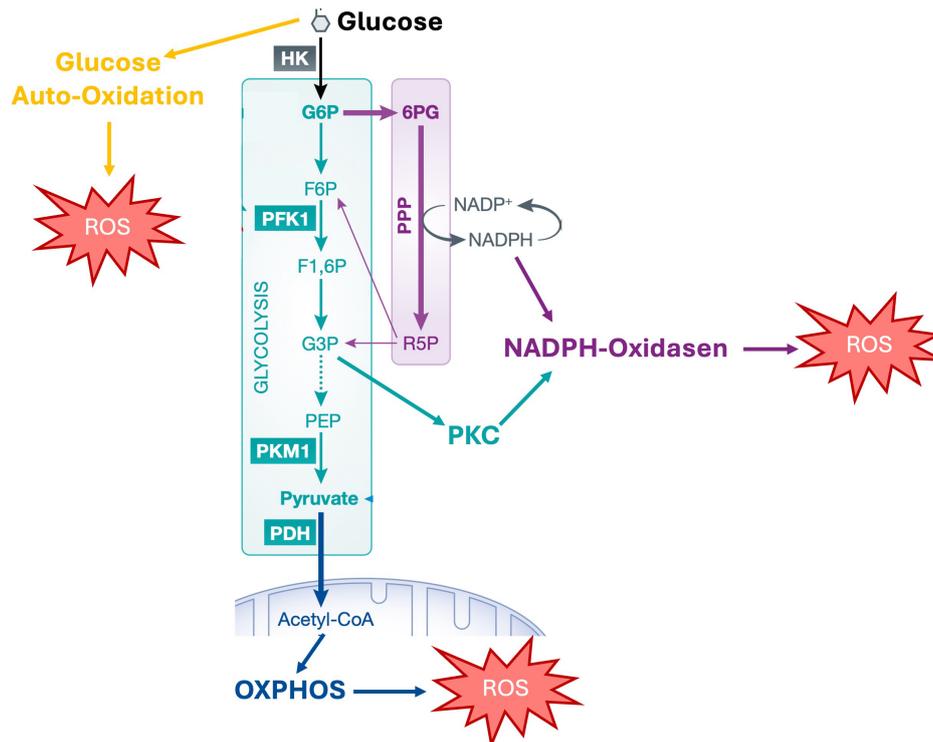


Abbildung 8 Glucose-Metabolismus und ROS-bildende Wege.

Schlüsselenzyme der Glykolyse und die Aktivierung des PKC-Signalweges (grün) sowie des Pentose-Phosphat-Weges und die NADPH-Bildung (lila) führen über die Aktivierung der NADPH-Oxidasen zur Produktion von ROS bei einem gestörten Glucose-Metabolismus. Über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) (blau) und die Auto-Oxidation von Glucose (gelb) können ROS bei einem gestörten Glucose-Metabolismus gebildet werden (verändert nach Bhardwaj & He, 2020; Camandola & Mattson, 2017).

Aufgrund der Funktion von RONS als Signalmoleküle und der daraus folgenden Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse hat eine Dysregulation der RONS-Produktion pathophysiologische Folgen. Dabei ist das Gehirn aufgrund seines hohen Sauerstoffverbrauchs, des großen Fettanteils und der geringen antioxidativen Aktivität besonders anfällig gegenüber einer veränderten RONS-Produktion (Albrecht et al., 2005; Dienel & Cruz, 2004). Aufgrund dessen stellt eine veränderte RONS-Produktion einen Risikofaktor für die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen in Folge von Diabetes mellitus oder ischämischen Schlaganfall dar. Dadurch steigt das Interesse an RONS-produzierende Quellen, um neue Therapie-Möglichkeiten zu entwickeln, die das Entstehen der neurodegenerativen Erkrankungen verhindern oder verlangsamen sollen.

Die Quellen der dysregulierten RONS-Produktion bei Hypo- und Hyperglykämie in Folge von Diabetes mellitus oder eines Glucose-Entzugs bei ischämischen Schlaganfall sind noch weitgehend unklar. Einige Studien konnten bei der Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen Szenarien eines gestörten

Glucose-Metabolismus bereits als Quellen, welche an der RONS-Produktion unter den jeweiligen Bedingungen beteiligt sein könnten, identifizieren.

Unter chronischer Hyperglykämie wurden neben einer erhöhten ROS-Produktion über die beiden Hauptquellen, den Mitochondrien und den NADPH-Oxidasen, in Zellkultur-Modellen eine erhöhte NO-Produktion über die neuronale NO-Synthase festgestellt. Diese Studien setzten jedoch meist unphysiologische Glucose-Konzentrationen ein (Bournival et al., 2012; Chopra et al., 2012; Mustapha et al., 2010; Ungvari et al., 2009). In Patienten und Tiermodellen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden, jedoch wurde hier eine erhöhte Aktivität der Myeloperoxidase entdeckt. Die Funktion der erhöhten Myeloperoxidase-Aktivität bleibt unklar, wurde aber auf eine erhöhte Ansammlung von Wasserstoffperoxid zurückgeführt, welches das Substrat der Myeloperoxidase darstellt (Zhang et al., 2004).

Die veränderte RONS-Produktion und ihre Ursachen wurden unter chronischer Hypoglykämie in der Literatur bisher deutlich seltener als hyperglykämische Bedingungen betrachtet, wobei meist nur kurzzeitige Auswirkungen nach wenigen Stunden untersucht wurden. Die Studien, welche die beteiligten Quellen an der RONS-Produktion unter kurzzeitiger Hypoglykämie untersuchten, kamen zu verschiedenen Ergebnissen. In den verwendeten Tiermodellen wurden sowohl eine erhöhte Aktivität der Mitochondrien als auch der NADPH-Oxidasen ermittelt, welcher durch eine Überexpression der SOD1 oder SOD2 entgegengewirkt werden konnte. Es wurde angenommen, dass die von diesen Quellen produzierten ROS an der Schädigung von zellulären Strukturen und Kompartimente sowie der Aktivierung verschiedener Signalwege beteiligt waren, die zum Zell-Verlust und neuronalen Beeinträchtigungen beitragen (Amador-Alvarado et al., 2014; Kajihara et al., 2017; McGowan et al., 2006; Suh et al., 2008). Nur eine Studie belegte die Beteiligung der NADPH-Oxidasen an der erhöhten RONS-Produktion unter langzeitiger Hypoglykämie im Tiermodell (Munhoz et al., 2016). In Zellkultur-Modellen konnte zwar in verschiedenen Studien eine erhöhte RONS-Produktion unter Hypoglykämie bereits festgestellt werden (Lamichhane et al., 2017; Li et al., 2022), jedoch konnten bisher keine konkreten Quellen identifiziert werden.

In der Literatur wird ein Entzug der Glucose am häufigsten als Modell für hypoglykämische Bedingungen in kultivierten Neuronen verwendet (Amador-Alvarado et al., 2014). Studien, die den kurzzeitigen Glucose-Entzug von einigen Stunden in Zellkultur-Modellen untersuchten, zeigten sowohl die Beteiligung der NADPH-

Oxidasen als auch der Mitochondrien bei der Regulation physiologischer Prozesse auf (Isaev et al., 2008; Páramo et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Die Verwendung unterschiedlichster Methoden und verschiedener metabolischer Bedingungen resultiert in widersprüchliche Ergebnisse und erschwert die Verknüpfung der bisher entdeckten Mechanismen. Ein Vergleich aller Szenarien eines gestörten Glucose-Metabolismus in einer Studie wurde bisher nicht durchgeführt.

2. Zielsetzung

Glucose ist die Hauptenergiequelle des menschlichen Gehirns. Kommt es daher zu Abnormalitäten des Glucose-Metabolismus, kann dies langfristig pathophysiologische Folgen wie die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen haben. Veränderungen des Glucose-Metabolismus treten zum Beispiel unter extremen Bedingungen wie bei einem Schlaganfall auf, wenn es zu einem Glucose-Entzug im Gehirn kommt, oder auch bei chronischen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus aufgrund von Hyper- oder Hypoglykämie. All diese Szenarien haben die Beteiligung von RONS an ihrer Pathophysiologie gemeinsam, jedoch wurde bisher der Fokus der Untersuchungen immer nur auf eines dieser Szenarien gelegt, weshalb die allgemeinen zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unklar sind.

Das Ziel der Arbeit ist es, die Einflüsse von Hyperglykämie, Hypoglykämie und Glucose-Entzug auf den Metabolismus, die RONS-Produktion und Funktionen vergleichend zu untersuchen. Dazu wurde die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH SY5Y, eine Modell-Zelllinie für neurodegenerative Erkrankungen, verwendet. Im ersten Szenario werden die Zellen entsprechend der klinischen Grenzwerte für die Glucose-Konzentrationen langfristig (24 oder 48 h) unter hypo-, normo- oder hyperglykämischen Bedingungen kultiviert. Im zweiten Szenario wird den Zellen kurzzeitig (30 min) die Glucose im Medium entzogen.

Nach den verschiedenen Szenarien werden die Auswirkungen auf die Energiegewinnungswege, OXPHOS und Glykolyse, mittels Seahorse ATP Rate Assay untersucht. Mit Hilfe von Antikörpern sollen die Lokalisation und die Menge verschiedener Komponenten des „RONS-Netzwerkes“, wie die NOX2, 3 und 5 sowie die MPO und SOD3, untersucht werden. Durch den Einsatz von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen für RONS und Inhibitoren der verschiedenen Komponenten des „RONS-Netzwerkes“ sollen die Auswirkungen der verschiedenen Szenarien auf die RONS-Produktion verglichen werden. Aufgrund der bekannten Zusammenhänge von Glucose, RONS und Calcium soll durch Acetylcholin-induzierte Depolarisierung der Zellen getestet werden, ob und wie sich die unterschiedlichen Szenarien auf die physiologischen Eigenschaften der SH SY5Y Zellen auswirken. Das Ziel dieser vergleichenden Untersuchung ist es den verschiedenen Szenarien der Glucose-Behandlung die entsprechenden Veränderungen des „RONS-Netzwerkes“ zuzuordnen.

3. Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acetylcholin (ACh)	Alfa Aesar, Kandel
Albumin-Standard, 2 mg/ mL	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Azid	Sigma Aldrich, München
3-Amino-4-hydroxybenzolsäure (4-AHBA)	Sigma Aldrich, München
10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red)	Cayman Chemicals, USA
Bacopaside II	Cayman Chemicals, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Capricorn Scientific, Ebersdorfergrund
Calciumchlorid (CaCl ₂)	VWR, Darmstadt
2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5- tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid	
Potassiumsalz (cPTIO)	Sigma Aldrich, München
CellLight Mitochondria-GFP, BacMam 2.0	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Dorsomorphin dihydrochloride (Compound C)	Santa Cruz Biotechnologies Inc., USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma Aldrich, München
Natriumdiethyl- Dithiocarbamattrihydrat (DDC)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Destilliertes Wasser (H ₂ O dest.)	ZChI, UdS Saarbrücken
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Grüssing GmbH, Filsum
2,7-Dichlorodihydrofluorescein (H ₂ DCFDA)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) <i>no glucose, no phenol red, no glutamine</i>	ThermoFisher Scientific, Schwerte

DMSO (Dimethylsulfoxid)	ZChI, UdS Saarbrücken
D-(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
1x Dulbecco´s PBS	PAA Cell Culture Company, Österreich
Ebselen	Cayman Chemicals, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	ZChI, UdS Saarbrücken
FCS (Fetal Calf Serum)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Fluo-4 AM	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Formaldehyd	ZChI, UdS Saarbrücken
Gentamycin	Sigma-Aldrich, München
Glucose Oxidase, <i>Aspergillus niger</i> , rekombinant	Merck, Darmstadt
Glutaminase	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	ZChI, UdS Saarbrücken
Immersol Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol	ZChI, UdS Saarbrücken
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Grüssing GmbH, Filsum
Lactatoxidase, <i>Aerococcus viridans</i>	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamat Oxidase	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
MitoSOX Red Mitochondrialer Superoxid Indikator	ThermoFisher Scientific, Schwerte
ML-090	Cayman Chemicals, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O)	Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover
NEAA <i>solution</i> (Non-essential Amino Acids) (100x)	Sigma-Aldrich, München
N _ω -Nitro-L-Arginin-Methylester- hydrochlorid (L-NAME)	Sigma-Aldrich, München
Nitrophenyl-Phosphat (NPP)	AppliChem, Darmstadt

<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Parafomaldehyd (PFA) (4 %)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin-Streptomycin (100 x) (P/S)	Sigma-Aldrich, München
Rotiophorese	Roth, Karlsruhe
Pyruvat Oxidase, <i>from microorganisms</i>	Sigma-Aldrich, München
Natriumodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Seahorse XF Calibrant Solution 500 mL	Agilent Technologies, USA
Seahorse XF DMEM, pH 7,4	Agilent Technologies, USA
Seahorse XF 1.0 M Glucose <i>solution</i>	Agilent Technologies, USA
Seahorse XF 200 mM L-Glutamine <i>solution</i>	Agilent Technologies, USA
Seahorse Oligomycin	Agilent Technologies, USA
Seahorse Rotenone + Antimycin A	Agilent Technologies, USA
Seahorse XF 100 mM Sodium Pyruvat <i>solution</i>	Agilent Technologies, USA
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich, München
Temed	AppliChem, Darmstadt
Tiron	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/ EDTA (1x)	Sigma-Aldrich, München
Tween20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (35 %)	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Puffer und Verbrauchslösungen

4-ABHA-Stammlösung	100 mM in 100 % DMSO
Amplex Red-Stammlösung	10 mM in 100 % DMSO
Amplex Red + HRP-Messlösung	5 µM Amplex Red 0,01 U/mL HRP in Hank´s Puffer (8 mM)
Bacopaside II-Stammlösung	1 mM in 100 % DMSO
BCA-Reagenz	50:1 (Reagenz A:Reagenz B)
Blocklösung (ELISA)	5 % BSA in PBSTriton (0,1 %)
Blocklösung (IHC)	10 % FCS in PBSTriton (0,5 %) ↑

3. Material & Methoden

Blocklösung (WB)	5 % Milchpulver in PBSTween (0,1 %) ↑
Blotpuffer	0,25 M Tris 0,2 M Glycin 20 % Methanol 0,025 % SDS in H ₂ O dest.
CaCl ₂ -Stammlösung	1,26 M CaCl ₂
Compound C-Stammlösung	500 µM in H ₂ O dest.
cPTIO-Stammlösung	10 mM in H ₂ O dest.
DDC-Stammlösung	10 mM in H ₂ O dest.
EDTA-Lösung	0,2 M EDTA
Glucose-Stammlösung	1 M D-(+)-Glucose-Monohydrat in H ₂ O dest.
Hank's Puffer (pH 7,4)	8000 mg NaCl (7,3 mM) 400 mg KCl (5,36 mM) 800 mg MgCl ₂ x 6 H ₂ O (8,4 mM) 900 mg Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (5,05 mM) 125 mg KH ₂ PO ₄ (6,6 mM) in 1 L H ₂ O dest.
Hank's Puffer (8 mM)	1,26 mM CaCl ₂ 8 mM Glucose in Hank's Puffer (pH 7,4)
HRP-Stammlösung für extrazelluläre H ₂ O ₂ -Messung	1 U/mL in Hank's Puffer (8 mM)
HRP-Stammlösung für Verbrauchsmessungen	10 U/mL in PB
H ₂ DCFDA-Stammlösung	10 mM in 100 % DMSO
H ₂ DCFDA-Messlösung	10 µM H ₂ DCFDA in Hank's Puffer (8 mM)
Homogenisierungspuffer	1x PBS +1 mM EDTA-Lösung

3. Material & Methoden

DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM)	5 % FCS 1 % P/S 105 µM Gentamycin 4 mM L-Glutamin 8,25 mM Glucose 2 mM Sodium Pyruvat 1 % NEAA in DMEM klar
DMEM klar (0,1 % FCS, 0 mM)	0,1 % FCS 1 % P/S 105 µM Gentamycin 4 mM L-Glutamin 2 mM Sodium Pyruvat 1 % NEAA in DMEM klar
DMEM klar (0,1 % FCS, 2 mM)	0,1 % FCS 1 % P/S 105 µM Gentamycin 4 mM L-Glutamin 2 mM Glucose 2 mM Sodium Pyruvat 1 % NEAA in DMEM klar
DMEM klar (0,1 % FCS, 16,5 mM)	0,1 % FCS 1 % P/S 105 µM Gentamycin 4 mM L-Glutamin 16,5 mM Glucose 2 mM Sodium Pyruvat 1 % NEAA in DMEM klar
Ebselen-Stammlösung	10 mM in 100 % DMSO
Eindeck-Medium (IHC)	Glycerin mit H ₂ O dest. (1:1) +Azid

3. Material & Methoden

10x Laufpuffer (pH 8,8)	0,25 M Tris 2 M Glycerin In H ₂ O dest.
5x Lämmli-Probenpuffer	500 mM Sammelgelpuffer 50 % Glycerin 100 mM DTT 10 % SDS 0,05 % Bromphenolblau in H ₂ O dest.
L-NAME-Stammlösung	100 mM in Hank's Puffer (8 mM)
MitoSOX Red-Stammlösung	2,5 mM in 100 % DMSO
MitoSOX Red-Messlösung	2,5 µM MitoSOX Red in Hank's Puffer (8 mM)
ML-090-Stammlösung	10 mM in 100 % DMSO
Na-Acetat-Puffer (pH 4,7; 25 mM)	25 mM Natriumacetat in H ₂ O dest.
Na-Citrat-Puffer (pH 6,0)	10 mM tri-Na-Citrat in H ₂ O dest.
Oligomycin-Stammlösung	150 µM in XF DMEM
Oligomycin-Arbeitslösung	15 µM in XF DMEM
Stammlösungen der Oxidasen	100 U/mL Glucose-Oxidase in PB 25 U/mL Laktat-Oxidase in PB 100 U/mL Pyruvat-Oxidase in PB
1x PBS	2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in H ₂ O dest.
1x PBS ↑	1x PBS 0,5 M NaCl
PBSTriton (0,1 %)	0,1 % Triton X-100 in 1x PBS
PBSTriton (0,5 %) ↑	0,5 % Triton X-100 in 1x PBS ↑
PBSTween (0,1 %) ↑	0,1 % Tween20 in 1x PBS ↑
Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) (PB)	77,5 mM Na ₂ HPO ₄ 22,5 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O dest.

3. Material & Methoden

Ponceau-Färbelösung	0,1 % Ponceau S 1 % Essigsäure in H ₂ O dest.
Reaktionsmix für Glucose	0,1 mM Amplex Red 0,2 U/mL HRP 2 U/mL Glucose-Oxidase in PB
Reaktionsmix für Laktat	0,1 mM Amplex Red 0,2 U/mL HRP 0,125 U/mL Laktat-Oxidase in PB
Reaktionsmix für L-Glutamat	0,1 mM Amplex Red 0,2 U/mL HRP 0,005 U/mL L-Glutamat-Oxidase in PB
Reaktionsmix für Pyruvat	0,1 mM Amplex Red 0,2 U/mL HRP 2 U/mL Pyruvat-Oxidase in PB
Rotenon + Antimycin A-Stammlösung	50 µM in XF DMEM
Rotenon + Antimycin A-Arbeitslösung	5 µM in XF DMEM
RxN-Puffer (pH 8,7)	12,1 g Trizma 0,23 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O in H ₂ O dest.
Sammelgelpuffer (pH 6,7)	0,5 M Tris 1 M HCl 0,4 % SDS in H ₂ O dest.
10 % Sammelgel	H ₂ O dest. Sammelgelpuffer Rotiphorese-Gel Temed 10 % APS

Solubilisierungslösung	Isopropanol + 0,3 % HCl + 10 % Triton X-100
Tiron-Stammlösung	100 mM in H ₂ O dest.
XF DMEM	8,25 mM Glucose 2 mM Pyruvat 4 mM L-Glutamine in Seahorse XF DMEM, pH 7,4
Substratlösung	7 mg NPP in 20 mL RxN-Puffer
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris 1 M HCl 0,4 % SDS in H ₂ O dest.
10 % Trenngel	H ₂ O dest. Trenngelpuffer Rotiphorese-Gel Temed 10 % APS

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Falkons (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one, Österreich
Glasdeck-Gläschen (24 x 15 mm)	Roth, Karlsruhe
Glasdeck-Gläschen (24 x 60 mm)	Roth, Karlsruhe
Glasplatten	AG Zoologie/ Physiologie, Saarbrücken
Klarsichtfolien	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, USA
Objektträger (26x76 mm)	Eprexia, USA
Papiertücher	ZChL, Universität des Saarlandes
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Silikon-Durchflussskammer	AG Zoologie/ Physiologie, Saarbrücken	UdS
<i>V3 PS cell culture microplates for XF96 analyzers</i>	Agilent Technologies, USA	
12-Well Silikonkammer	AG Zoologie/ Physiologie, Saarbrücken	UdS
Waagschalen	NeoLab, Heidelberg	
Whatman-Filterpapier	GE Healthcare, USA	
Western Lightning Chemiluminescence ECL HRP Substrat	Biozym, Germany	
<i>XFe96 sensor cartridge</i>	Agilent Technologies, USA	
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht	
Zellkulturplatten durchsichtig (96-Well)	Sarstedt, Nümbrecht	
Zellkulturplatte schwarz (96-Well)	ThermoFisher Scientific, Schwerte	

3.1.4 Geräte

AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet, USA	
<i>Axiovert 200M Fluorescence DIC Phase Contrast Inverted Mikroscope</i>	Zeiss, Oberkochen	
Bechergläser (verschiedene Größen)	VWR, Darmstadt	
Voltcraft dps-4005pfc Labornetzgerät	GW Instek, Taiwan	
Zentrifuge 540R	Eppendorf, Hamburg	
<i>CO₂ water-jacketed incubator</i>	Nuaire, USA	
<i>Criterion Vertical Electrophoresis Chamber</i>	Bio-Rad, Germany	
DM IL LED Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar	
Einkanalpipetten (10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Brand, Wertheim	
Färbekästen für Objektträger	VWR, Darmstadt	
<i>GyroTwister 3D Laboratory Shaker</i>	Labnet, USA	
Invitrogen iBright CL750		
Geldokumentationssystem	ThermoFisher Scientific, Schwerte	
Laborglasflasche (1 L)	Schott Duran, Dänemark	
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen	

Mikroskop-Kamera R6 Retiga	Q Imaging, Kanada
Mikrotiterplattenreader Safire 2	Tecan, Schweiz
Mikrotiterplattenreader Spark	Tecan, Schweiz
Mini-PROTEAN Comb, Prep+1 well, 1.0 mm, 400 µl #1653361	Bio-Rad Laboratories Inc., Deutschland
Multikanalpipette (50 µL, 100 µL, 200 µL)	Brand, Wertheim
Multistepper-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Multistepper-Spitzen (10 µL, 50 µL)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Okular 20x (0.35)	Leica, Deutschland
Okular 40x (0.80)	Leica, Deutschland
Okular 63x (1.4)	Zeiss, Oberkochen
pH-Meter inoLab ph730	WTW, Weilheim
Power Source Netzgerät 300 V	VWR, Darmstadt
Präzisionswaage	Satorius, Göttingen
PZM-2000 Manueller Tisch mit Piezo Z-Achse Oberplatte mit PZM-C Controller	ASI, USA
Rührfisch	AG Zoologie/ Physiologie, Saarbrücken
Spatel	Roth, Karlsruhe
Ständer	AG Zoologie/ Physiologie, Saarbrücken
Sterilbank Calss II	Nuaire, USA
<i>TempController 2000-2</i>	PeCon, Erbach
Ultraschallprozessor VCX-130PB	Sonics & Materials Inc., USA
Vortex VX100	Labnet, USA
Wärmeschrank	Melag, Berlin
Wasserbad VWB2 (5 L)	VWR, Darmstadt
Weißlicht-LED-Mikroskop-Beleuchtung pE-300lite	CoolLED, UK
Weißlicht-LED-Mikroskop-Beleuchtung pE-4000	CoolLED, UK

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
AMPK α #2532	<i>rabbit</i>	Cell Signaling Technology	1:500 (ELISA)
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling Technology	1:500 (ELISA)
Rabbit mAb #2535			
Anti-NOX1 antibody (ab55831)	<i>rabbit</i>	abcam	1:500 (WB, ELISA)
Anti-gp91-phox (#07-024)	<i>rabbit</i>	Merck	1:500 (WB, ELISA) 1:100 (IHC)
Anti-NOX3 antibody (ab81864)	<i>rabbit</i>	abcam	1:500 (WB, ELISA) 1:200 (IHC)
Anti-NOX4, antibody produced in <i>rabbit</i> (hpa015475)	<i>rabbit</i>	Sigma-Aldrich	1:500 (WB, ELISA)
Anti-NOX5 antibody – C-terminal (ab191010)	<i>rabbit</i>	abcam	1:500 (WB, ELISA) 1:200 (IHC)
Anti-DUOX1 (H-9) (sc-393096)	<i>mouse</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500 (WB, ELISA)
Anti-DUOX2 (E-8) (sc-398681)	<i>mouse</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500 (WB, ELISA)
Anti-Myeloperoxidase antibody (ab45977)	<i>rabbit</i>	abcam	1:500 (IHC, ELISA)
SOD3 antibody (PA5-102904)	<i>rabbit</i>	Invitrogen	1:500 (IHC, ELISA)

3.1.5.1 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit-IgG- Peroxidase (A0545)	<i>goat</i>	Sigma-Aldrich	1:20.000 (WB) / 1:5.000 (ELISA)
Anti-Mouse-IgG- Peroxidase (A9044)	<i>rabbit</i>	Sigma-Aldrich	1:20.000 (WB) / 1:5.000 (ELISA)
Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	<i>goat</i>	Jackson ImmunoResearch	1:1.000 (IHC)

3.1.6 Zelllinie

SH SY5Y	Sigma Aldrich, München
---------	------------------------

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der SH SY5Y Zellen erfolgte in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C, 5 % CO₂ und 75 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator mit physiologischem *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 8,25 mM Glucose, 5 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 105 µM Gentamycin, 4 mM L-Glutamin, 2 mM Natrium Pyruvat und 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA). Es ist zu beachten, dass alle Lösungen, die mit vitalen SH SY5Y Zellen in Kontakt kommen zuvor in einem Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt werden. Das Zellkulturmedium wurde wie in Kronenberger et al. (2024) empfohlen, alle 48 h gewechselt, um eine stabile Nährstoffversorgung sicherzustellen. Zudem wurden die Zellen regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert, um eine gute Wachstumsdichte zu gewährleisten, da die SH SY5Y Zellen vorwiegend adhärent am Boden der Zellkulturflasche wachsen und eine zu hohe Zelldichte die Vitalität der Zellen beeinflusst. Daher wurde bei einem konfluenten Wachstum von 80 bis 90 Prozent die Zellen verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Dies geschah in der Regel alle zwei bis drei Tage. Dafür wurde das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und mit 4 mL Trypsin/ EDTA (0,05 %) ersetzt. Anschließend wurde für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsin löste als Serin-Protease die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab. EDTA schwächt als Kationenchelator Zell-Zell- bzw. Zell-Oberflächen-Interaktionen und führte so auch zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Durch leichtes Klopfen wurde zum Ablösen der Zellen beigetragen. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Kontrolle. Durch die Zugabe von Zellkulturmedium wurde die proteolytische Wirkung des Trypsins aufgehoben, da das im Medium enthaltene Fetale Kälber Serum (FCS) den Prozess stoppte. Die Mischung aus Medium und Trypsin/ EDTA wurde dann in ein 15 mL-Röhrchen überführt und bei 1100 rpm für drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 mL frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Vorhaben verdünnt und für Versuche ausgesät oder in eine neue Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

Wenn die Zellen auf Mikrotiterplatten, Deckgläschen oder Objektträgern ausgesät werden sollten, wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin/ EDTA abgelöst, resuspendiert und 50 µL Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau vermischt. Mit Hilfe von Trypanblau, als nicht-membrangängiger Farbstoff, wurden tote

Zellen ohne intakte Zellmembran angefärbt und vitale Zellen blieben ungefärbt, so dass die Anzahl vitaler Zellen in der Suspension bestimmt werden konnte. Es wurden 10 µL von der Färbemischung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt, um die genaue Zellzahl zu errechnen. Das berechnete Volumen für die benötigte Zellzahl wurde aus der Suspension entnommen, entsprechend verdünnt und in Mikrotiterplatten, auf Deckgläschen oder Objektträgern ausgesät. Die restliche Zellsuspension konnte dann verdünnt wieder in Kultur gebracht werden.

3.2.2 In-situ Zellzählung mittels BioTek Cytation 5 System

Um mögliche Auswirkungen der verschiedenen Glucose-Konzentrationen auf die Zell-Viabilität über den Behandlungszeitraum beurteilen zu können, wurde die Zellzahl mit Hilfe des Cytation 5 Systems (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) am Institut für Pharmazeutische Biologie der UdS in der AG von Prof. Dr. A. K. Kiemer quantifiziert. Die Proliferation der Zellen wird dabei mit einer automatisierten Mikroskopie mit konventioneller Mikrotiterplattendetektion verbunden und eine markierungsfreie Zellzählung im Hochkrankst-Hellfeld nachgewiesen.

Es wurden 30.000 SH SY5Y Zellen pro Well auf einer *V3 PS cell culture microplate for XF96 analyzers* ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die jeweilige Behandlung mit den unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen. Nach Ablauf des Behandlungszeitraums wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C ohne CO₂ im BioTek Cytation 5 inkubiert und neun automatisierte mikroskopische Aufnahmen pro Well getätigt. Anhand der neun zusammengesetzten mikroskopischen Aufnahmen wurde die Anzahl der Zellen pro Well mit Hilfe der Gen5 Software gezählt. Die Zellzahlen pro Well wurden als Microsoft Excel-Datei exportiert. Um die durchschnittliche Zellzahl der jeweiligen Behandlung auszuwerten, wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aller Zellzahlen einer Behandlungsgruppe berechnet.

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben in der Software OriginPro 2023b zwischen den hypo- oder hyperglykämischen Konzentrationen im Vergleich zur normoglykämischen Konzentration durchgeführt. Es wurde eine Korrektur in Bezug auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

3.2.3 Bestimmung von Proteinmengen mittels BCA Protein Assay

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Proben für den Western Blot erfolgte mittels BCA Protein Assay. Dafür wurden die SH SY5Y Zellen, welche auf einer 75 cm² Zellkultur-Flasche angewachsen waren, verwendet. Nach Abnehmen des DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) wurde zwei Mal mit 2 mL sterilem 1x Dulbecco's PBS gespült. Anschließend wurde 1 mL Trypsin/ EDTA (0,01 %) hinzugegeben und für drei Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 2 mL DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) hinzu pipettiert, die Zell-Suspension in ein 15 mL-Röhrchen überführt und bei 1100 rpm für drei Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zell-Pellet in 200 µL Homogenisierungspuffer resuspendiert. Nach dem Überführen der Zell-Suspension in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurden 14 Homogenisierungs-Beads aus Zirkoniumkeramikoxid (Fisher Scientific, Schwerte) hinzugegeben und 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurde eine Albumin-Standard-Reihe ausgehend von 2 mg/mL angesetzt und bei dem BCA Protein Assay mitgeführt. Es wurden 5 µL der Probe bzw. des Standards in eine durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden 25 µL PBSTriton (0,1 %) hinzugegeben sowie 100 µL des BCA-Reagenzes. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde eine Endpunkt-Messung am Mikrotiterplattenreader Spark von Tecan bei einer Absorption von 560 nm und einer Referenz von 800 nm durchgeführt.

Die in der Probe enthaltene Proteinmenge wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Dafür wurden die Mittelwerte der Absorptionen der Wells mit den verschiedenen Konzentrationen des Albumin-Standards gebildet und gegen die jeweilige Albumin-Konzentration in mg/mL aufgetragen. In die Standardkurve wurde dann eine lineare Trendlinie gelegt. Anhand der Steigungsformel der Trendlinie konnte die enthaltene Proteinmenge der Probe berechnet werden (Bsp. Abb. 9).

Das Zell-Lysat wurde dann in die für die Gelelektrophorese benötigten Konzentration bzw. Volumen verdünnt und aliquotiert und bei -40 °C eingefroren.

Beispiel-Rechnung: Steigungsformel: $y = 0,2129x + 0,0832$

OD-Wert der Zell-Lysat-Probe: $y = 0,36$

Auflösung nach x ergibt $x = (0,36 - 0,0832) / 0,2129 = 1,25 \text{ mg/mL}$

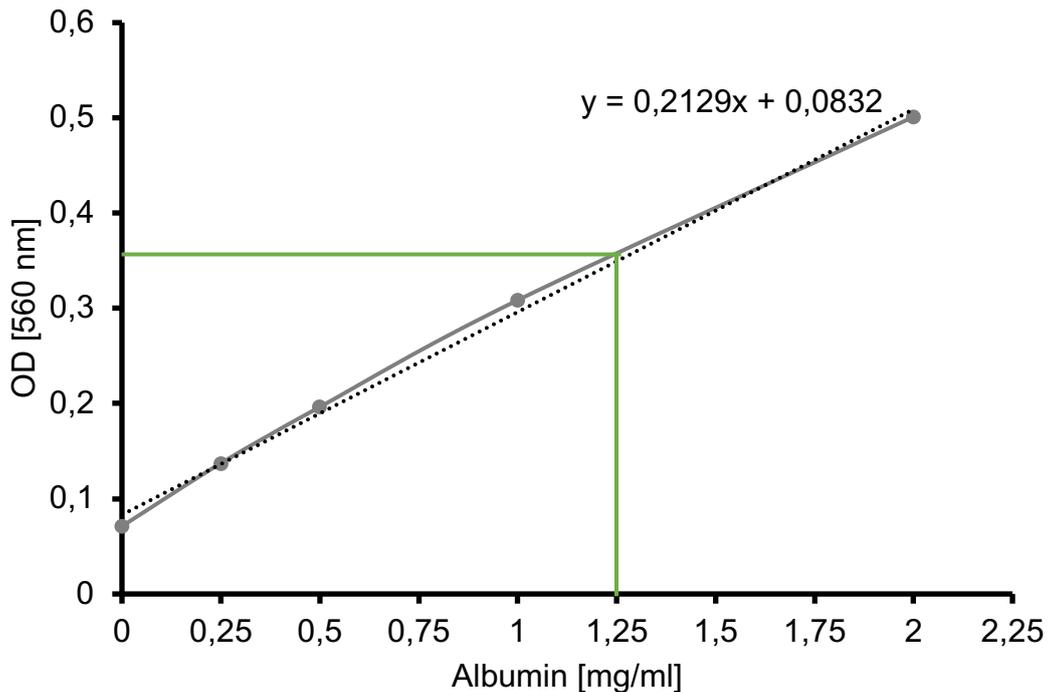


Abbildung 9 Beispiel zur Berechnung der Proteinmenge im Zell-Lysat.

Aufgetragen wurden die Absorptionswerte bei 560 nm gegen die Absorptionswerte der Konzentrationen des Albumin-Standards ausgehend von 2 mg/ mL. Die schwarz gestrichelte Linie stellt die Trendlinie mit der dazugehörigen Steigungsformel dar. Die grünen Linien markieren den OD-Wert einer Zell-Lysat-Probe mit einer optischen Dichte (OD) von 0,36. Mit Hilfe der Steigungsformel wurde eine Proteinkonzentration von 1,25 mg/mL berechnet (eigene Abbildung).

3.2.4 Proteinnachweis mittels Western Blot

3.2.4.1 Gelelektrophorese

Die über den BCA Protein Assay definierte Probe für einen Western Blot wurde am Tag der Durchführung der Gelelektrophorese aufgetaut und mit 5x Lämmli-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:4 vermischt. Die Probe wurde dann für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Um denaturierte DNA, welche nach dem Erhitzen der Probe auftreten kann, zu lysieren, wurde die Probe dreimal für 10 sec bei 130 Watt und 20 kHz beschallt mit Hilfe des VCX-130PB Ultraschallprozessor (Sonics & Materials Inc., USA).

Zur Auftrennung des Proteingemisches des Zell-Lysates wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden zwei Gele gegossen. Zunächst wurden die Glasplatten mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und diese anschließend in eine Vorrichtung eingeklemmt, so dass die Glasplatten unten abdichteten. Anschließend wurde das Trenngel (10 %) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und

mit destilliertem Wasser ausgespült. Daraufhin erfolgte das Gießen des Sammelgels (10 %) und das Einsetzen des Kamms mit einer Tasche für den Marker und einer 400 µL Tasche für die Probe. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde die Gelelektrophoresekammer vorbereitet. Dafür wurde die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt und das Gel in die Apparatur eingesetzt. Nach dem Entfernen des Kamms wurden die Taschen mit Laufpuffer ausgespült, um restliche Polymerisationsreste zu entfernen. Anschließend wurden 6 µL des *Prestained Protein Ladder Markers* (ThermoFisher Scientific, Schwerte) in die kleine Tasche vorgelegt, zum Mitführen eines Größenstandards. Die vorbereitete Probe (613 µg) wurde in einem Volumen von 240 µL in die große Tasche des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte dann bei einer Spannung von 125 V und einem Strom von 45 mA bei einer Laufzeit von 60 min. Es wurde darauf geachtet, dass die Lauffront des Lämmli-Probenpuffers noch auf dem Trenngel sichtbar war.

3.2.4.2 Blotten

Zum Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel geblottet. Dafür wurden eine Nitrocellulosemembran sowie sechs Whatman-Filterpapiere in Blotpuffer getränkt. Für den Transfer wurde dann die Membran anodenseitig auf das Gel gelegt und dies beidseitig mit dreimal Whatman-Filterpapier bestückt. Der Elektronentransfer erfolgte bei einer Spannung von 20 V, einem Strom von 400 mA und einer elektrischen Leistung von 8 W über einen Zeitraum von 60 min.

Die optische Kontrolle der erfolgreichen Übertragung der Proteine auf die Membran nach dem Blotten erfolgte über eine Ponceau-Färbung. Dafür wurde die Nitrocellulosemembran für fünf Minuten auf dem Schüttler in der Ponceau-Färbelösung inkubiert, und so die übertragenen Proteine vorübergehend angefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung mit destilliertem Wasser ausgewaschen und somit die Membran wieder entfärbt.

3.2.4.3 Antikörper-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden die freien Stellen für Proteinbindungen mit Blocklösung (5 % Milchpulver) für eine Stunde auf dem Schüttler blockiert, um das unspezifische Binden der Antikörper zu verhindern.

Anschließend wurde die Membran in Streifen eingeteilt, markiert und zurechtgeschnitten. Die einzelnen Streifen wurden dann in 15 mL-Röhrchen mit 3 mL

des entsprechenden primären Antikörpers gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des Sekundär-Antikörpers an den primären Antikörper (BLANK), wurden Streifen über Nacht nur mit Blocklösung inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die einzelnen Streifen einmal mit 1x PBSTween (0,1 %) ↑ gespült und anschließend dreimal fünf Minuten mit 1x PBSTween (0,1 %) ↑ gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation im jeweiligen Sekundär-Antikörper (Anti-IgG-Peroxidase-gekoppelt) für eine Stunde auf dem Schüttler. Danach wurden die Membranstreifen nochmals dreimal für fünf Minuten mit 1x PBSTween (0,1 %) ↑ gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Membranstreifen in einer Klarsichtfolientasche bündig nebeneinandergelegt und mit Chemiluminescence ECL-HRP-Substrat für eine Minute inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Lumineszenz der vorangegangenen Chemilumineszenz-Reaktion am Invitrogen iBright CL750 Geldokumentationssystem.

3.2.5 Protein-Quantifizierung mittels ELISA

Mit Hilfe eines indirekten *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden die einzelnen Isoformen der membrangebundenen NOX, das Verhältnis der AMPK zur Phospho-AMPK (pAMPK) sowie die MPO und SOD3 nach der Langzeitbehandlung der SH SY5Y Zellen mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen quantitativ bestimmt. Der Assay beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion und ermöglicht den Nachweis von Proteinen in einer Probe. Die Probe, hier die SH SY5Y Zellen, wird auf dem Boden einer Mikrotiterplatte fixiert. Dann wird ein primärer Antikörper hinzugegeben, welcher an das Antigen in der Probe bindet. An den primären Antikörper bindet ein sekundärer Antikörper, welcher an ein Enzym konjugiert wurde, welches mit dem hinzugegebenen, farblosen Substrat reagiert und zu einem Farbumschlag führt (Abb. 10). Anhand dieser Farbreaktion kann dann die relative Menge des jeweiligen Proteins ermittelt werden.

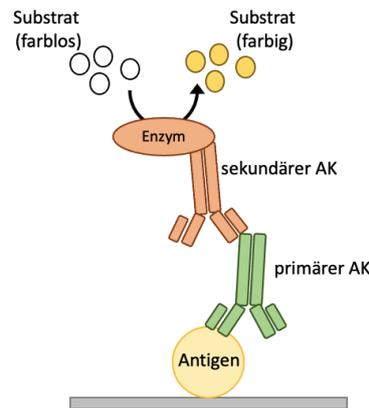


Abbildung 10 Schema eines indirekten ELISAs.

Ein primärer Antikörper (AK) bindet an das Antigen. Ein sekundärer Enzym-konjugierter Antikörper bindet an den primären Antikörper. Das farblose Substrat reagiert mit dem Enzym und führt zu einem Farbumschlag (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.5.1 Allgemeiner Versuchsablauf des ELISAs

SH SY5Y Zellen wurden auf einer durchsichtigen 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät in 100 μL klarem DMEM (5 % FCS, 8,25 mM) und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 inkubiert. Für die Quantifizierung der NOX-Isoformen, AMPK und pAMPK wurden 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Für die Quantifizierung der MPO wurden 15.000 Zellen pro Well und für die SOD3 20.000 Zellen pro Well verwendet. Diese Zellzahlen wurden gewählt, da diese im mittleren linearen Bereich der Quantifizierung des jeweiligen Antikörpers lagen (Anhang Tab. 21 bis 23). Am darauffolgenden Tag wurde eine optische Kontrolle der Morphologie der Zellen unter einem Durchlichtmikroskop durchgeführt und anschließend wurde das Medium abgenommen. Danach erfolgte die Behandlung mit DMEM klar (0,1 % FCS, 2 mM), DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) oder DMEM klar (0,1 % FCS, 16,5 mM) für 24 oder 48 h. Zur Fixierung der Zellen wurde anschließend das Behandlungsmedium abgenommen und 50 μL 4 % Paraformaldehyd (PFA) hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das PFA abgenommen und einmal mit PBSTriton (0,1 %) gespült und anschließend zweimal für fünf Minuten mit PBSTriton (0,1 %) gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Hilfe der Blocklösung (5 % BSA), welche für 30 min bei RT inkubiert wurde, blockiert. Der Blockpuffer konnte anschließend abgekippt werden. Es wurden 50 μL des jeweiligen primären Antikörpers hinzugegeben und über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper wurden einige Wells über Nacht nur mit Blocklösung inkubiert (BLANK). Am nächsten

Tag wurden die primären Antikörper bzw. die Blocklösung abgenommen und es erfolgte ein Spülschritt mit PBSTriton (0,1 %) sowie zwei Waschschriffe für fünf Minuten mit PBSTriton (0,1 %). Danach wurde der sekundäre Antikörper, gekoppelt an eine alkalische Phosphatase, der jeweiligen Spezies des primären Antikörpers in einem Volumen von 50 µL hinzugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut gespült und zweimal für fünf Minuten mit PBSTriton (0,1 %) gewaschen. Zur Quantifizierung wurden pro Well 200 µL Substratlösung der alkalischen Phosphatase pipettiert. Die Inkubationszeit der Substratlösung wurde an die vorkommende Menge der Proteine in den SH SY5Y Zellen angepasst. Die Inkubationszeit der Substratlösung für die Mikrotiterplatten der SOD3 betrug 1 h bei 37 °C. Für die NOX3, NOX5 und MPO wurden die Mikrotiterplatten mit der Substratlösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten der anderen NOX-Isoformen sowie die der AMPK und pAMPK wurden über Nacht bei 4 °C mit der Substratlösung inkubiert. Während der Inkubation der Substratlösung wurde diese durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase linear umgesetzt, wodurch bei verlängerter Inkubationszeit die Sensitivität erhöht werden konnte. Die Messung erfolgte am Mikrotiterplattenreader (Tecan Spark) bei einer Absorption von 405 nm und einer Referenz von 620 nm (Abb. 11). Die gemessenen Daten wurden im Microsoft Excel-Format mittels der Software Sparkcontrol V3.2 erhalten.

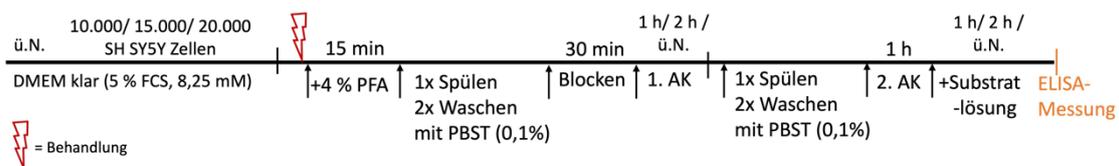


Abbildung 11 Allgemeiner Versuchsablauf des indirekten ELISAs.

Nach dem Aussäen der SH SY5Y Zellen erfolgte die Behandlung und die Fixierung der Zellen. Nach dem Spülschritt und den zwei Waschschriffen wurde blockiert und anschließend der primäre Antikörper (AK) über Nacht (ü.N.) inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut einmal gespült und zweimal gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper inkubiert wurde. Danach wurde die Substratlösung hinzugegeben und nach entsprechender Inkubation die Absorption gemessen (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.5.2 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Zur Berechnung der relativen Menge der getesteten Proteine wurde zuerst pro Well die Differenz aus den Messwerten der Absorption (405 nm) und der Referenz (620 nm) gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert der gebildeten Differenzwerte der Wells,

welche einen primären Antikörper (Abb. 12 Spalte 2-10) erhielten, berechnet. Alle Differenzwerte einer Mikrotiterplatte wurden dann auf diesen Mittelwert normiert. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den normierten Differenzwerten pro Behandlungsgruppe gebildet und in Prozent angegeben.

Für die Berechnung des Verhältnisses der pAMPK zur AMPK wurden zunächst die normierten Differenzwerte von je vier Wells pro Behandlungsgruppe gemittelt (Abb. 12 A-D bzw. E-H). Anschließend wurde jeweils ein gebildeter Mittelwert von vier Wells der pAMPK mit einem Mittelwert von vier Wells der AMPK dividiert (MW E-H/ MW A-D). Aus diesen berechneten Quotienten wurden dann die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für das Verhältnis der pAMPK zur AMPK berechnet und in Prozent angegeben.

		Behandlungsgruppen											
		∅	2 mM				8,25 mM			16,5 mM			∅
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
anti-AMPK	A												
	B												
	C												
	D												
anti-pAMPK	E												
	F												
	G												
	H												

Abbildung 12 Belegungsschema zur Bestimmung der Proteinmenge der AMPK und pAMPK mittels ELISA.

In die Wells der Reihen 1 und 12 einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde nur Medium hinein pipettiert. In den Reihen 2 bis 10 der Mikrotiterplatte wurden die SH SY5Y Zellen ausgesät und mit den Behandlungsgruppen mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen (2, 8,25, 16,5 mM) inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen erhielten die Wells A bis D den primären Antikörper gegen die AMPK und die Wells E bis H den primären Antikörper gegen die pAMPK. Die Reihe 11 wurde währenddessen ohne primären Antikörper (AK) und nur mit Blocklösung inkubiert (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben in der Software OriginPro 2023b durchgeführt. Die hypo- und

hyperglykämischen Glucose-Konzentrationen wurden gegen die normoglykämische Behandlungsgruppe statistisch verglichen. Es wurde eine Korrektur in Bezug auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Für die Quantifizierung der ROS-produzierenden Proteine wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit unabhängigen Stichproben mit einem Tukey post-hoc Test durchgeführt. Statistische Unterschiede sind mit Sternen markiert.

3.2.6 Immunhistologische Färbung

Um die subzellulären Lokalisationen der NOX-Isoformen NOX2, NOX3 und NOX5 sowie der SOD3 und der MPO in den SH SY5Y Zellen zu identifizieren, wurde eine immunhistologische Färbung durchgeführt. Dazu wurden 20.000 Zellen/Well auf Objektträgern mit 12-Well Silikonkammern (Abb. 13 A) in 100 μ L DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

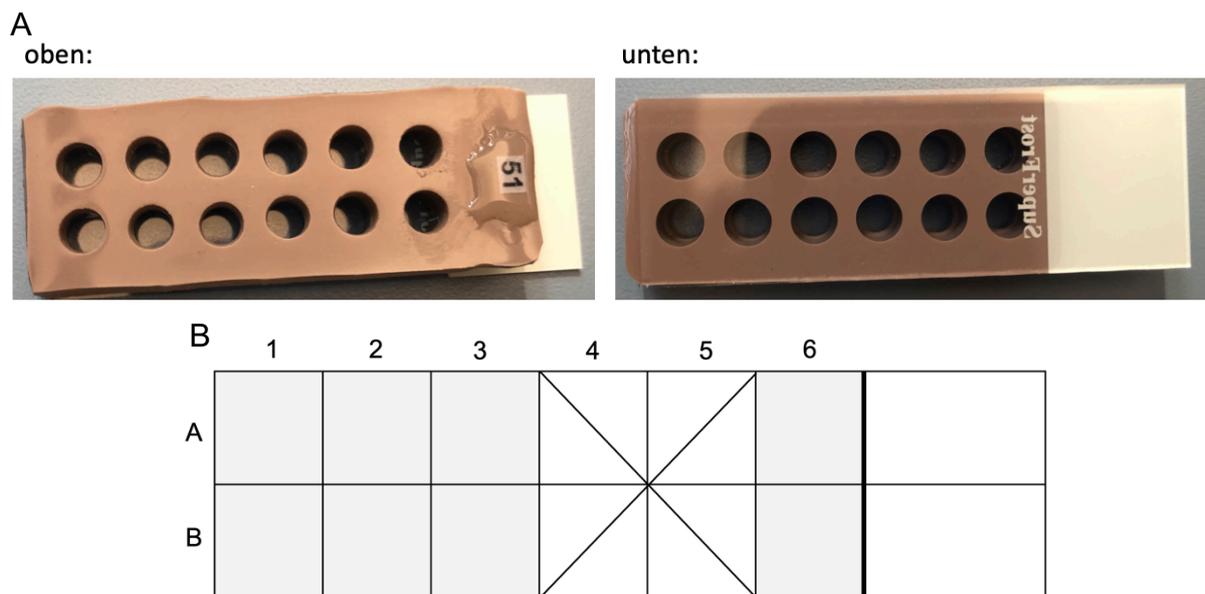


Abbildung 13 Beispiel einer 12-Well Silikonkammer.

A: Eine 12-Well Silikonkammer besteht aus 12 Löchern, mit jeweils der Größe eines Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte. In diesem Beispiel wurde ein Objektträger auf die Unterseite der Silikonkammer angebracht, auf welchem die SH SY5Y Zellen ausgesät werden können. Es können aber auch Glasdeckgläschen als Adhäsionsfläche für die Zellen verwendet werden. **B:** Belegungsschema einer 12-Well Silikonkammer. Die Reihen 4 und 5 werden nicht belegt und in die Reihen 1 bis 3 und 6 werden Zellen ausgesät (graue Flächen) (eigene Abbildung).

Vor der Verwendung der Silikonkammern wurden diese in 70 % Ethanol über Nacht gereinigt. Am nächsten Tag wurden die Silikonkammern mit destilliertem Wasser

abgespült und trocken gelassen. Anschließend konnte der Objektträger an der Unterseite der Silikonkammer mittels Adhäsionskraft angebracht werden.

Am Tag nach dem Aussäen der SH SY5Y Zellen wurde zunächst die Morphologie der Zellen im Durchlicht unter einem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde das Medium abgenommen. Zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurden 100 μL 4 %-iges Paraformaldehyd hinzugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Paraformaldehyd wurde dann gesondert entsorgt und die Silikonkammer von dem Objektträger vorsichtig abgezogen. Der Objektträger wurde in H_2O dest. gestellt, um das Austrocknen der Zellen auf dem Objektträger zu verhindern. Zum Demaskieren der Antigene wurden die Zellen für 10 min bei 90 bis 95 $^\circ\text{C}$ in Na-Citrat-Puffer abgekocht und 20 min bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Anschließend wurde für fünf Minuten in H_2O dest. gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden 500 μL Blocklösung, bestehend aus 10 % FCS in PBSTriton (0,5 %) \uparrow , auf die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur gegeben. Die Blocklösung wurde abgekippt und 400 μL des primären Antikörpers auf den Objektträger im Bereich der Reihen eins bis drei der Silikonkammer pipettiert. Auf den Bereich der Reihe sechs der Silikonkammer wurden 100 μL der Blocklösung auf den Objektträger pipettiert (BLANK), um die unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu identifizieren (Abb. 13 B). Der primäre Antikörper bzw. die Blocklösung wurden über Nacht bei 4 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen und dreimal für zwei Minuten mit PBSTriton (0,5 %) \uparrow gewaschen. Anschließend wurden 500 μL des sekundären Antikörpers, *Anti-rabbit-Cy3*, auf alle Wells mit Zellen pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal für zwei Minuten mit PBSTriton (0,5 %) \uparrow gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 50 μL Eindeck-Medium und einem Deckglas eingedeckt und mit durchsichtigem Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten am Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop von Zeiss in 630-facher Vergrößerung bei einer Exzitation von 554 nm und einer Emission von 566 nm (Abb. 14). Gesteuert wurde das Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software Slidebook 3Di. Für die Visualisierung der ROS-produzierenden Enzyme wurden *Z-Stacks* aufgenommen. Dazu wurde auf die Dendriten-ähnlichen Ausläufer fokussiert und in einem Bereich von 5 μm alle 0,36 μm ein Bild aufgenommen.

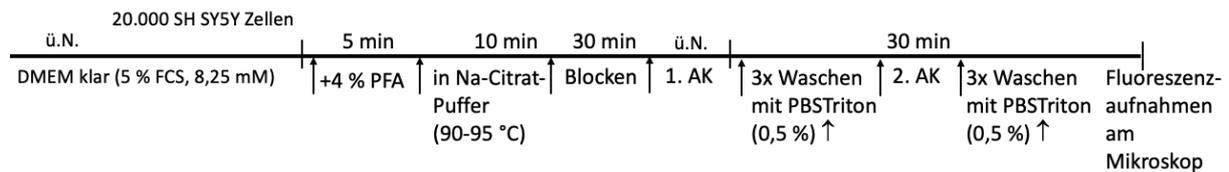


Abbildung 14 Allgemeiner Versuchsablauf einer immunohistologischen Färbung.

Am Tag nach dem Aussäen der SH SY5Y Zellen wurden diese in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und dann in Na-Citrat-Puffer abgekocht. Nach dem Blocken wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (1.AK) inkubiert. Am nächsten Tag wurde gewaschen, der sekundäre Antikörper inkubiert und erneut gewaschen. Anschließend wurden die Fluoreszenzaufnahmen am Mikroskop durchgeführt (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe des 3D-Plugins „Volume Viewer“ und dem Display-Modus „Max Projection“ in der Software ImageJ bearbeitet, so dass die Maximalwerte der Fluoreszenzfärbung der verschiedene Fokusebenen der *Z-Stacks* in einem Bild dargestellt werden konnten.

Um die Lokalisation der Myeloperoxidase und der Superoxid-Dismutase 3 genauer identifizieren zu können, wurde zusätzlich eine Co-Färbung mit DAPI durchgeführt. Dafür wurde vor dem Eindecken der Objektträger 1 µg/mL DAPI in PBSTriton (0,5 %) ↑ für 10 min inkubiert und anschließend mit PBSTriton (0,5 %) ↑ abgewaschen. Die Aufnahme der DAPI-Färbung erfolgte bei 630-facher Vergrößerung bei einer Exzitation von 354 nm und einer Emission von 456 nm. Zur Darstellung der Co-Färbung wurden die beiden Kanäle der Antikörper- und DAPI-Färbung in einem Bild in ImageJ zusammengeführt.

3.2.7 Quantifizierung der mitochondrialen Masse mittels CellLight Mitochondria-GFP

3.2.7.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Um die Morphologie und Masse der Mitochondrien nach langzeitigem metabolischem Stress zu bestimmen, wurden die Mitochondrien der SH SY5Y Zellen mittels CellLight Mitochondria-GFP, BacMam 2.0 markiert.

Es wurden 2 µL des CellLight Mitochondria-GFP beim Aussäen von 20.000 SH SY5Y Zellen in 100 µL DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) pro Well der 12-Well Silikonkammern (Abb. 13) hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass die Zellen transfiziert werden konnten. An der Unterseite der Silikonkammern wurden Glasdeckgläschen (0,2 mm Dicke) angebracht, auf welchen die Zellen ausgesät wurden.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Behandlung mit DMEM klar (0,1 % FCS, 2 mM), DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) oder DMEM klar (0,1 % FCS, 16,5 mM) für 24 oder 48 h, nach der optischen Kontrolle der Zell-Morphologie unter einem Mikroskop im Durchlicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils sechs Bilder im Durchlicht und sechs Fluoreszenzbilder pro Behandlungsbedingung aufgenommen bei einer Exzitation von 488 nm und einer Emission von 510 nm am DM IL LED Fluoreszenzmikroskop von Leica. Die Belichtungszeit betrug 100 ms bei einer 400-fachen Vergrößerung. Eine Durchlicht- und eine Fluoreszenzaufnahme wurden im selben Bildausschnitt aufgenommen.

3.2.7.2 Auswertung der Aufnahmen in ImageJ

Zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wurde die Software ImageJ und das von Dr. Jeff Stuart (Brock University, Canada) entwickelte ImageJ-Plugin MiNA (Mitochondrial Network Analysis) verwendet (<https://github.com/StuartLab/MiNA>). Hierbei handelt es sich um ein Plugin zur quantitativen Beschreibung der mitochondrialen Morphologie anhand von Fluoreszenzaufnahmen von markierten mitochondrialen Strukturen (Valente et al., 2017).

Zur Anwendung wurde eine Fluoreszenzaufnahme geöffnet und dann mittels „MiNA_Analyse_Morphology“ Programm durch Auswählen des Plugins „StuartLab“ analysiert. Die Ausgabe der Analyse beinhaltet den „mitochondrial footprint“, definiert als die Fläche oder das Volumen der Fluoreszenzaufnahme, die von mitochondrialem Signal eingenommen wird, sowie die „branch length mean“ mit der dazugehörigen Standardabweichung und des Medians. Bei der „branch length mean“ handelt es sich um die durchschnittliche Länge der mitochondrialen Strukturen, welche je nach Stadium der mitochondrialen Dynamik variieren können (Peng et al., 2011). Die Daten der einzelnen Fluoreszenzaufnahmen wurden zur weiteren Auswertung in Microsoft Excel kopiert.

Um die mitochondriale Masse („mitochondrial footprint“) auf die Menge vorhandener SH SY5Y Zellen beziehen zu können, wurden die Durchlichtaufnahmen mit Hilfe eines erstellten ImageJ-Macros zur Ermittlung der Zellfläche (Anhang Abb. 52) ausgewertet.

3.2.7.3 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Die mit Zellen belegten Flächen eines Bildes wurden dem jeweiligen Wert des „mitochondrial footprint“ der MiNA-Analyse in einer Microsoft Excel-Tabelle

zugeordnet. Um die mitochondriale Masse pro Zelle zu berechnen, wurde der „mitochondrial footprint“ durch die Zellfläche pro Aufnahme dividiert und in Prozent angegeben. Davon wurden dann die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese wurden auch für die MiNA-Analyse-Kategorien „branch length mean“ berechnet.

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben in der Software OriginPro 2023b zwischen den hypo- oder hyperglykämischen Konzentrationen im Vergleich zur normoglykämischen Konzentration durchgeführt. Es wurde eine Korrektur in Bezug auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

3.2.8 Messung des intrazellulären Calcium-Signals

Das intrazelluläre Calcium-Signal der SH SY5Y Zellen wurden mittels dem Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM und einem Durchflusssystem analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM kann aufgrund einer Acetoxymethylestergruppe (AM) über die Zellmembran diffundieren. Intrazellulär wird die Estergruppe des Fluo-4 Moleküls durch zelleigene Esterasen abgespalten. Dadurch ist der Farbstoff nicht mehr zellpermeabel, verbleibt intrazellulär und kann durch seine negative Ladung an positives Calcium binden, so dass er nach Anregung mit 490 nm bei einer Emission von 520 nm fluoresziert (Abb. 15).

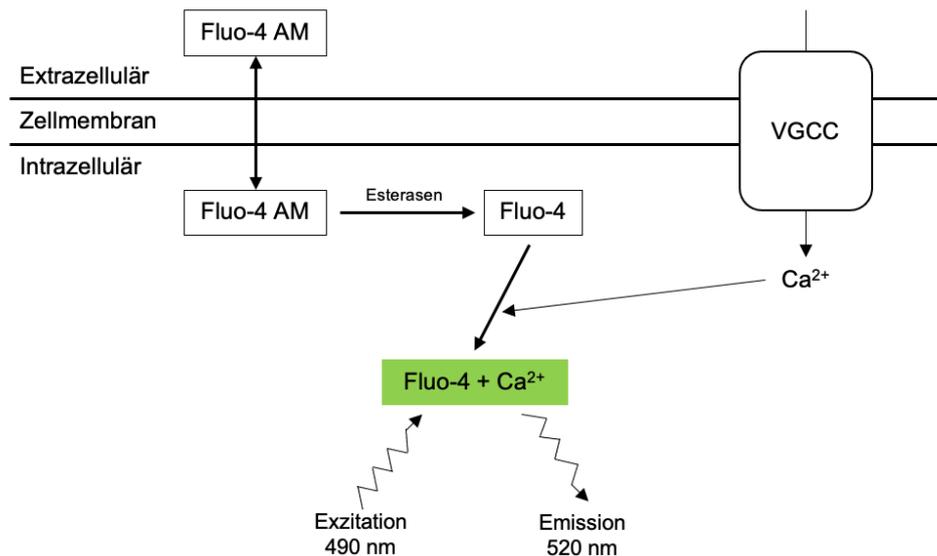


Abbildung 15 Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 AM.

Die Acetoxymethylestergruppe (AM), welche dem Farbstoff die Membranpermeabilität ermöglicht, wird durch zelleigene Esterasen intrazellulär abgespalten. Dadurch verbleibt der Farbstoff in der Zelle und fluoresziert nach Bindung an Calcium bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm (verändert nach Raccuglia, 2011).

3.2.8.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Die SH SY5Y Zellen wurden für die Messung des relativen Calcium-Signals auf 22x40 cm Glasdeckgläschen in Silikon-Durchflusskammern ausgesät und kultiviert (Abb. 16 A). Zur Vorbereitung wurden die Durchflusskammern, bestehend aus zwei gepaarten Einzelkammern, zur Entfernung von Fett und Schmutz, für eine Stunde in 70 %-igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde das Ethanol mit fließendem destilliertem Wasser abgespült und die Kammern trocknen gelassen. Danach wurden die Deckgläschen mittels Adhäsionskraft an der Unterseite der Durchflusskammern befestigt.

Für die Experimente wurden 20.000 SH SY5Y Zellen in die obere Einzelkammer der Durchflusskammern in 100 μL DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) auf die Glasdeckgläschen ausgesät und für eine Stunde im Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert. Nach dem sich die Zellen abgesetzt hatten und anwachsen konnten, wurden weitere 400 μL Medium pro Einzelkammern hinzugegeben und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

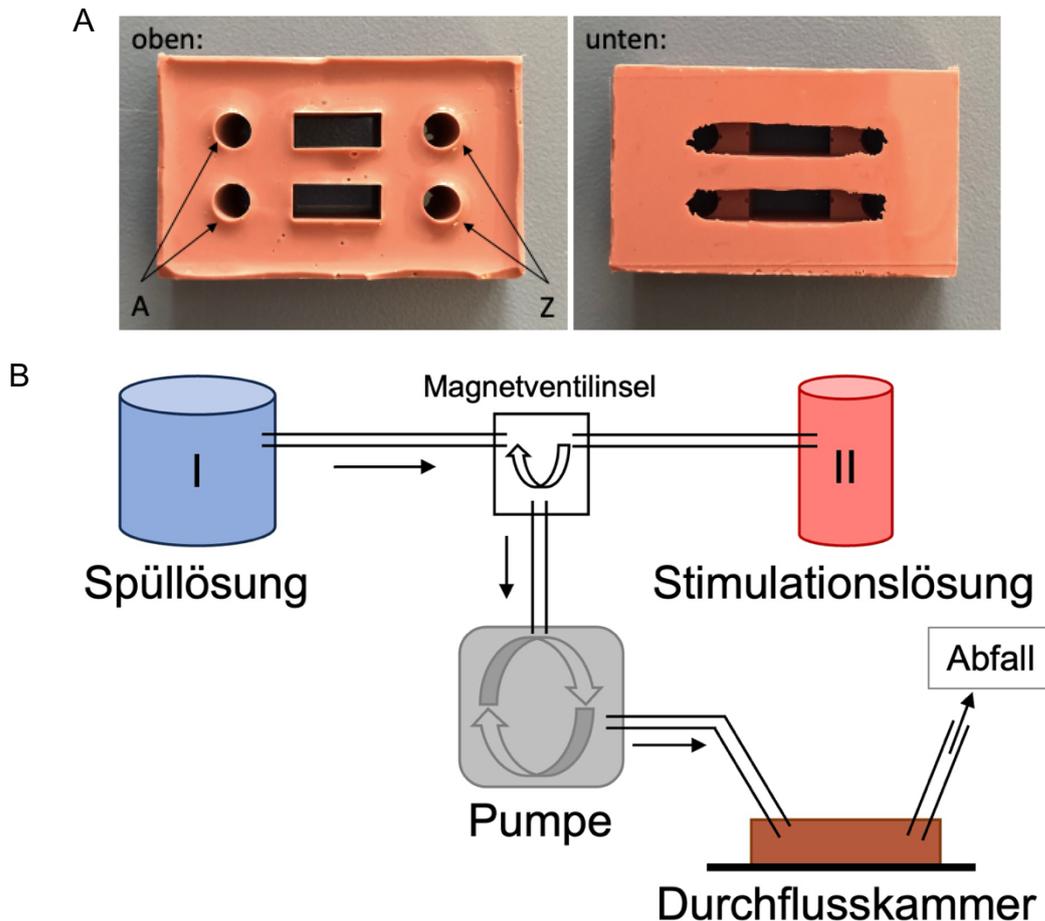


Abbildung 16 Aufbau des Messsystems für das relative Calcium-Signal.

A: Die Silikon-Durchflusskammer für das Durchflusssystem besteht aus zwei gepaarten Einzelkammern in der Mitte, in welche die SH SY5Y Zellen auf ein Glasdeckgläschen ausgesät werden können. Jede Einzelkammer ist mit einem Loch für einen Zulaufschlauch (Z) und einen Ablaufschlauch (A) verbunden. **B:** Schematischer Aufbau des Durchflusssystems. Über die Mehrwegemagnetventilinsel ist es möglich, verschiedene Lösungen an das Pumpsystem anzuschließen. Das Flüssigkeits-Reservoir I enthält die Spüllösung (Hank's Puffer) und Reservoir II die Stimulationslösung mit ACh. Der Zulauf der Lösungen zum Pumpsystem kann über die Magnetventilinsel elektronisch per Schalter umgeschaltet werden. Das Pumpsystem pumpt die entsprechende Lösung über einen Zulaufschlauch in die Durchflusskammer, welche über einen Ablaufschlauch in den Abfall gelangt (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Am darauffolgenden Tag konnten die Zellen für die Messung des relativen Calcium-Signals verwendet werden. Es wurde zunächst eine optische Kontrolle der Zellen am Mikroskop im Durchlicht durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. Dafür wurde das DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) abgenommen und einmal mit 200 μ L DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) gespült. Daraufhin erfolgte die jeweilige Behandlung mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen in 200 μ L DMEM klar (0,1 % FCS). Zum Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 AM wurden die Zellen 15

min bei 37 °C mit einer 20 µM Farbstofflösung inkubiert. Vorab wurde das Behandlungsmedium auf ein Volumen von 100 µL reduziert.

Zu Beginn der Messung wurden die mit Zellen-bestückten Silikon-Durchfluskkammern an das Durchflusssystem am DM IL LED Fluoreszenzmikroskop von Leica angeschlossen. Das verwendete Durchflusssystem wurde 2008 von David Raccuglia im Zuge seiner Dissertation in der AG Zoologie/ Physiologie der UdS etabliert. Dieses System ermöglicht es die Zellen in den gepaarten Silikon-Durchfluskkammern während der Messung ständig mit Hank's Puffer (8 mM) mittels einer Zwei-Kanal-Pumpe zu versorgen, mit Neurotransmittern wie Acetylcholin zu stimulieren und diesen anschließend wieder wegzuspülen (Abb. 16 B). Zunächst wurde unter 200-facher Vergrößerung im Durchlicht ein geeigneter Bildausschnitt gewählt. Daraufhin wurden die Schläuche für Zu- und Ablauf angeschlossen und die Pumpe für das Durchflusssystem gestartet. Nach Fokussieren der Zellen wurde das Fluoreszenzlicht eingeschaltet und die Calcium-Messung bei einer Exzitation von 490 nm und Emission von 520 nm durchgeführt. Während der Messung wurden 80 Einzelbilder in Intervallen von zwei Sekunden bei einer Belichtungszeit von 500 ms mit Hilfe der Mikroskopkamera R6 Retina aufgenommen. Kamera und Mikroskop wurden über die Software „Ocular“, welches eine Filmsequenz aus den Einzelbildern generierte, gesteuert. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh, 20 µM in Hank's Puffer (8 mM)) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während der gesamten Messsequenz. Die erste Stimulation erfolgte von Sekunde 20 bis 24 und die zweite Stimulation wurde von Sekunde 80 bis 84 durchgeführt (Abb. 17).

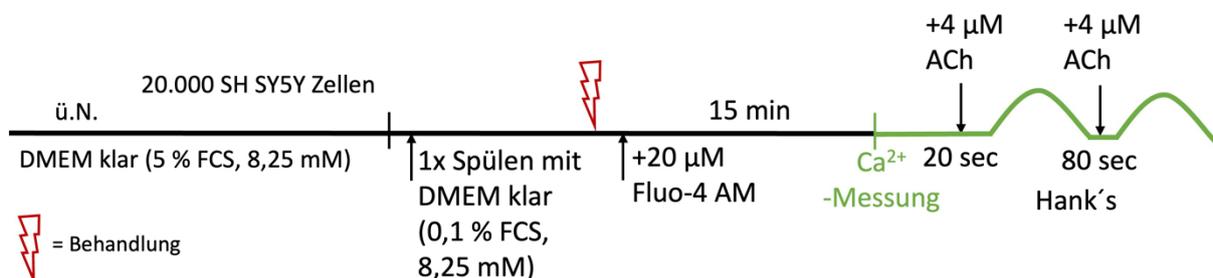


Abbildung 17 Allgemeiner Versuchsablauf der Messung des relativen Calcium-Signals.

Am Tag nach dem Aussäen der SH SY5Y Zellen wurde vor Beginn der Behandlung einmal mit DMEM (0,1 % FCS) gespült und anschließend die jeweilige Behandlung (roter Blitz) durchgeführt. Vor Beginn der Messung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM hinzugegeben. Während der Messung wurden Einzelbilder in Intervallen aufgenommen und die Zellen zweimal mit ACh stimuliert (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.8.2 Auswertung in ImageJ

Die Auswertung der Filmsequenzen erfolgte in der Software „ImageJ“. Die Skala der Filmdatei wurde über den Befehl „Set Scale“ zunächst auf Pixel geändert. Anschließend wurde die Helligkeit der Filmdatei über „Image“ → „Adjust“ → „Brightness“ angepasst. Es wurde das Bild aus der Filmsequenz mit der höchsten Fluoreszenzintensität ausgewählt und der *Threshold* „Triangle“ für dieses Einzelbild gebildet. Dabei wurden Objekte, welche eine Größe von 300 bis unendlich Quadratpixel gemessen (Abb. 18). Die erhaltenen *Regions of Interest* (ROI) wurden anschließend auf alle Bilder der Filmsequenz übertragen, über den Befehl „Multi Measure“ im ROI-Manager. Dadurch wurde der mittlere Grauwert für jede Zelle zu jedem gemessenen Zeitpunkt erhalten. Die Werte wurden dann in Microsoft Excel übertragen.

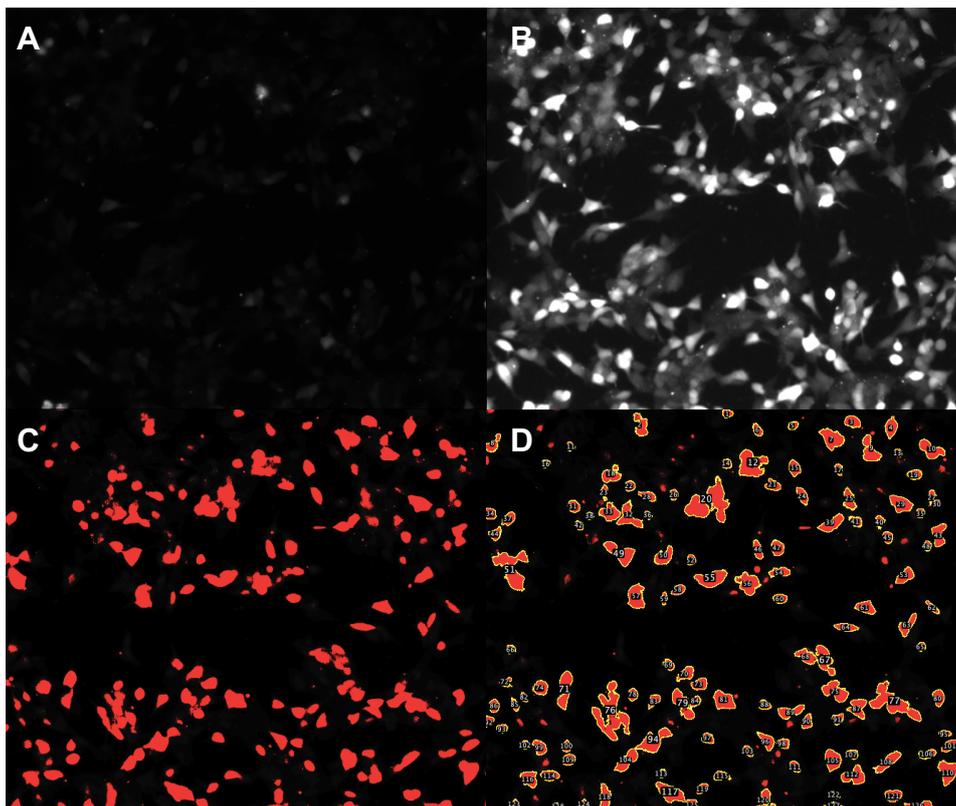


Abbildung 18 Einzeln, nacheinander durchgeführten Schritte bei der Auswertung der Filmsequenzen der Messung des relativen Calcium-Signals in ImageJ.

A: Unbearbeitetes fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenes Einzelbild der Filmdatei bei 200-facher Vergrößerung. **B:** Nach Anpassung der Helligkeit und Auswahl des hellsten Einzelbildes. **C:** Nach Festlegen des *Threshold* „Triangle“. **D:** Analysierten Bereiche mit einer Fläche von 300 bis unendlich Quadratpixel, welche nummeriert wurden (eigene Abbildung).

3.2.8.3 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Um die Erregbarkeit der SH SY5Y Zellen nach den Behandlungen mit den verschiedenen Glucose-Konzentrationen zu charakterisieren, wurden die relativen Calcium-Signale, induziert durch zwei ACh-Stimuli, verglichen. Da die Kurven der Grauwerte der einzelnen Zellen zu einer Abnahme über die Messzeit neigten, wurde zuerst eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Dafür wurde der Mittelwert der Grauwerte von den Bildsequenzen 10 bis 12 für jede gemessene Zelle ermittelt, welcher die Ausgangsfluoreszenz darstellte (Intens t_0). Der errechnete Mittelwert der Grauwerte von den Bildsequenzen 75 bis 80 beschrieb die Fluoreszenz jeder Zelle zum Ende der Messung (Intens t_{Ende}). Aus der Differenz dieser beiden Werte ergab sich mittels der folgenden Formel der Steigungswert der Grauwerte über die Zeit pro Zelle:

$$(\text{Intens } t_0 - \text{Intens } t_{\text{Ende}}) / \text{Anzahl der Bildsequenzen von Intens } t_0 \text{ bis Intens } t_{\text{Ende}}.$$

Jeder Grauwert eines Messzeitpunkts einer Zelle wurde dann auf den Steigungswert korrigiert (Abb. 19). Anschließend wurden die Grauwerte einer Zelle auf den Mittelwert der Ausgangsfluoreszenz (Intens t_0) normiert, so dass Intens t_0 gleich 1 gesetzt wurde.

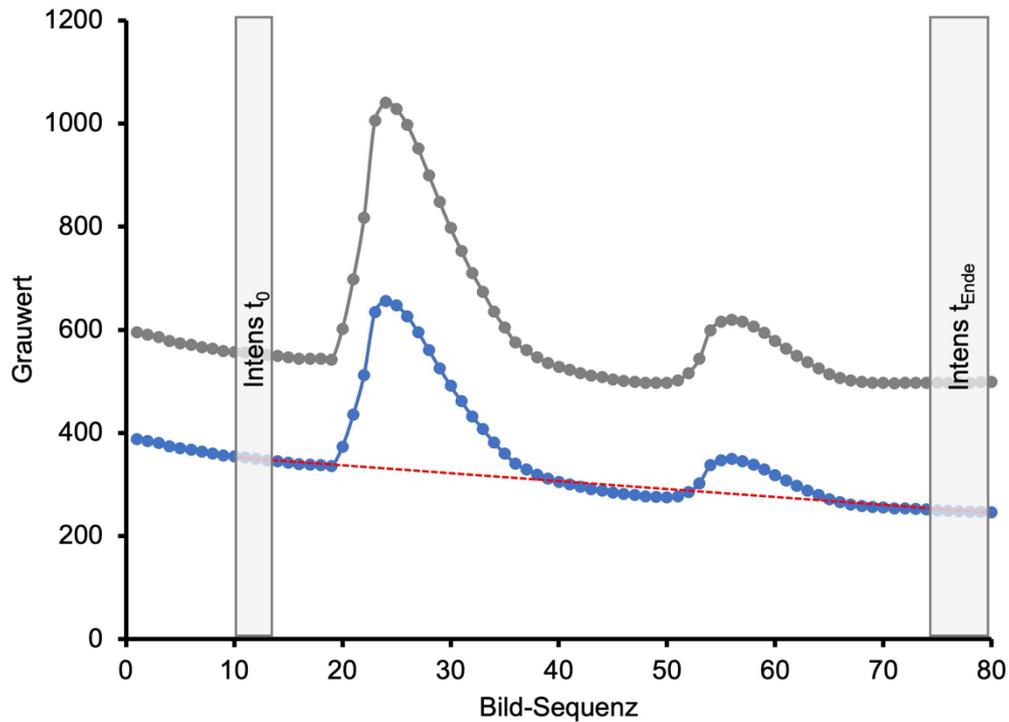


Abbildung 19 Exemplarischer Reaktionsverlauf einer reagierenden SH SY5Y Zelle.

Der einheitslose mittlere Grauwert ist gegen die einheitslose Bildsequenz aufgetragen. Die errechnete Ausgangsfluoreszenz der Zellen ($\text{Intens } t_0$) und die Fluoreszenz zum Ende der Messung ($\text{Intens } t_{\text{EnDe}}$) wurden mit grauen Balken markiert. Die rote Linie stellt die Steigung der Grauwerte über die Bildsequenzen von $\text{Intens } t_0$ bis $\text{Intens } t_{\text{EnDe}}$ dar. Der kinetische Verlauf der Grauwerte in blau beschreibt die Kurve vor der Basislinienkorrektur und die graue Linie zeigt die korrigierten Grauwerte (eigene Abbildung).

Um die Reaktivität der SH SY5Y Zellen zu untersuchen, wurde zwischen nicht-reagierenden und reagierenden Zellen unterschieden. Alle Zellen mit einem maximalen Peak-Verhältnis (Max. Ratio) unter 1,1 galten als nicht-reagierend (Abb. 20 A) und Zellen, welche einen Max. Ratio von über 1,1 aufwiesen, galten als reagierend (Abb. 20 B). Der Max. Ratio beschreibt das Verhältnis des Minimums vor dem Peak (MIN) zum nachfolgenden Maximum des Peaks (MAX):

$$\text{Max. Ratio} = (\text{MAX} / \text{MIN})$$

Die Anzahl reagierender Zellen im Verhältnis zur Anzahl der insgesamt gemessenen Zellen wurde anschließend ermittelt und in Prozent angegeben.

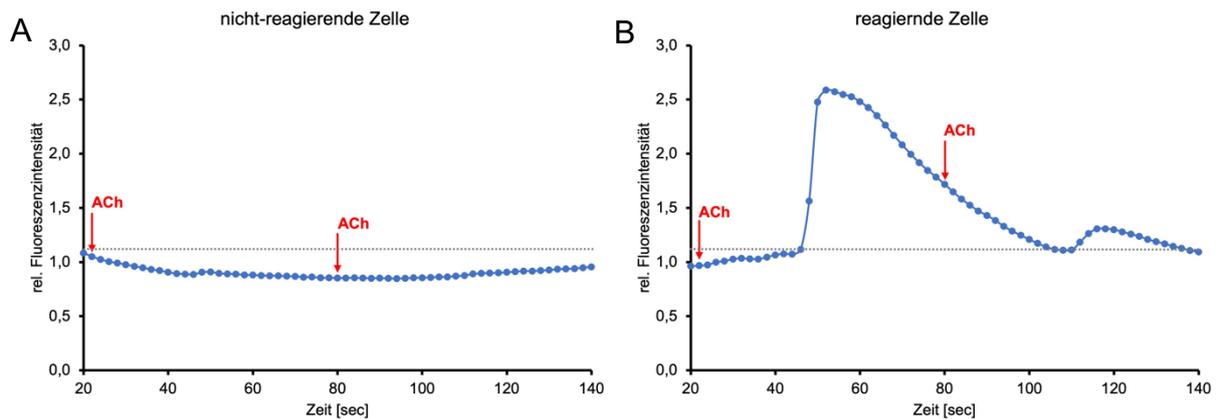


Abbildung 20 Beispiel einer nicht-reagierenden und einer reagierenden SH SY5Y Zelle.

Die einheitslose relative Fluoreszenzintensität wurde gegen die Messzeit in Sekunden aufgetragen. Mit den roten Pfeilen wurden die Stimulationen mit Acetylcholin (ACh) nach 20 und 80 Sekunden markiert. Die grau gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert von 1,1. Zellen, welche nach der ersten und zweiten ACh-Stimulation den Schwellenwert nicht überschritten wurden, als nicht-reagierende Zellen definiert (**A**). Zellen, welche die Reaktionsschwelle von 1,1 nach beiden ACh-Stimulationen überschritten, galten als reagierende Zellen (**B**) (eigene Abbildung).

Verschiedene Bereiche der Kurvenverläufe der relativen Fluoreszenzintensität zwischen den Behandlungen mit den verschiedenen Glucose-Konzentrationen wurden, wie in den Ergebnissen beschrieben, statistisch verglichen mittels des Programms OriginPro2023b und einem einseitigen ANOVA mit wiederholten Messungen mit einem Tukey's Post-hoc Test. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

3.2.9 Messung der Energieträger im Medium-Überstand mittels Amplex Red

Um den Verbrauch verschiedener Energieträger, wie Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und Laktat der SH SY5Y Zellen, zu messen, wurde ein Amplex Red Assay verwendet. Hierbei wurde für die Messung der Konzentrationen des jeweiligen Energieträgers im Medium-Überstand eine spezifische Oxidase benötigt. Die Oxidase wandelt zum Beispiel Glucose in Gluconolacton um, wobei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet wird. Aus diesem H_2O_2 wird mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Amplex Red in einer Stöchiometrie von 1:1 das rot-fluoreszierende Resorufin gebildet, so dass anhand des Resorufin-Signals auf die im Medium enthaltene Glucose-Konzentration zurückgeschlossen werden kann (Abb. 21).

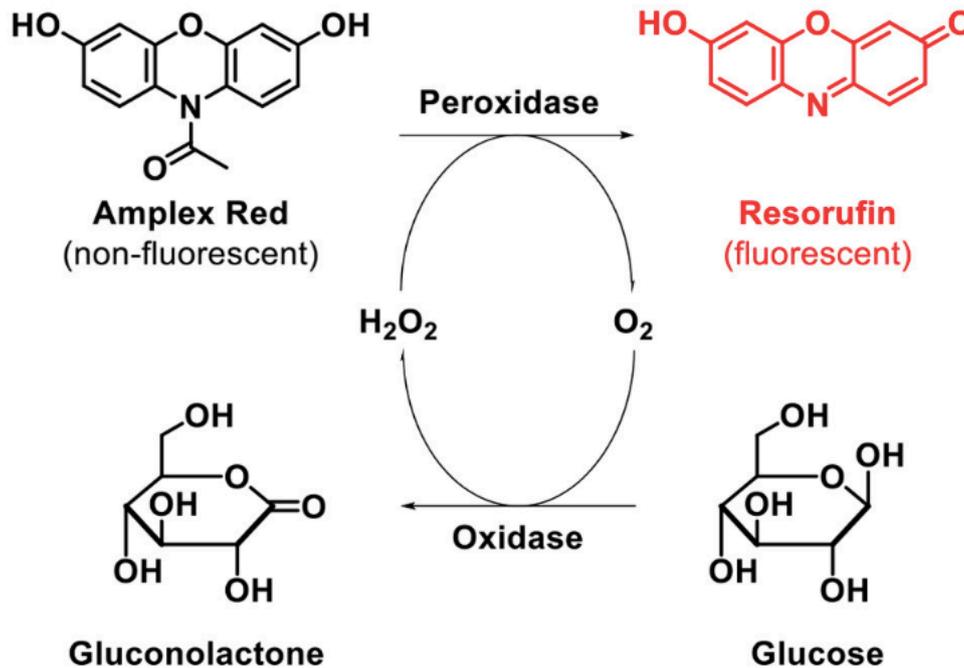


Abbildung 21 Prinzip des Nachweises von Energieträgern im Medium-Überstand mittels Amplex Red Assay.

Hier wurde als Beispiel das Detektionsschema für Glucose mit Hilfe der Glucose-Oxidase dargestellt. Die Glucose-Oxidase oxidiert Glucose, welches zur Bildung von H_2O_2 führt. H_2O_2 reagiert mit Amplex Red und wird durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) zu dem rot-fluoreszierenden Resorufin umgewandelt (Böhm et al., 2018).

3.2.9.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Energieträger im Überstand des Behandlungsmediums wurden 30.000 SH SY5Y Zellen auf einer durchsichtigen 96-Well-Platte in 100 μ L DMEM klar (5 % FCS) ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Zur methodischen Kontrolle wurden zwei Reihen ohne Zellen mit DMEM klar (5 % FCS) mitgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dafür einmal mit 100 μ L DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) gespült und erhielten dann 100 μ L des Behandlungsmediums. Zu vorgegebenen Zeiten (t_0 , t_1 , t_2) wurde für die Bestimmung der Konzentration von Glucose, Pyruvat und Laktat 4 μ L des Mediums abgenommen und in 200 μ L Phosphatpuffer (PB) verdünnt (Verdünnung 1; 1:50) und bei -20 °C eingefroren. Zur Bestimmung der L-Glutamin-Konzentration wurden 4 μ L des Mediums abgenommen und in 100 μ L Na-Acetat-Puffer verdünnt (1:25).

Zur Vorbereitung der Messung der Energieträger Glucose, Pyruvat und Laktat wurde eine zweite Verdünnung der Proben angefertigt. Dafür wurden 20 μ L der Verdünnung 1 in 200 μ L PB verdünnt und bei -20 °C eingefroren. Um die Konzentration der

einzelnen Energieträger im Medium berechnen zu können, wurden jeweils für Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und Laktat Standards angesetzt und bei der jeweiligen Messung mitgeführt (Anhang Abb. 53).

Für die Glucose- und Laktat-Messung wurden 25 μL der Verdünnung 2 der Proben und des Standards in 50 μL PB in einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Zum Starten der Messung wurden 25 μL des Glucose- bzw. Laktat-Reaktions-Mixes hinzu pipettiert. Für die Pyruvat-Messung wurden 12,5 μL der Verdünnung 2 der Proben und des Standards in 62,5 μL PB vorgelegt und dazu 25 μL des Pyruvat-Reaktion-Mixes pipettiert. Für die Quantifizierung von L-Glutamin wurde zuerst L-Glutamin mit Hilfe der Glutaminase (0,05 U/mL, 2 h bei 37 °C) in L-Glutamat umgesetzt. Anschließend wurde zu den 25 μL der Proben 75 μL des L-Glutamat-Reaktions-Mixes hinzugegeben. Gemessen wurde als Kinetik bei einer Exzitation von 530 ± 17 nm und einer Emission von 590 ± 17 nm bei einem *Gain* von 70 bzw. 90 für L-Glutamat für 30 min in einem Intervall von 2 min am Mikroplattenreader Safire2 von Tecan mit Hilfe der Software XFLUOR4SAFIREII V 4.62n. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte für 10 s geschüttelt (Abb. 22).

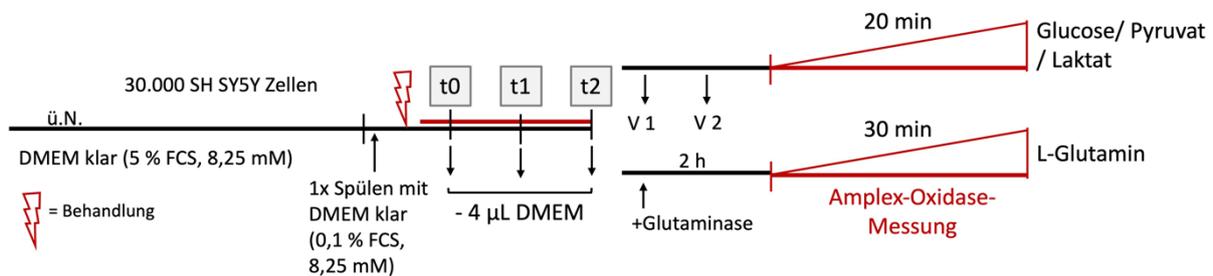


Abbildung 22 Allgemeiner Versuchsablauf der Verbrauchsmessung der Energieträger mittels Amplex Red.

Am Tag nach dem Aussäen der Zellen erfolgte ein Spülschritt vor der jeweiligen Behandlung der Zellen. Zu den ausgewählten Messpunkten (t0, t1, t2) wurden Proben aus dem Medium-Überstand abgenommen und in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Für die Bestimmung von Glucose, Pyruvat und Laktat im Medium wurden die Proben zweimal verdünnt. Für den Nachweis von L-Glutamin im Medium wurde die Glutaminase hinzugegeben. Es erfolgte eine Kinetik-Messung mittels Amplex Red, HRP und der jeweiligen Oxidase (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.9.2 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Zur Berechnung der jeweiligen Konzentration der Energieträger im Überstand wurde die Steigung des Resorufin-Signals ermittelt. Für die Berechnung der Glucose-Konzentration wurde der Messzeitraum von null bis 20 min verwendet und für L-Glutamin der gesamte Messzeitraum von 30 min. Bei der Berechnung der Pyruvat-

und Laktat-Konzentration wurde der Messzeitraum von null bis 10 min ausgewertet, da sich die Reaktion nach 10 min verlangsamte, was auf eine Sättigung hindeutet (Anhang Abb. 54).

Zuerst wurde die Steigung der mitgeführten Standardreihe ermittelt. Jede Konzentration des Standards wurde als Doppelbestimmung mitgeführt. Die Konzentrationen wurden dann gegen die ermittelte Steigung in einem xy-Diagramm aufgetragen, so dass anhand der Formel für die eingefügte Regressionsgerade die Konzentration im Medium berechnet werden konnte (Abb. 23).

Beispiel-Rechnung: Steigungsformel: $y = 15,328x + 29,167$

Steigung der Standard-Probe: $y = 149,4$

Auflösung nach x ergibt $x = (149,4 - 29,167) / 15,328 = 7,84 \text{ mM}$

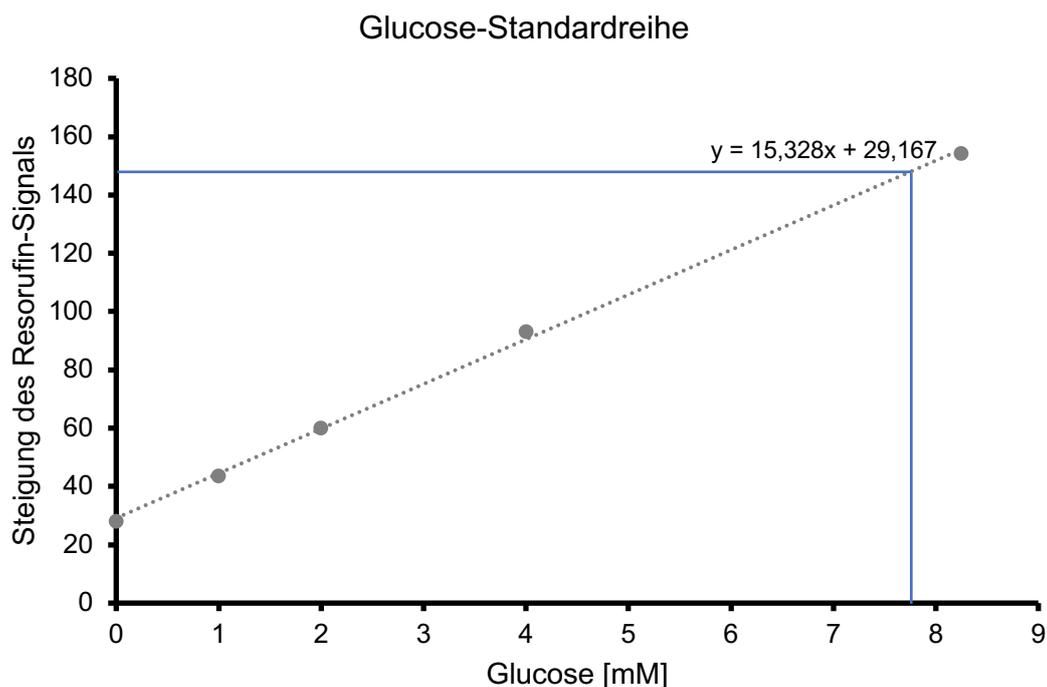


Abbildung 23 Beispiel zur Berechnung der Glucose-Konzentration im Medium-Überstand.

Aufgetragen wurde die berechnete einheitslose Steigung des Resorufin-Signals gegen die Glucose-Konzentration in mM des mitgeführten Standards. Anhand der eingefügten Regressionsgeraden und der dazugehörigen Formel konnte die Glucose-Konzentration der Proben aus dem Medium-Überstand berechnet werden. Die blaue Linie markiert die Steigung des Resorufin-Signals von 149,4. Mit Hilfe der Steigungsformel wurde eine Glucose-Konzentration von 7,84 mM im Medium-Überstand berechnet (eigene Abbildung).

Anschließend wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der berechneten Konzentration von Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und Laktat im Medium-Überstand für

die verschiedenen Zeitpunkte für die Wells mit und ohne Zellen berechnet. Zur Darstellung wurde die Konzentration in mM gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Für die statistische Auswertung der gemittelten Konzentrationen der Energieträger Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und Laktat wurde mit Hilfe der Software OriginPro 2023b ein zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Um die Verbrauchsrate des jeweiligen Energieträgers pro SH SY5Y Zelle pro Stunde zu den Messzeitpunkten 24 und 48 h zu berechnen, wurde die ermittelte Konzentration durch die mittlere Zellzahl, gemessen mit dem BioTek Cytation5 System (Kapitel 3.2.2) (Anhang Tab. 17), und die Anzahl der Stunden (24 oder 48) dividiert und in fmol pro Zelle pro Stunde dargestellt.

3.2.10 Ermittlung der zellulären ATP-Produktion mittels Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay

Zur Bestimmung der ATP-Produktion, welche die Zellen je nach Energiestatus regulieren, wurde der Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay verwendet. Mit Hilfe dieses Assays konnte das ATP produziert über die Glykolyse (GlykoATP) vom ATP produziert während der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (MitoATP) unterschieden werden. Der Assay wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie der UdS in der AG von Prof. Dr. A. K. Kiemer durchgeführt.

3.2.10.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Für die Messung der zellulären ATP-Produktion wurden 30.000 SH SY5Y Zellen pro Well in *V3 PS cell culture microplates for XF96 analyzers*, mit 100 µL DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Der Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay wurde, wie im *User Guide* von Agilent beschrieben durchgeführt. Das XF DMEM wurde den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Zellkulturbedingungen angepasst, so dass das XF DMEM 8,25 mM Glucose, 2 mM Pyruvat und 4 mM L-Glutamine enthielt. Die Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C, no-CO₂, nach dem Waschen der Zellen mit XF DMEM wurde genutzt, um die Zellzahl pro Well der Zellen anhand des bildgebenden Verfahrens des BioTek Cytation 5 Systems, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, zu bestimmen.

Der Real-Time ATP Rate Assay erfolgt im Seahorse XF96 *Analyzer*, welcher über die Software Wave gesteuert wird. Das Messprotokoll besteht aus einer Initialisierungs-Phase, bei der das Gerät kalibriert und equilibriert wird. Anschließend erfolgen drei Mess-Phasen, bestehend aus jeweils drei Zyklen á drei Minuten. Während der ersten Mess-Phase wird die *Baseline* der Zellen gemessen. Danach erfolgt die Injektion von 1,5 μM Oligomycin, einem Inhibitor der mitochondrialen ATP-Synthase, und der Beginn der zweiten Mess-Phase. Vor Beginn der dritten Mess-Phase werden die Inhibitoren Rotenone und Antimycin A in einer Endkonzentration von 0,5 μM , welche den Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette inhibieren, injiziert.

Während der Messung wurden zwei Parameter bestimmt. Zum einen die Sauerstoff-Verbrauchs-Rate (OCR), welche über eine O_2 -kalibrierte LED den Verbrauch in pmol/min angibt. Zum anderen die extrazelluläre Ansäuerungs-Rate (ECAR), welche über eine pH-kalibrierte LED den H^+ -Ausstrom in mpH/min angibt. Am Ende der Messung erhält man die Werte der OCR und der ECAR sowie der Protonen-Efflux-Rate (PER), angegeben in pmol/min, welche anhand der ECAR, des Puffer-Faktors des XF DMEMs, dem Gesamt-Volumen im Well und dem volumetrischen Skalierungsfaktor (Kvol) direkt durch die Software berechnet wurde (Romero et al., 2021). Alle drei Parameter wurden auf den Mittelwert der Hintergrund-Wells ohne Zellen sowie auf die Zellzahl des jeweiligen Wells, gemessen mittels BioTek Cytation 5 System wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, normiert. Dafür wurde durch die Zellzahl geteilt und dann mit einem Normalisierungsfaktor, welcher der ausgesäten Zellzahl entspricht, multipliziert. Die Zellzahl pro Well wurde aus den Daten des BioTek Cytation 5 Systems in die Wave Software eingefügt. Aus der Wave Software wurden die normierten Werte dann als Excel-Datei exportiert.

3.2.10.2 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Zur Berechnung der mitochondrialen ATP-Produktion (MitoATP) wurde die OCR verwendet, da nur durch die mitochondriale oxidative Phosphorylierung O_2 aufgebraucht wird. Es wurde zunächst der Mittelwert der ersten drei Zyklen, welche die *Baseline* beschreiben ($\text{OCR}_{\text{Baseline}}$) sowie der drei Zyklen der zweiten Mess-Phase, nach der Injektion von Oligomycin ($\text{OCR}_{\text{Oligomycin}}$), berechnet. Nach Subtraktion des Mittelwerts der $\text{OCR}_{\text{Oligomycin}}$ von dem der $\text{OCR}_{\text{Baseline}}$ ergab sich OCR_{ATP} . Um diese in die mitochondriale ATP-Produktion umzurechnen, wurde mit dem Faktor 2 multipliziert, um O_2 -Moleküle zu Sauerstoff (O) umzuwandeln. Zusätzlich wurde mit dem Faktor

2,75 multipliziert, um die Anzahl ADP phosphoryliert zu ATP pro reduzierten Sauerstoff, durch ein Elektronen-Paar, welches durch die Elektronentransportkette fließt, zu erhalten. Der Faktor von 2,75 wurde gewählt, da dieser die Assay-Konditionen akkurat für unterschiedliche Bedingungen darstellt (Romero et al., 2018).

Formeln zur Berechnung der MitoATP-Produktionsrate:

$$\text{OCR}_{\text{ATP}} = \text{OCR}_{\text{Baseline}} - \text{OCR}_{\text{Oligomycin}}$$

$$\text{MitoATP} = \text{OCR}_{\text{ATP}} * 2 * 2,75$$

Für die Berechnung der ATP-Produktion über die Glykolyse (GlykoATP) wurde die PER verwendet. Die PER beschreibt sowohl die Ansäuerung durch CO₂, produziert durch den TCA-Zyklus (MitoPER), als auch durch 1 H⁺ pro Laktat, welches während der Glykolyse produziert wird (GlykoPER). Um das GlykoPER, welches dem GlykoATP gleich zu setzen ist, zu berechnen, muss zuerst das MitoPER berechnet werden. Das MitoPER ergibt sich aus der Subtraktion des Mittelwerts der PER der ersten drei Mess-Zyklen, der *Baseline* (PER_{Baseline}), von dem Mittelwert der PER der letzten drei Mess-Zyklen nach der Injektion von Rotenone und Antimycin A (PER_{Rot/AA}), da während der letzten Mess-Phase die gesamte mitochondriale oxidative Phosphorylierung inhibiert wurde. Anschließend konnte dann die MitoPER von der PER_{Baseline} subtrahiert werden, so dass die PER der Glykolyse errechnet wurde und somit das glykolytisch produzierte ATP.

Formeln zur Berechnung GlykoATP-Produktionsrate:

$$\text{MitoPER} = \text{PER}_{\text{Rot/AA}} - \text{PER}_{\text{Baseline}}$$

$$\text{GlykoPER} = \text{PER}_{\text{Baseline}} - \text{MitoPER}$$

$$\text{GlykoATP} = \text{GlykoPER}$$

Die Mittelwerte und Standardabweichungen von MitoATP und GlykoATP wurden in pmol/min angegeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der OCR_{Baseline} und ECAR_{Baseline} wurden in pmol/min bzw. mpH/min dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurde die Software OriginPro 2023b verwendet. Es wurde ein zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen für MitoATP und GlykoATP durchgeführt. Es

wurde eine Korrektur in Bezug auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.2.11 Messung des intrazellulären RONS-Signals mittels H₂DCFDA

Zur Ermittlung der intrazellulären Produktion von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) wurde der zellgängige Fluoreszenzfarbstoff 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCFDA) verwendet. Nach Aufnahme des H₂DCFDA in die Zellen wird die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und kann durch RONS zu dem stark grün fluoreszierenden 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert werden (Abb. 24).

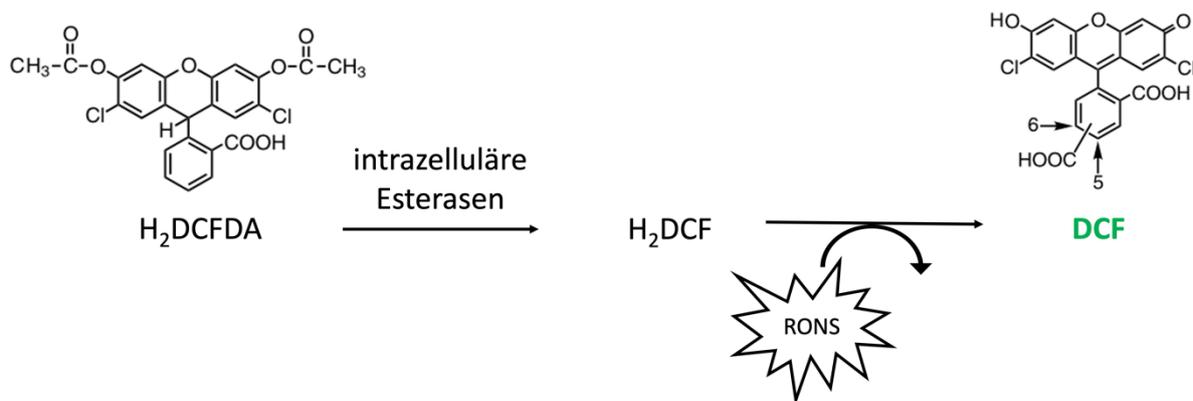


Abbildung 24 Konversion von H₂DCFDA.

Nach Abspalten der Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen wird H₂DCFDA zu H₂DCF umgewandelt und kann durch RONS zum grün fluoreszierenden DCF oxidiert werden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.11.1 Allgemeiner Versuchsablauf der H₂DCFDA-Messungen

Zur Bestimmung des intrazellulären RONS-Signals mittels H₂DCFDA wurden 20.000 SH SY5Y Zellen in 100 µL DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) auf einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Um Artefakte durch Randspuren zu vermeiden und eine direkte, schnelle Messung nach Zugabe des Farbstoffes zu garantieren, wurden in die äußeren drei Spalten 100 µL des klaren Mediums pipettiert jedoch nicht mit Zellen belegt. Die Zellen wurden nur in die mittleren sechs Spalten ausgesät (Abb. 25 B Reihe 4-9). Gleichzeitig wurde für die optische Kontrolle der Zell-Morphologie Wells mit 20.000 Zellen in einer durchsichtigen 96-Well Platte ausgesät. Diese Zellzahl wurde gewählt, da die Steigung des relativen DCF-Signals von 20.000 Zellen/Well im linearen Bereich lag. Das Verhältnis des relativen DCF-Signals der Zellen zum Hintergrund-Rauschen des

Fluoreszenzfarbstoffes lag bei 1:40, so dass das Hintergrund-Signal in weiteren Versuchen nicht weiter berücksichtigt wurde (Anhang Tab. 24).

Nach Anwachsen der SH SY5Y Zellen über Nacht im Wärmeschrank, wurde zunächst die Morphologie der Zellen optisch im Durchlicht unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel in den Wells mit Zellen durch einmal Spülen mit 100 μL DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) durchgeführt. Dann wurden die Zellen der jeweiligen Behandlung in 100 μL DMEM klar (0,1 % FCS) unterzogen. Eine Behandlung der Zellen mit DMEM (0,1 % FCS, 0 mM) führte bereits nach 10 min zu einer signifikanten Abnahme der RONS-Konzentration im Vergleich zu einer Behandlung mit DMEM (0,1 % FCS, 8,25 mM). Mit zunehmender Inkubationszeit wurde die Abnahme des relativen RONS-Signals verstärkt (Anhang Tab. 35). Daher wurde eine Inkubationszeit von 30 min gewählt, um eine kurzzeitige Behandlung im Minutenbereich und einen starken Effekt des Glucose-Entzugs auf die Zellen zu erhalten.

Kurz vor dem Starten der Messung wurde die H_2DCFDA -Messlösung in Hank's Puffer (8 mM) mit einer Endkonzentration von 10 μM angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Behandlungsmedium abgenommen und verworfen und mit 150 μL Hank's (8 mM) einmal gespült. Es erfolgte die Zugabe von 50 μL der Messlösung pro Well zuerst in die Spalten vier, sechs und acht und dann in die Spalten fünf, sieben und neun (Abb. 25 B). Anschließend wurde die Kinetik-Messung der Wells der Spalten vier bis neun über einen Zeitraum von 30 min mit einem Intervall von einer Minute bei einer Emission von 522 ± 10 nm, einer Exzitation von 494 ± 10 nm und einem *Gain* von 150 bei 37 °C im Spark Mikroplattenreader von Tecan gestartet (Abb. 25 A). Die Daten wurden mit Hilfe der Software Sparkcontrol V3.2 in einem Excel-Format erhalten.

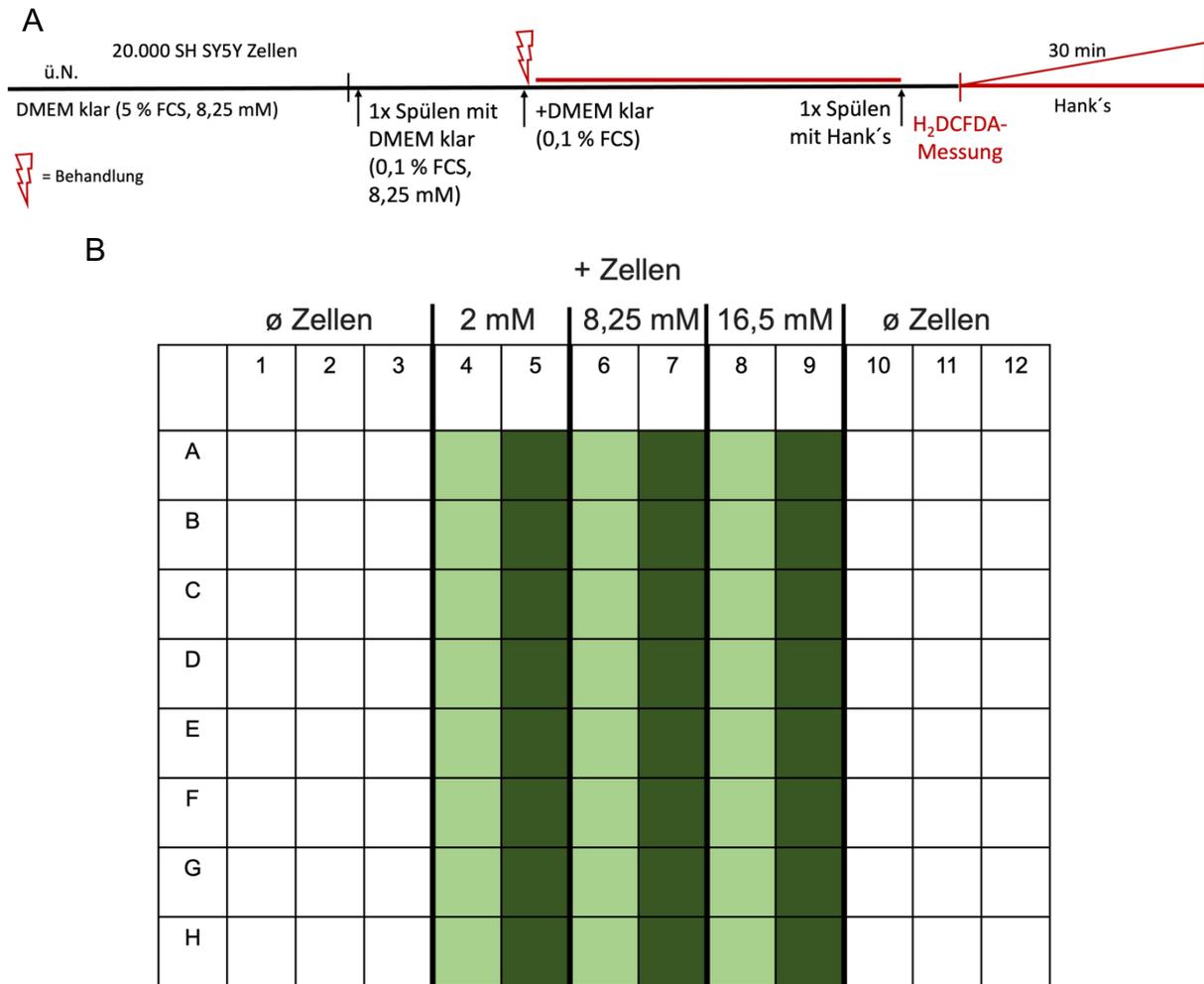


Abbildung 25 Allgemeiner Versuchsaufbau der H₂DCFDA-Messung.

A: Nach Aussäen der SH SY5Y Zellen in die mittleren sechs Spalten und Inkubation über Nacht wurden die Zellen am nächsten Tag einem Mediumwechsel durch einmal Spülen unterzogen. Anschließend erfolgte die Behandlung (roter Blitz). Vor der Messung wurde einmal mit Hank's Puffer (8 mM) gespült, die H₂DCFDA-Messlösung hinzugeben und die kinetische Messung gestartet. **B:** Beispiel eines Belegungsschemas einer 96-Well Platte zur Messung der intrazellulären RONS mittels H₂DCFDA. In die Reihen 1 bis 3 und 10 bis 12 wurden nur Medium hinzugegeben, aber nicht mit Zellen belegt. In die Reihen 4 bis 9 wurden die SH SY5Y Zellen ausgesät. Immer zwei Reihen nebeneinander wurden mit einer der drei Glucose-Konzentrationen behandelt (2, 8,25 oder 16,5 mM). Zu Beginn der Messung wurde die H₂DCFDA-Messlösung zuerst in die Reihen 4, 6 und 8 (hellgrün) pipettiert und anschließend in die Wells der Reihen 5, 7 und 9 (dunkelgrün) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.11.2 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Zur Ermittlung der relativen intrazellulären RONS-Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffs H₂DCFDA wurde der gesamte Messzeitraum von 30 min betrachtet. Dies war möglich, da der Fluoreszenzfarbstoff über die gesamte Messzeit linear anstieg (Anhang Abb. 55). Zur Normalisierung von Zeit-Artefakten während dem Pipettieren der H₂DCFDA-Messlösung wurde folgende Pipettierreihenfolge gewählt. Pro Behandlungsgruppe erhielt jeweils die erste Reihe (4, 6, 8) zuerst die Messlösung und als zweites die zweite Reihe (5, 7, 9). Zuerst wurde dann pro Well, belegt mit

Zellen, die Steigung des DCF-Signals über 30 min berechnet. Anschließend wurde jeweils ein Mittelwert aus den Steigungen des DCF-Signals der Wells, welche zuerst (Reihe 4, 6, 8) oder als zweites die H₂DCFDA-Messlösung erhielten (Reihe 5, 7, 9), ermittelt (Abb. 25 B). Die Steigungen des DCF-Signals wurden auf den jeweiligen Mittelwert normiert. Anschließend erfolgte eine Normierung auf die normoglykämische Behandlungsgruppe (8,25 mM). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen DCF-Signale pro Behandlungsgruppe wurden berechnet und als intrazelluläre RONS in Prozent angegeben.

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test aus Stichproben mit unterschiedlicher Varianz mit Hilfe des Programms OriginPro2023b durchgeführt für den Vergleich der verschiedenen Glucose-Konzentrationen gegen die normoglykämische Konzentration (8,25 mM) innerhalb der verschiedenen gemessenen Zeitpunkte. Es wurde eine Korrektur in Bezug auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Für den statistischen Vergleich bei der Behandlung mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen und der Zugabe eines Inhibitors wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Tukey post-hoc Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

3.2.12 Messung des mitochondrialen Superoxid-Signals mittels MitoSOX Red

Zur spezifischen Messung des relativen Superoxid-Signals in den Mitochondrien wurde der zellpermeable Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX Red Mitochondrialer Superoxid Indikator verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert erst nach schnellem und selektivem Eindringen in die Mitochondrien und die dortige Oxidation durch Superoxid.

3.2.12.1 Allgemeiner Versuchsablauf der MitoSOX Red-Messung

Zur Messung des mitochondrialen Superoxid-Signals mittels MitoSOX Red wurden 20.000 SH SY5Y Zellen auf schwarze 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 µL DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert. Zur optischen Kontrolle der Morphologie der Zellen vor Durchführung der Versuche wurden zwei Wells pro belegter schwarzer 96-Well Mikrotiterplatte in eine durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte mit ausgesät und am nächsten Tag betrachtet. Eine Zellzahl von 20.000 Zellen pro Well wurde gewählt, da die Steigung des MitoSOX Red-Signals dieser Zellzahl am höchsten war und somit am deutlichsten vom

Hintergrund-Signal des Fluoreszenzfarbstoffes mit einem Verhältnis von 1:3 zu unterscheiden war (Anhang Tab. 25).

Am nächsten Tag wurden die Zellen einem Mediumwechsel von DMEM mit 5 % auf 0,1 % FCS durch einmaliges Spülen mit 100 μ L DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) unterzogen. Anschließend erfolgte die jeweilige Behandlung in DMEM klar (0,1 % FCS). Kurz vor der Messung wurde die MitoSOX Red-Messlösung angesetzt mit einer Endkonzentration 2,5 μ M in Hank's Puffer (8 mM). Zum Starten der Messung wurde das Behandlungsmedium abgenommen und 50 μ L der MitoSOX Red-Messlösung pro Well hinzugegeben und eine Kinetik-Messung über 10 Minuten im Intervall von 30 Sekunden bei einer Exzitation von 490 ± 20 nm, einer Emission von 610 ± 20 nm und einem *Gain* von 100 am Mikroplattenreader Spark von Tecan durchgeführt (Abb. 26). Die Daten wurden mit Hilfe der Software Sparkcontrol V3.2 im Microsoft Excel-Format erhalten.

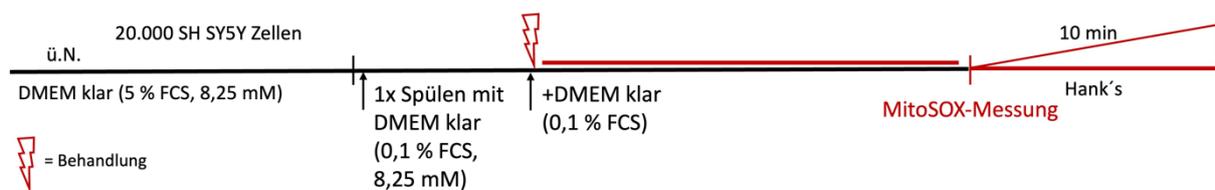


Abbildung 26 Allgemeiner Versuchsablauf der MitoSOX Red-Messung.

Nach Aussäen der SH SY5Y Zellen wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt durch einmaliges Spülen. Anschließend erfolgte die jeweilige Behandlung. Die Kinetik-Messung wurde gestartet durch die Zugabe der MitoSOX Red-Messlösung und erfolgte über einen Zeitraum von 10 min (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.12.2 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Um die Superoxid-Konzentration in den Mitochondrien der SH SY5Y Zellen zu bestimmen, wurde die Steigung für jedes Well ermittelt. Für die Berechnung der Steigung wurde nur der Messzeitraum von null bis drei Minuten verwendet, da das Fluoreszenzsignal des MitoSOX Red-Farbstoffes ab einer Zeit von vier Minuten gesättigt war (Anhang Abb. 56).

Um Artefakte aufgrund der Zeit seit Zugabe des Farbstoffes in die einzelnen Spalten der Mikrotiterplatte bis zum Starten der Messung zu normalisieren, wurde jeweils ein Mittelwert für die Reihen (Reihen 4, 6, 8), welche zuerst, oder als zweites die MitoSOX Red-Messlösung erhielten (Reihen 5, 7, 9) gebildet. Die Steigungen der MitoSOX Red-Signale wurden auf den jeweiligen Mittelwert normiert. Anschließend erfolgte die Normierung auf die normoglykämische Behandlungsgruppe (8,25 mM) und die

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden gebildet und als mitochondriales O_2^- in Prozent angegeben.

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test aus Stichproben mit unterschiedlicher Varianz mittels des Programms OriginPro 2023b durchgeführt. Es wurde eine Korrektur auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

3.2.13 Messung des extrazellulären H_2O_2 -Signals mittels Amplex Red

Zur Messung des extrazellulären H_2O_2 -Signals wurde das hochsensitive und spezifische Amplex Red verwendet. Das nicht-fluoreszierende Amplex Red reagiert in einer Stöchiometrie von 1:1 mit H_2O_2 und wird in Anwesenheit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) in das rot fluoreszierende Resorufin umgewandelt (Abb. 27) (Karakuzu et al., 2019).

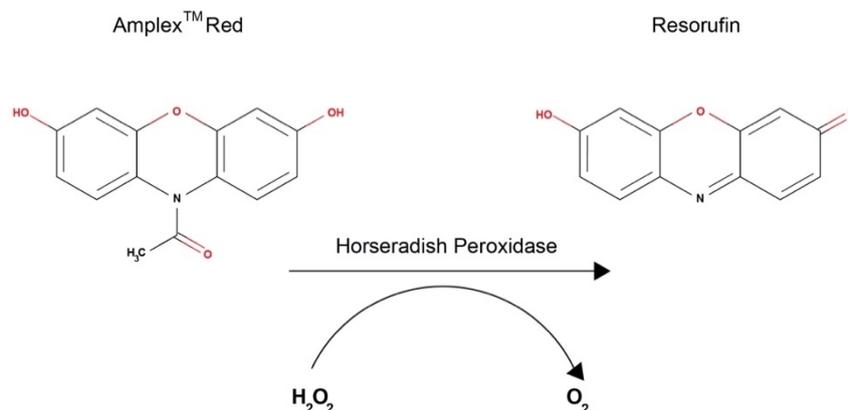


Abbildung 27 Konversion von Amplex Red.

Amplex Red wird zu Resorufin in der Anwesenheit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt (Karakuzu et al., 2019).

3.2.13.2 Allgemeiner Versuchsablauf der Amplex Red-Messungen

Zur Messung des extrazellulären H_2O_2 -Signals wurden auf schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten in 100 μ L DMEM klar (5 % FCS, 8,25 mM) 20.000 SH SY5Y Zellen ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert. Zur optischen Kontrolle der Morphologie der Zellen vor Durchführung der Messungen wurden pro belegter 96-Well Mikrotiterplatte gleichzeitig zwei Wells mit Zellen in einer durchsichtigen Platte ausgesät. 20.000 Zellen pro Well wurden gewählt, da diese Zellzahl im linearen Bereich des Resorufin-Signals lag (Anhang Tab. 26). Aufgrund der hohen Reaktivität des Amplex Red mit anderen Stoffen, wie zum Beispiel DMSO, und

der damit möglichen Entstehung von Messartefakten wurde das Hintergrund-Signal der Amplex Red + HRP-Messlösung, durch das Mitführen und Behandeln von Wells ohne Zellen, ermittelt. In die Zell-freien Wells wurden 100 μ L des jeweiligen Mediums gegeben.

Nachdem die SH SY5Y Zellen über Nacht in den schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten angewachsen waren, konnten die Zellen am nächsten Tag für die Amplex Red-Messungen verwendet werden. Als erstes wurde einmal mit 100 μ L DMEM klar (0,1 % FCS, 8,25 mM) gespült. Anschließend erfolgte die jeweilige Behandlung in 100 μ L DMEM klar (0,1 % FCS). Kurz vor Beginn der Messungen wurde die Amplex Red + HRP-Messlösung in Hank's Puffer (8 mM) angesetzt. Zum Starten der Messung wurden 50 μ L Amplex Red + HRP-Messlösung hinzugegeben und für 18 min in einem Abstand von zwei Minuten bei einer Extinktion von 560 nm und Emission von 590 nm mit einem *Gain* von 110 bei 37 °C am Mikroplattenreader Safire2 von Tecan mittels der Software XFLUOR4SAFIREII V 4.62n gemessen (Abb. 28).

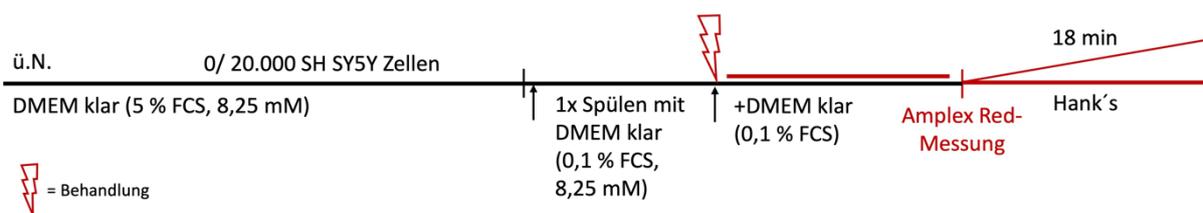


Abbildung 28 Allgemeiner Versuchsablauf der Amplex Red-Messungen.

Nach Belegung der Mikrotiterplatte mit SH SY5Y Zellen oder nur Medium wurde am nächsten Tag einmal gespült, bevor die jeweilige Behandlung erfolgte (roter Blitz). Anschließend wurde das Resorufin-Signal kinetisch gemessen (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

3.2.13.3 Auswertung der Daten in Microsoft Excel

Um den Anstieg des Resorufin-Signals über die Messzeit und somit das extrazellulär vorliegende H₂O₂-Signal zu bestimmen, wurde die Steigung des Resorufin-Signals für jedes Well auf der Mikrotiterplatte anhand der Daten aus den erhaltenen Microsoft Excel-Dateien berechnet. Die Steigung verlief linear über den gesamten Zeitraum der Messung (Anhang Abb. 57). Es wurde nicht die gesamte Zeit der Messung zur Berechnung der Steigung verwendet, sondern die Steigung über den Messzeitraum von zwei bis 10 Minuten betrachtet. Dafür wurde sich entschieden, da das extrazelluläre H₂O₂-Signal möglichst schnell in einem kurzen Zeitraum nach Behandlung der Zellen gemessen werden sollte. Außerdem war das Verhältnis des

Signals der Zellen und der Zell-freien Wells in dem Zeitraum von Minute zwei bei 10 am höchsten mit einem Wert von 1,5 (Anhang Tab. 27).

Anschließend wurde für jeden Versuchstag der Mittelwert der Steigungen des Resorufin-Signals der Wells mit Zellen gebildet. Die Steigungen des Resorufin-Signals der Zellen und der Zell-freien Wells wurden auf diesen Mittelwert normiert. Anschließend erfolgte die Normierung auf die normoglykämische Behandlungsgruppe (8,25 mM). Aus diesen Werten wurden dann die Mittelwerte und die Standardabweichung für die jeweiligen Behandlungsgruppen gebildet und als extrazelluläres H₂O₂ in Prozent dargestellt.

Für die statistische Auswertung der Steigungs-Verhältnisse der Behandlungskombinationen wurde in der Software OriginPro 2023b ein zweiseitiger t-Test aus Stichproben mit unterschiedlicher Varianz für die einzelnen Behandlungsgruppen durchgeführt. Es erfolgte eine Korrektur auf die doppelt verwendete Kontrolle (8,25 mM). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit soll der Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit im Zellkultur-Medium, wie langzeitige Hypo- und Hyperglykämie oder kurzzeitiger Glucose-Entzug, auf die Produktion von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (RONS) der SH SY5Y Zellen untersucht werden. Daher wurden zunächst die in den SH SY5Y Zellen vorkommenden Komponenten des „RONS-Netzwerks“, wie die NADPH-Oxidasen, die Myeloperoxidase, als RONS-Quellen, und die Superoxid-Dismutase 3, als antioxidatives Enzym, charakterisiert und lokalisiert.

4.1 Protein-Nachweis und Lokalisation der NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen (NOX) gelten neben Mitochondrien als Hauptquelle für kontrollierte ROS-Produktion. Die meisten NOX-Isoformen bilden Superoxid, ein Redox-Signalmolekül. Durch die Modifikation von Redox-sensitiven Zielproteinen können NOX-produzierte ROS auf eine Vielzahl von physiologischen Prozessen Einfluss nehmen und die metabolische Programmierung von Zellen modulieren (Pecchillo Cimmino et al., 2023).

Um die Funktion der NOX interpretieren zu können, ist der Nachweis und die Charakterisierung der NOX-Isoformen unerlässlich. Der Nachweis von membrangebundenen Proteinen, wie den NOX, ist jedoch aufgrund ihrer geringen Häufigkeit, ihrer Glykosylierung, ihrer Anfälligkeit gegenüber proteolytischen Abbaus und weiterer Faktoren schwierig. Da ein *Knockdown* (KD) einzelner NOX in Zelllinien durch Kompensationsmechanismen zu Fehlinterpretationen der Funktion der NOX führt (Diebold et al., 2019), wurden die NOX-Isoformen mittels Antikörper in einem Western Blot, ELISA und immunohistologischer Färbung charakterisiert. Die Ergebnisse aller drei Methoden lassen einen Rückschluss auf die Spezifität der verwendeten Antikörper zu und liefern Erkenntnisse zur Verteilung der entsprechenden Proteine.

Die Isoformen der NOX-Familie sind in vielen Geweben von unterschiedlichen Spezies verbreitet. In Säugetieren existieren sieben Genprodukte und zusätzliche *Splice*-Varianten (Aguirre & Lambeth, 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden daher so ausgewählt, dass sie bereits in einer Vielzahl von Geweben und Zelllinien getestet wurden, so dass eine hohe Anzahl von Referenzen vorliegt (bis zu 41 Studien) und die Antikörper alle existierenden *Splice*-Varianten ihrer jeweiligen NOX-Isoform erkennen, ohne an andere Antigene zu binden. Des Weiteren wurde

beachtet, dass die ausgewählten Antikörper für die Anwendung in allen drei Methoden vom Hersteller als geeignet eingestuft wurden.

Zu der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie SH SY5Y gibt es in der Literatur bisher nur wenige Arbeiten, welche die Expression der NOX betrachteten. Meist wurden dabei nur vereinzelte Isoformen untersucht. Darunter vor allem die NOX2 und NOX4 (Auer et al., 2017; Nikolova et al., 2005). Die NOX-Isoform NOX3 wurden nicht nur bei der Betrachtung der Zelllinie SH SY5Y, sondern in der gesamten Literatur bisher außer Betracht gelassen, trotz der hohen Sequenz-Ähnlichkeit zu NOX2 von 59 % (uniprot.org, Stand: 01.07.2024) und ihrer Funktion bei der Zell-Proliferation und Vermittlung von Signalen (Herb, 2024).

4.1.1 Protein-Nachweis der NOX mittels Western Blot und ELISA

Im Western Blot (Abb. 29) konnten in den mitgeführten Negativ-Kontrollen der verwendeten sekundären Antikörper (BLANK) gegen die Spezies *rabbit* (rb) und *mouse* (ms) keine Banden festgestellt werden. Die Antikörper gegen die NOX1 und DUOX1 wiesen auch keine Banden auf. Banden der Antikörper gegen die NOX2-Untereinheit gp91^{phox}, NOX3, NOX4, NOX5 und DUOX2 konnten in den SH SY5Y Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse von Auer et al. (2017) der NOX4-Expression im Western Blot in den SH SY5Y Zellen und die Expression der NOX2 auf mRNA-Ebene von Nikolova et al. (2005), hier auf Protein-Ebene.

Der Antikörper gegen die NOX2-Untereinheit gp91^{phox} wurde entsprechend der Herstellerangaben bei einem Molekulargewicht von 75 bis 91 kDa, getestet in der humanen Zelllinie HL60 aus Membran-Lysat, erwartet. In dieser Arbeit wurde eine Bande bei etwa 55 kDa detektiert. Aufgrund der Anfälligkeit der NOX gegenüber proteolytischen Abbaus (Diebold et al., 2019), könnte die detektierte Bande auf enzymatische Verdauung des Enzyms nach Entfernung der Kohlenhydratkette zurückgeführt werden. Nach diesem Prozess liegt das Molekulargewicht der NOX2-Untereinheit gp91^{phox} bei etwa 50 kDa (Bedard & Krause, 2007).

Der NOX3-Antikörper detektierte eine starke Bande bei etwa 60 kDa, drei schwächere Banden zwischen 60 und 70 kDa, eine stärkere Bande unterhalb von 55 kDa, mehrere schwache Banden zwischen 100 und 130 kDa und drei schwächere Banden wurden zwischen 62 und 64 kDa detektiert. Erwartet wurden entsprechend der Herstellerangaben und der Literatur, getestet in den Zelllinien HEK293, HeLa, BEAS-

2B und ESCC, Banden zwischen 60 bis 65 kDa und zusätzliche schwache Banden zwischen 100 und 130 kDa (abcam; Bang et al., 2023; Liu et al., 2020). Damit stimmen die in dieser Arbeit detektierten Banden bei 60 bis 64 kDa und 100 bis 130 kDa mit den Ergebnissen des Herstellers und der Literatur überein. Die Banden bei 100 bis 130 kDa könnten durch eine Zusammenlagerung der NOX3-Untereinheit mit der Untereinheit p22^{phox}, welche für die Stabilität und den Transport zur Membran benötigt wird, erklärt werden (Nakano et al., 2007). Die Banden oberhalb und unterhalb der 60 kDa könnten auf das Vorliegen von glykosylierten und nicht-glykosylierten Formen der NOX3 zurückgeführt werden. Eine Glykosylierung kann einen Unterschied von drei bis sieben Kilodalton ausmachen (Matsumoto et al., 2014).

Der Antikörper gegen die NOX4 wies eine schwache Bande zwischen 100 und 130 kDa auf. Die NOX4, im Gegensatz zu anderen NOX-Isoformen, neigt dazu zu aggregieren (Wilkins et al., 1999). In der Literatur wurden aufgrund dessen bereits Banden der NOX4 zwischen 100 und 170 kDa in HEK293 Zellen nachgewiesen (Prior et al., 2016), welches mit den Ergebnissen dieser Arbeit in den SH SY5Y Zellen übereinstimmt.

Die Bande der DUOX2 bei 100 kDa entsprach einem geringeren Molekulargewicht als vom Hersteller im Zell-Lysat der humanen Lungen-Karzinom Zelllinie A549 und humaner T-Lymphoblasten-Zellen CCRF-CEM getestet (130 kDa). Dies könnte auf das Vorliegen eines anderen Glykosylierungszustands in den SH SY5Y Zellen als in den vom Hersteller verwendeten Zelllinien, hindeuten. Eine Deglykosylierung führt zu einer Reduktion des Molekulargewichts (Morand et al., 2004).

Die starke Bande des NOX5-Antikörpers bei etwa 30 kDa (Abb. 29), könnte auf das Vorliegen der verkürzten *Splice*-Variante ϵ hindeuten, welche ein Molekulargewicht von 55 kDa, in der Fibroblasten-Zelllinie COS-7, aufweist (Pandey et al., 2012). Zusätzlich könnte eine Degradierung der NOX5 stattgefunden haben. Dies könnte die Abweichung zu dem erwarteten Molekulargewicht von 86 kDa, ermittelt vom Hersteller in den Zelllinien 22RV1, PANC, SKOV und HeLa, erklären.

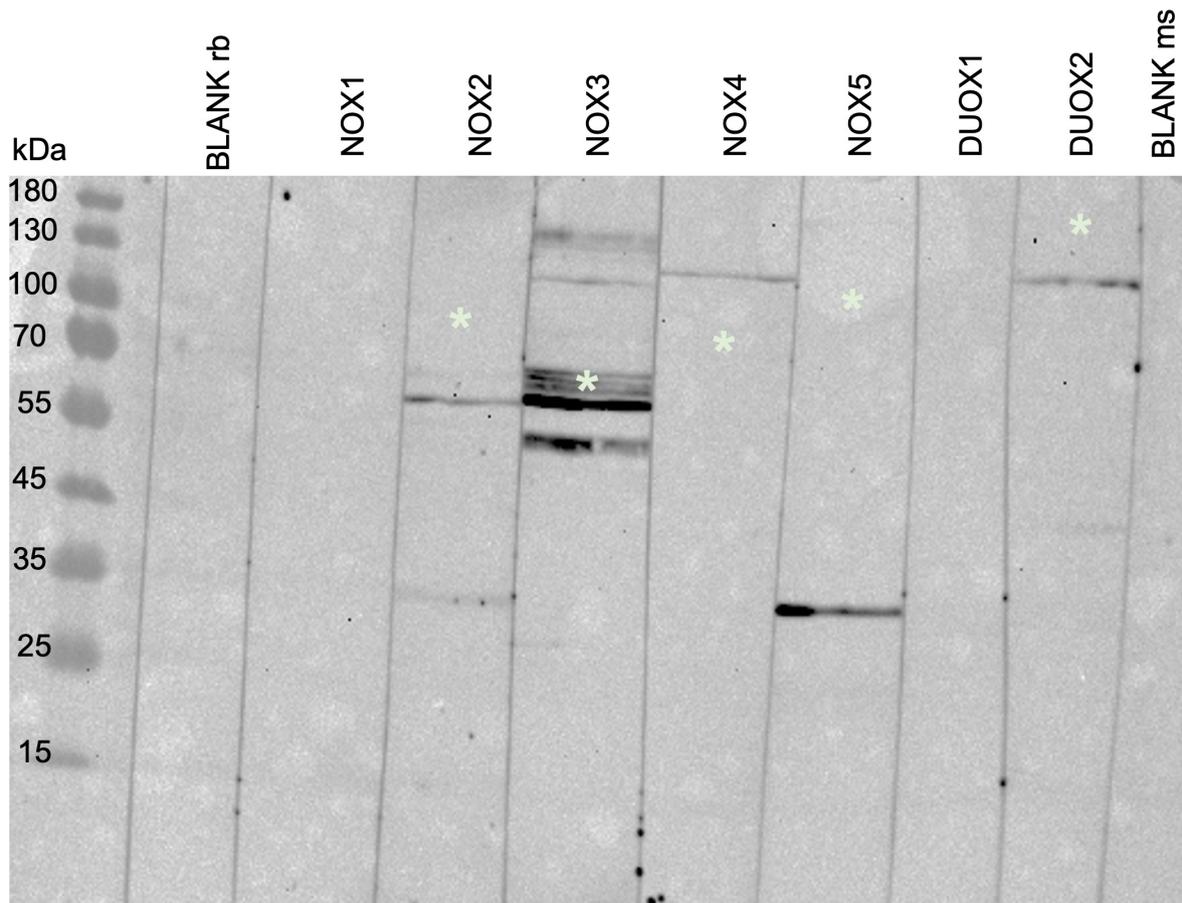


Abbildung 29 Proteinnachweis der NADPH-Oxidasen in den SH SY5Y Zellen.

Das Zell-Homogenat wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Dargestellt wurden die einzelnen Streifen der Nitrozellulosemembranen, welche mit den primären Antikörpern der NOX-Isoformen NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 und DUOX2 inkubiert wurden. Alle primären Antikörper wurden 1:500 eingesetzt. Die verwendeten sekundären Peroxidase-Antikörper wurden mittels Chemilumineszenz-Reaktion (Pierce ECL) detektiert. Die Belichtungszeit betrug eine Minute. Mitgeführt wurde der *Prestained Protein Ladder Marker* (15 bis 180 kDa) als Größenstandard. BLANK rb und BLANK ms beschreiben die Kontrollen für den sekundären Peroxidase-Antikörper Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase (A0545) (1:20.000) und Anti-Mouse-IgG-Peroxidase (A9044) (1:20.000) gegen die beiden Spezies *rabbit* (rb) und *mouse* (ms) der primären Antikörper. Die Sterne kennzeichnen, die anhand der Literatur und Herstellerangaben erwarteten Größen der Banden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Die Durchführung des Western Blots diente einem ersten Nachweis, welche NOX-Isoformen in der hier verwendeten Zelllinie SH SY5Y existieren. Um die Möglichkeit einer Quantifizierung der unterschiedlichen NOX-Isoformen zu ermitteln, wurde das Signal-Rausch-Verhältnis der Antikörper zum Hintergrund des sekundären Antikörpers im ELISA getestet.

Die Ergebnisse des ELISAs ergaben, dass bei 10.000 SH SY5Y Zellen pro Well das Signal des NOX1- und NOX4-Antikörpers im Bereich des Hintergrund-Rauschens des sekundären Antikörpers lag. Die Signale der Antikörper gegen DUOX1 und DUOX2

lagen bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1,8. Im Western Blot lieferte der DUOX1-Antikörper keine Bande. Der Antikörper gegen die NOX2-Untereinheit gp91^{phox} ergab ein Signal-Rausch-Verhältnis von 2. Die NOX3 konnten mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 11,6 und die NOX5 mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 7 detektiert werden (Anhang Tab. 21). Damit unterstützen die Ergebnisse des ELISAs die im Western Blot ermittelten Expressionsstärken der NOX2, 3 und 5 und zeigen, dass eine Quantifizierung dieser drei NOX-Isoformen mittels ELISA und den verwendeten Antikörpern möglich ist.

4.1.2 Immunohistologische Lokalisation der NOX

Die NOX-Isoformen NOX2, NOX3 und NOX5 wiesen in den SH SY5Y Zellen die höchsten Expressionsraten im Western Blot und ELISA auf. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung dieser NOX-Isoformen die subzelluläre Lokalisation in den SH SY5Y Zellen mittels immunohistologischer Färbung untersucht. Die Lokalisierung der NOX bietet zusätzlich zu den Ergebnissen des Western Blots und ELISAs eine wichtige Bestätigung der Antikörper-Spezifität.

Die subzelluläre Lokalisation der NOX-Isoformen variiert je nach Zelltyp und kann im Cytoplasma, intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran auftreten (Pecchillo Cimmino et al., 2023). Laut der Literatur werden NOX2 im Menschen und NOX3 in Mäusen vor allem in der Plasmamembran exprimiert (Belarbi et al., 2017; Nakano et al., 2007). NOX5 kommen überwiegend in intrazellulären Kompartimenten humaner Zellen vor (Touyz et al., 2019). Bisher gab es keine Literatur zur subzellulären Lokalisation der NOX2, 3 und 5 spezifisch in der SH SY5Y Zelllinie.

Der Antikörper gegen die NOX2-Untereinheit gp91^{phox} zeigte eine Färbung vor allem in den Dendriten-ähnlichen Ausläufern der Zellen (Abb. 30 A, a und b Pfeile), welches die Erkenntnisse aus der Literatur unterstützt. Der NOX5-Antikörper zeigte auch Färbungen in den Dendriten-ähnlichen Ausläufern, so dass auf eine Lokalisation der NOX5 in der Plasmamembran der SH SY5Y Zellen geschlossen werden könnte (Abb. 30 C, e und f Pfeile). Die detektierte Färbung des NOX3-Antikörpers direkt am Zellkern und im Cytoplasma lässt auf eine Lokalisation der NOX3 im endoplasmatischen Retikulum (ER), welches sich von der Membran des Nukleus durch das gesamte Cytoplasma erstrecken kann, schließen (Kaisto, 2003) (Abb. 30 B, c und d Pfeile). Die Negativ-Kontrollen (BLANK) zeigten keine Färbungen (Abb. 30 D-F).

Die mit den Antikörpern erhaltenen Lokalisationen in den SH SY5Y Zellen stimmen mit den wenigen, bisher bekannten Ergebnissen anderer Zelllinien überein. Damit können die gewählten Antikörper, welche bereits in vielen Publikationen verwendet wurden, für die Detektion der NOX2, 3 und 5 in der SH SY5Y Zelllinie verwendet werden.

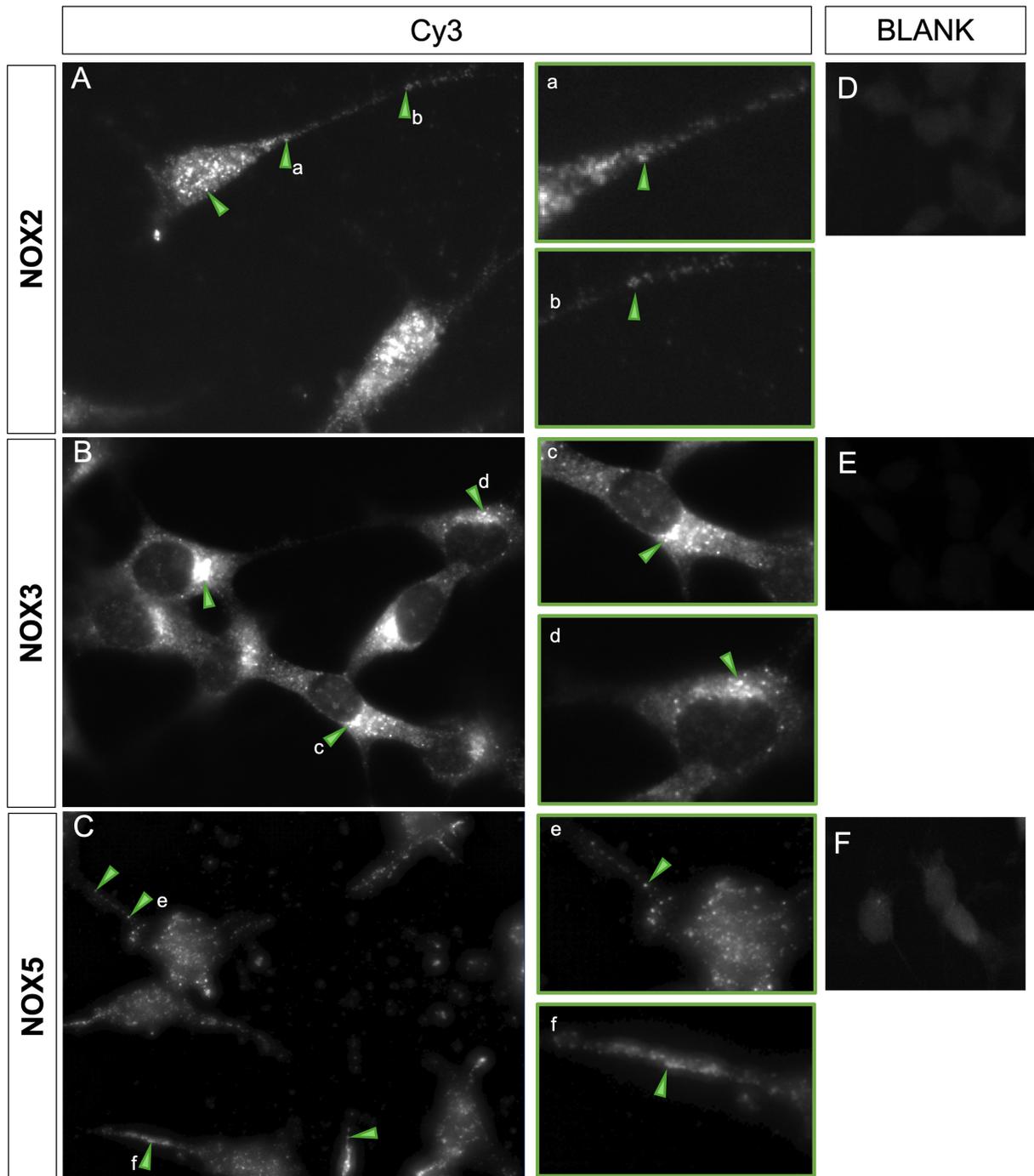


Abbildung 30 Subzelluläre Lokalisation der NOX2, NOX3 und NOX5 in den SH SY5Y Zellen.

Beispielaufnahmen histologischer Färbungen, 630x Vergrößerung, Belichtungszeit 200 ms, 2x2 *Binning*. **A-C**: Beispielaufnahmen der Zellen, welche mit den primären Antikörpern anti-gp91-phox (#07-024) (1:100), Anti-NOX3 *antibody* (ab81864) (1:200) oder Anti-NOX5 *antibody* C-terminal (ab191010) (1:200) sowie dem sekundären Cy3-Antikörper gefärbt wurden. **a-f**: Vergrößerte Ausschnitte der Beispielaufnahmen im Cy3-Kanal der Färbung der NOX2, NOX3 und NOX5 aus A-C. **D-F**: Kontrollen des sekundären Cy3-Antikörpers (BLANK), welche nur mit dem sekundären Cy3 Anti-Rabbit IgG Antikörpers (1:1.000) gefärbt wurden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

4.2 Lokalisation der Myeloperoxidase

Neben den Mitochondrien und den NADPH-Oxidasen als Hauptquellen der ROS-Produktion gibt es noch weitere Quellen für RONS, welche an der Regulation von metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, beteiligt sein können. Dazu zählt die Myeloperoxidase (MPO) (Qaddoumi et al., 2020). Die MPO katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Chlorid zu Hypochlorsäure (HOCl) (Chen et al., 2020). Die Myeloperoxidase wird im menschlichen Gehirn und den humanen Neuroblastoma-Zelllinien SK-N-SH und SK-5SY, aus welchen die SH SY5Y Zelllinie hervorgegangen ist, exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation der MPO in den SK-N-SH und SK-5SY Zelllinien wurde in dieser Publikation nicht ermittelt (Green et al., 2004). Die MPO wurde jedoch bereits in anderen humanen Zellen im Nukleus und in der perinukleären Region lokalisiert (Okada et al., 2016; Shimomura et al., 2016).

Um die subzelluläre Lokalisation der MPO in den SH SY5Y zu untersuchen und diese mit den Erkenntnissen aus der Literatur zu vergleichen, wurde eine immunhistologische Färbung mit einem MPO-Antikörper durchgeführt, welcher bereits in vielen Studien (17) in humanen Zelllinien und Gewebe getestet wurde.

Der MPO-Antikörper zeigte eine punktförmige Färbung im Bereich des Nukleus der SH SY5Y Zellen (Abb. 31 A Pfeile). Diese Beobachtung wurde mittels einer Doppelfärbung des MPO-Antikörpers mit DAPI unterstützt, da die punktförmige Färbung des MPO-Antikörpers nur im Bereich der DAPI-Färbung, und damit des Nukleus, auftrat (Abb. 31 B). In der Negativ-Kontrolle (BLANK) war keine Färbung erkennbar (Abb. 31 C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Myeloperoxidase in den SH SY5Y exprimiert wird und im Bereich des Nukleus lokalisiert ist, so dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Erkenntnisse aus der Literatur unterstützen. Damit kann der MPO-Antikörper in der Zelllinie SH SY5Y verwendet werden.

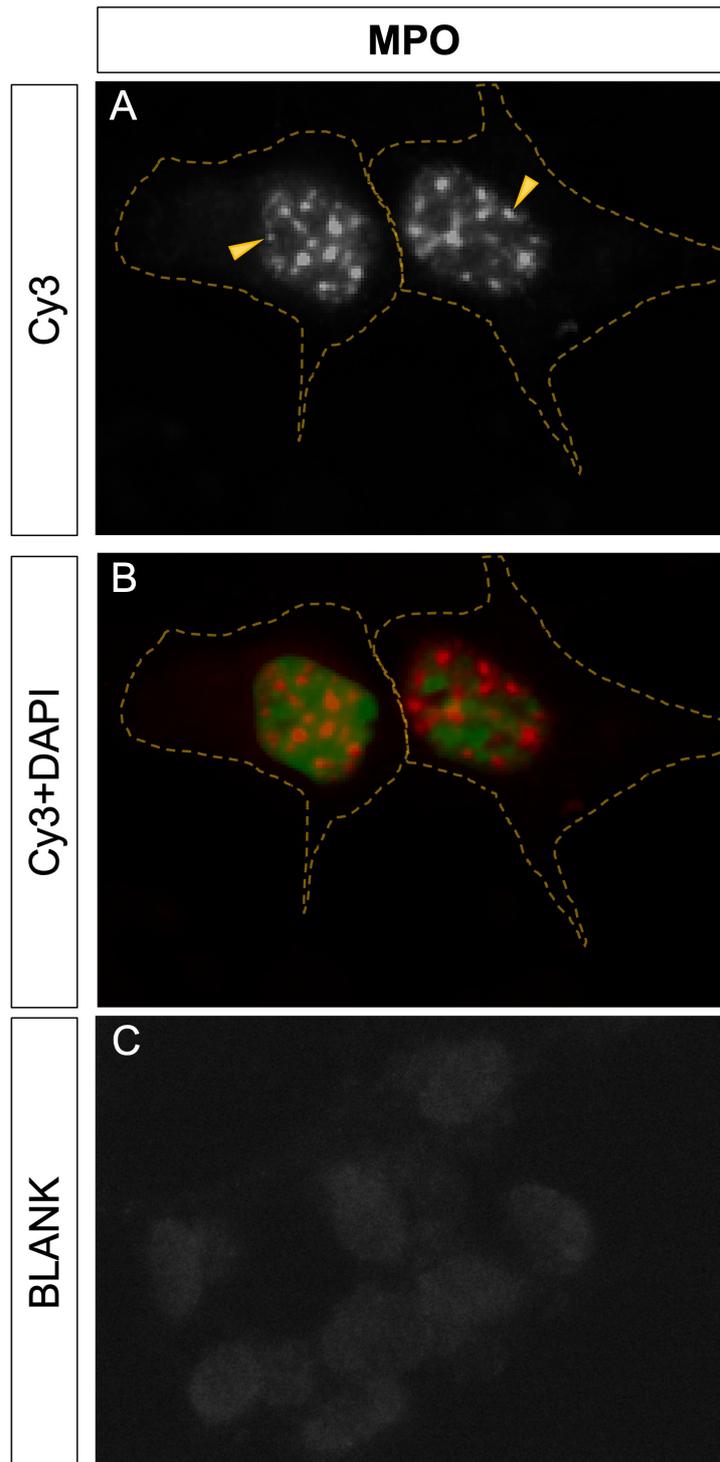


Abbildung 31 Subzelluläre Lokalisation der Myeloperoxidase (MPO) in den SH SY5Y Zellen.

Beispielaufnahmen histologischer Färbungen, 630x Vergrößerung, Belichtungszeit von 200 ms für den primären Anti-Myeloperoxidase Antikörper und 100 ms für DAPI, 2x2 *Binning*. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Zellgrenzen. **A:** Beispielaufnahmen der Zellen, welche mit den primären Antikörpern Anti-Myeloperoxidase *antibody* (ab45977) (1:500) gefärbt wurden. **B:** Doppelfärbung mit dem primären Anti-Myeloperoxidase Antikörper (rot) und DAPI (1 µg/mL) (grün). **C:** Kontrolle des sekundären Cy3-Antikörpers (BLANK), welche nur mit dem sekundären Cy3 Anti-Rabbit IgG Antikörpers (1:1.000) gefärbt wurden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint)

4.3 Lokalisation der Superoxide-Dismutase 3

Um das Redox-Gleichgewicht und somit die Funktion Redox-sensitiver Signalmoleküle aufrechtzuerhalten, benötigt es neben der Produktion von RONS die Eliminierung von überschüssigen RONS durch antioxidative Enzyme (Trachootham et al., 2008). Dazu zählt die Familie der Superoxid-Dismutasen bestehend aus der SOD1, welche im Cytoplasma zu finden ist, der SOD2, welche in den Mitochondrien exprimiert wird, und der extrazellulär und in der Plasmamembran vorkommenden SOD3 (Vaziri et al., 2003). In der Literatur wurde bisher nur die Expression und Lokalisation der SOD1 in den SH SY5Y Zellen untersucht (Rizza et al., 2015). Um das mögliche Zusammenspiel der in der Plasmamembran detektierten NOX2 und NOX5 mit der extrazellulären SOD3 in SH SY5Y Zellen zu charakterisieren, wurde eine immunhistologische Färbung mit einem SOD3-Antikörper durchgeführt. Der SOD3-Antikörper wurde gewählt, da dieser bereits in verschiedenen Geweben und Zelllinien unterschiedlichster Spezies verwendet wurde und jeweils eine hohe Spezifität aufwies. Eine deutliche Färbung des SOD3-Antikörpers war in den Dendriten-ähnlichen Ausläufern und im Zellkörper der SH SY5Y Zellen zu erkennen (Abb. 32 A und a Pfeile). Der SOD3-Antikörper lieferte im Nukleus, ermittelt anhand einer Doppelfärbung mit DAPI, keine Färbung (Abb. 32 B). In der Negativ-Kontrolle (BLANK) war keine Färbung sichtbar (Abb. 32 C).

Diese Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse aus der Literatur, dass die SOD3 in der Plasmamembran lokalisiert ist, und zeigen die Spezifität des SOD3-Antikörpers in den SH SY5Y Zellen.

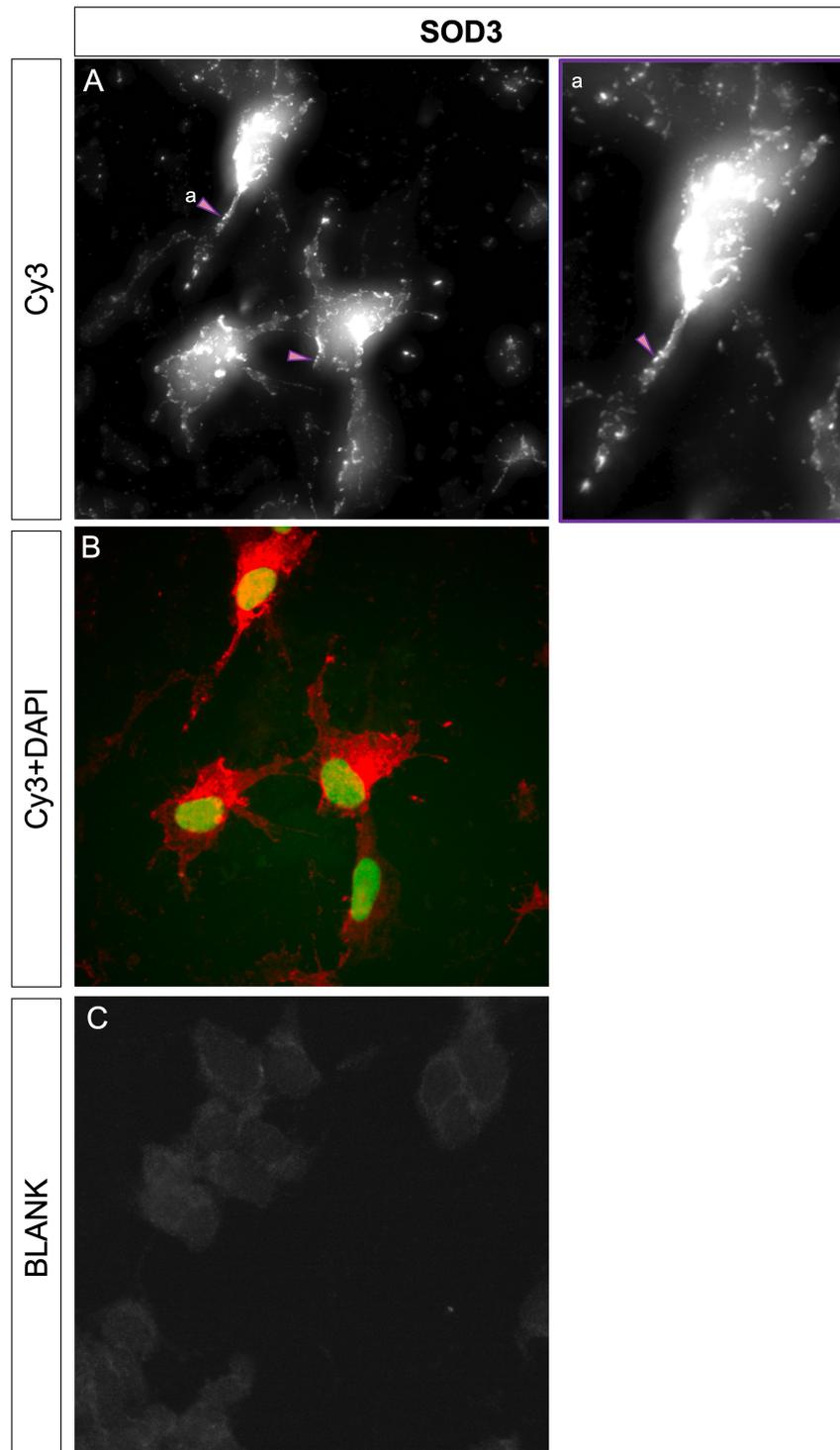


Abbildung 32 Subzelluläre Lokalisation der Superoxid-Dismutase 3 (SOD3) in den SH SY5Y Zellen.

Beispielaufnahmen histologischer Färbungen, 630x Vergrößerung, Belichtungszeit von 70 ms für den primären SOD3 Antikörper und 8 ms für DAPI. **A:** Beispielaufnahmen der Zellen, welche mit den primären Antikörpern SOD3 *antibody* (PA5-102904) (1:500) gefärbt wurden. **a:** Vergrößerter Ausschnitt der Beispielaufnahme im Cy3-Kanal der SOD3-Färbung aus A. **B:** Doppelfärbung mit dem primären SOD3-Antikörper (rot) und DAPI (1 µg/mL) (grün). **C:** Kontrolle des sekundären Cy3-Antikörpers (BLANK), welche nur mit dem sekundären Cy3 Anti-Rabbit IgG Antikörpers (1:1.000) gefärbt wurden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Anhand der Charakterisierung der NOX2, NOX3 und NOX5 sowie der MPO als RONS-produzierende Enzyme und der SOD3 als antioxidatives Enzym ergibt sich das in Abbildung 33 dargestellte Schema zur subzellulären Lokalisation dieser Enzyme in den SH SY5Y Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Myeloperoxidase die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Hypochlorsäure im Nucleus der Zellen katalysiert. Die NOX3 stellen neben der mitochondrialen Atmungskette eine intrazelluläre Quelle für Superoxid dar. Die NOX2 und NOX5 produzieren Superoxid in den extrazellulären Raum, wo dieses NOX-produzierte Superoxid durch die SOD3 in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden kann (Abb. 33).

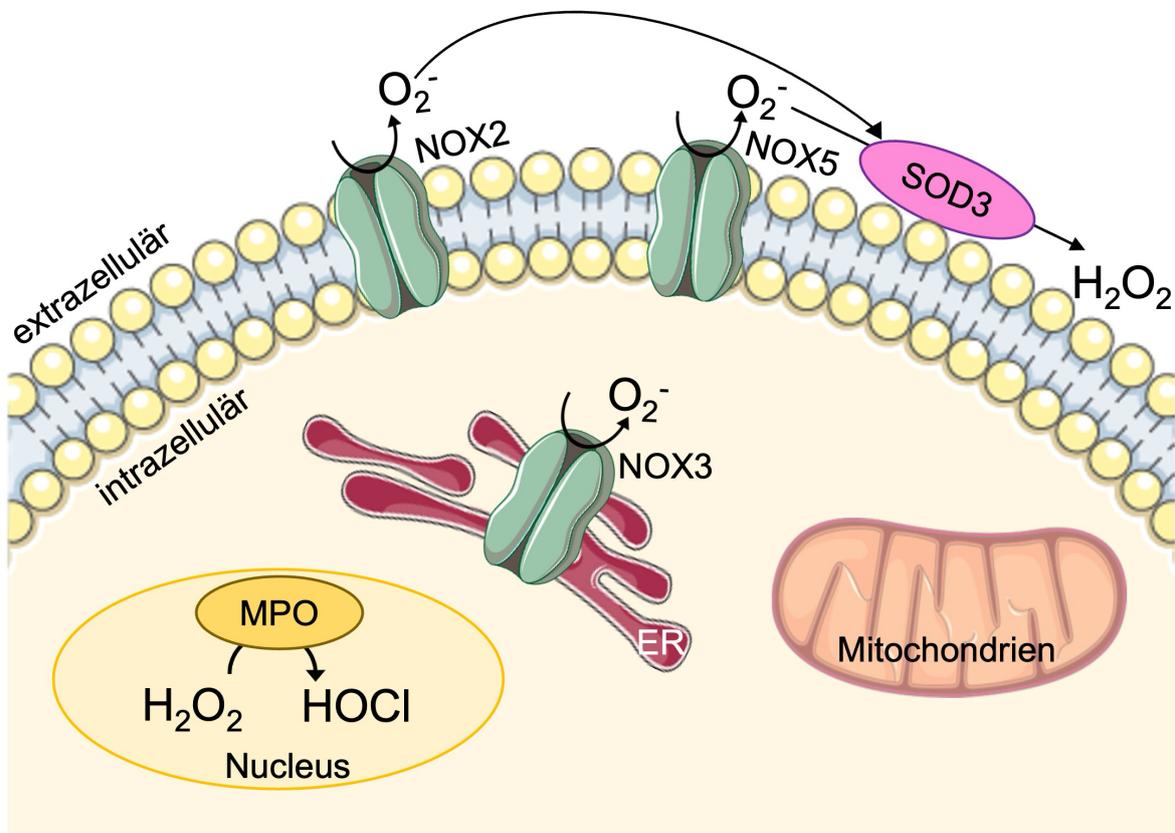


Abbildung 33 Subzelluläre Lokalisation der NOX2, NOX3 und NOX5, der MPO und der SOD3 in den SH SY5Y Zellen.

Aufgrund der Ergebnisse der histologischen Färbungen wurden die Myeloperoxidase (MPO) im Nucleus, die NOX3 im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie die NOX2, NOX5 und Superoxid-Dismutase 3 (SOD3) in der Plasmamembran lokalisiert (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

4.4 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie

Chronische Hypo- oder Hyperglykämie bei Diabetes mellitus (DM) führen zu einer veränderten Produktion von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (RONS), welche aufgrund der Funktion von RONS als Signalmoleküle pathophysiologische Folgen, wie die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, hat.

Zur Untersuchung des Einflusses langzeitiger Hypo- und Hyperglykämie auf die SH SY5Y Zellen wurden die Zellen über 24 und 48 Stunden (h) in DMEM (0,1 % FCS) mit drei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen kultiviert. Um hypoglykämische Bedingungen zu schaffen, enthielt das Zellkultur-Medium 2 mM Glucose. Für hyperglykämische Bedingungen wurde eine Glucose-Konzentration von 16,5 mM gewählt. Eine Normoglykämie entsprach einer Glucose-Konzentration von 8,25 mM im Medium. Die gewählten Glucose-Konzentrationen orientierten sich an den Werten im Menschen. Sinkt der Blut-Glucose-Wert unter 2,8 mM liegt eine Hypoglykämie vor. Ein Blut-Glucose-Wert von über 10 mM gilt als Hyperglykämie und eine Normoglykämie wird definiert durch einen Blut-Glucose-Wert von 8 mM (Bonds et al., 2012; Jacob et al., 2002; Robertson et al., 2003).

4.4.1 Hypo- und Hyperglykämie wirken sich auf den Glucose-Verbrauch und die Laktat-Produktion aus

Eine Veränderung der Verfügbarkeit von Glucose, verursacht durch Hypo- oder Hyperglykämie bei falsch eingestellter oder unbehandelter Diabetes mellitus, kann zu einer Kompensation durch andere Energieträger wie Pyruvat oder L-Glutamin führen und sich auf den Energiemetabolismus und damit auf zelluläre Komponenten, wie die Mitochondrien und dadurch auf die Produktion von ATP und ROS auswirken. In der Literatur wurde bisher gezeigt, dass in SH SY5Y Zellen L-Glutamin, die am effizientesten verbrauchte Aminosäure ist (Sakagami et al., 2017).

Neben Energieträgern wie Glucose, Pyruvat oder L-Glutamin wird dem Zellkultur-Medium Fetales Kälber Serum (FCS) hinzugegeben. FCS enthält undefinierte Mengen von Energieträgern wie Aminosäuren, Fettsäuren oder Glucose (Lee et al., 2022). Um die Menge der Energieträger im Zellkultur-Medium besser definieren zu können, wurden die Behandlungen der Zellen mit einer FCS-Konzentration im Medium von 0,1 % durchgeführt. Zu beachten ist, dass sich eine Reduktion der FCS-Konzentration im Zellkultur-Medium auf den Verbrauch der Energieträger durch die SH SY5Y Zellen

auswirkt. Es kommt zu einem schnelleren Verbrauch von Glucose und einer erhöhten Laktat-Produktion (Kronenberger et al., 2024).

Um den Energiemetabolismus der SH SY5Y Zellen unter langzeitiger Hypo- und Hyperglykämie zu charakterisieren, wurden die Konzentrationsänderungen von Glucose, Laktat, Pyruvat und L-Glutamin im Medium-Überstand ermittelt. Dazu wurde ein Amplex Red Assay verwendet, der in Kombination mit einer spezifischen Oxidase für den jeweiligen Energieträger eine Quantifizierung von Glucose, Laktat, Pyruvat und L-Glutamin ermöglicht. Das Zellkultur-Medium mit 0,1 % FCS wurde über den gesamten Inkubationszeitraum von 48 h nicht gewechselt.

Zur methodischen Kontrolle wurden Wells ohne Zellen mitgeführt. Während der gesamten Inkubationszeit gab es keine Änderungen der Energieträger-Konzentrationen im Medium-Überstand der Zell-freien Wells (Anhang Tab. 19). Damit sind alle Änderungen der Energieträger im Medium-Überstand auf die SH SY5Y Zellen zurückzuführen.

Die Glucose-Konzentration im Medium-Überstand der Zellen nahm bei allen Bedingungen in den ersten 24 h signifikant ab. 2 mM Glucose wurden dabei innerhalb von 24 h aufgebraucht, so dass den Zellen nach 48 h keine Glucose mehr zur Verfügung stand. Zellen, welche mit 8,25 mM Glucose im Medium starteten, verbrauchten in den ersten 24 h etwa 2,7 mM Glucose. Zellen, welche 16,5 mM Glucose erhielten, verbrauchten etwa 4 mM Glucose innerhalb von 24 h. Die Glucose-Konzentration im Medium-Überstand von Zellen, welchen 8,25 mM und 16,5 mM Glucose zur Verfügung standen, nahm nach 48 h weiter signifikant um weitere 3 mM ab (Abb. 34 A). Die Laktat-Produktion der SH SY5Y Zellen stieg mit zunehmenden Glucose-Verbrauch der Zellen, welche 8,25 mM und 16,5 mM Glucose erhielten, kontinuierlich im Medium-Überstand an. Dabei kam es nach 24 h zu einer signifikanten Zunahme der Laktat-Produktion um etwa 7 mM. Nach 48 h nahm die Abgabe von Laktat in den Medium-Überstand mit 8,25 und 16,5 mM weiter signifikant zu und stieg auf etwa 20 mM Laktat an. SH SY5Y Zellen, welchen 2 mM Glucose über 48 h zur Verfügung standen, produzierten innerhalb der ersten 24 h signifikant mehr Laktat im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h. Nach 48 h stagnierte die Laktat-Abgabe in den Medium-Überstand (Abb. 34 B). Die Konzentrationen von Pyruvat und L-Glutamin im Medium-Überstand der Zellen zeigten über die Zeit von 48 h keine signifikanten Änderungen (Abb. 34 C und D).

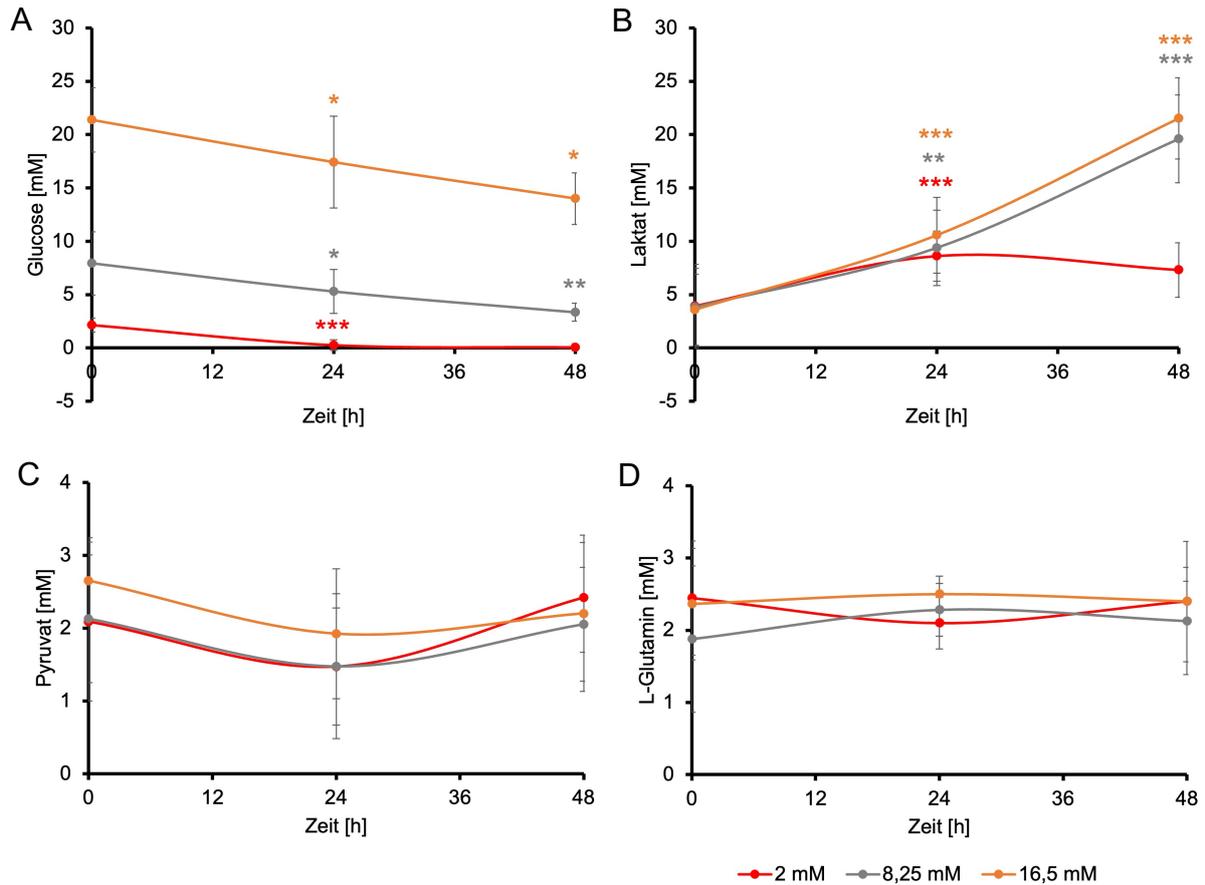


Abbildung 34 Glucose-, Laktat-, Pyruvat- und L-Glutamin-Konzentration im Medium-Überstand der SH SY5Y Zellen nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose über 48 h.

Aufgetragen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen von Glucose (A), Laktat (B), Pyruvat (C) und L-Glutamin (D) in mM gegen die Zeit in Stunden (h). Die Konzentrationen von Glucose, Laktat, Pyruvat und L-Glutamin wurden im Medium-Überstand zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 h gemessen mittels Amplex Red Assay und der jeweiligen Oxidase. Die Anzahl der gemessenen Wells beträgt n=12. (Statistik: zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben: $p_{16,5 \text{ mM Glucose } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}=0,0162$; $p_{16,5 \text{ mM Glucose } 24 \text{ vs } 48 \text{ h}}=0,0254$; $p_{8,25 \text{ mM Glucose } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}=0,0191$; $p_{8,25 \text{ mM Glucose } 24 \text{ vs } 48 \text{ h}}=0,0084$; $p_{2 \text{ mM Glucose } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}<0,001$; $p_{16,5 \text{ mM Laktat } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}<0,001$; $p_{16,5 \text{ mM Laktat } 24 \text{ vs } 48 \text{ h}}<0,001$; $p_{8,25 \text{ mM Laktat } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}=0,0054$; $p_{8,25 \text{ mM Laktat } 24 \text{ vs } 48 \text{ h}}<0,001$; $p_{2 \text{ mM Laktat } 0 \text{ vs } 24 \text{ h}}<0,001$) (eigene Abbildung).

Als Standard wird in der Literatur der Verbrauch von Energieträgern in fmol pro Zelle pro Stunde angegeben. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen aus der Literatur zu gewährleisten, wurden die Werte des Verbrauchs von Glucose, Pyruvat und L-Glutamin sowie die Produktion von Laktat der SH SY5Y Zellen in fmol/Zelle/h für die Messzeitpunkte 24 und 48 h umgerechnet und in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Verbrauchsraten von Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und die Produktionsrate von Laktat der SH SY5Y Zellen.

Die Werte repräsentieren den Verbrauch und die Produktion in fmol pro Zelle pro Stunde für das 0-24 h und das 0-48 h Zeitfenster, dividiert durch 24 bzw. 48.

Inkubationszeit	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Glucose- Verbrauchs-Rate	272,36	362,86	538,68	181,80	298,98	505,57
Pyruvat- Verbrauchs-Rate	89,36	90,25	98,94	-28,72	4,99	30,71
L-Glutamin- Verbrauchs-Rate	50,03	-119,28	-18,66	3,91	-16,26	-2,47
Laktat- Produktions-Rate	678,61	769,52	950,46	295,29	1034,11	1228,63

Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein. SH SY5Y Zellen, behandelt in DMEM klar (0,1 % FCS), verwenden Pyruvat und L-Glutamin nicht als alternative Energieträger (Kronenberger et al., 2024). Da entsprechend dem Verbrauch von Glucose Laktat in den Medium-Überstand abgegeben wurde, deutet dies auf eine überwiegend anaerobe Energiegewinnung über die Glykolyse hin.

4.4.2 Hypoglykämie beeinflusst die mitochondriale ATP-Produktion

Glucose und Laktat werden als Energieträger über die zwei Hauptstoffwechselwege, Glykolyse und mitochondriale oxidative Phosphorylierung, (OXPHOS) metabolisiert, die beiden wichtigsten Stoffwechselwege zur ATP-Produktion (Abb. 35 A). Die Daten der Verbrauchsmessungen, welche einen hohen Verbrauch von Glucose und die Abgabe von Laktat ergaben, sowie Befunde aus der Literatur sprechen für die Glykolyse als den bevorzugten Stoffwechselweg zur ATP-Produktion der SH SY5Y Zellen. Bisher gibt es keine Studien zu den Auswirkungen einer langzeitigen Hypo- oder Hyperglykämie auf die Stoffwechselwege von SH SY5Y Zellen.

Zur Untersuchung, ob sich die Glucose-Konzentration im Medium auf den Beitrag der zwei Hauptstoffwechselwege der ATP-Produktion auswirkt, wurde ein Seahorse ATP Rate Assay durchgeführt. Die SH SY5Y Zellen wurden dafür mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h behandelt. Vor Beginn der Messung erhielten die Zellen

frisches XF DMEM, so dass den Zellen alle Energieträger in physiologischen Konzentrationen wieder zur Verfügung standen.

Die Viabilität der Zellen nach der Langzeit-Behandlung wurde über die Zellzahl mit Hilfe des Cytation 5 Systems vor der Messung des Seahorse ATP Rate Assays bestimmt. Eine 24-stündige Inkubation mit 2 oder 16,5 mM Glucose führte zu keiner Änderung der Zellzahl im Vergleich zu einer normoglykämischen Behandlung. Nach der Behandlung der Zellen für 48 h mit 2 mM Glucose kam es zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl um 25 % ($p < 0,001$) und die Behandlung mit 16,5 mM Glucose für 48 h führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl um 6 % im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen ($p = 0,0137$) (Anhang Tab. 17). Aufgrund dieser signifikanten Unterschiede wurden alle nachfolgenden Mess-Daten auf die Zellzahl der jeweiligen Behandlung normiert.

Insgesamt produzierten SH SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation in DMEM (0,1 % FCS, 8,25 mM) etwa 330 pmol ATP pro Minute. Es gab keine Unterschiede in der gesamten ATP-Produktion zwischen den drei Glucose-Konzentrationen. Nach 24 h unter hypoglykämischen Bedingungen lag die mitochondriale ATP-Produktion (MitoATP) um 20 % signifikant unter der MitoATP-Produktion der Zellen, welche mit 8,25 mM Glucose inkubiert wurden. Die mitochondriale ATP-Produktion veränderte sich unter hyperglykämischen Bedingungen nicht (Abb. 35 B). Das ATP produziert über die Glykolyse (GlykoATP) zeigte unabhängig von der Glucose-Konzentration im Medium nach 24 h keine Änderungen (Abb. 35 D). Anhand der Energiekarte in Abbildung 35 F ist zu erkennen, dass über 24 h kultivierte Zellen mit 16,5 mM Glucose einen aeroberen Energiephänotyp aufweisen. Hypoglykämisch kultivierte Zellen weisen nach 24 h einen ruhenderen Energiephänotyp auf im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen.

Nach 48 h wurden insgesamt etwa 430 pmol ATP pro Minute durch die SH SY5Y Zellen unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen produziert. Nach einer 48-stündigen Hypoglykämie sank die gesamte ATP-Produktion auf 260 pmol ATP pro Minute. Die Abnahme der gesamten ATP-Produktion unter Hypoglykämie nach 48 h konnte auf die signifikante Reduktion der mitochondrialen ATP-Produktion (MitoATP), um 56 %, und des glykolytisch produzierten ATPs (GlykoATP), um 27 %, im Vergleich zu normoglykämisch behandelten Zellen, zurückgeführt werden. Eine Hyperglykämie hatte keinen Effekt auf die ATP-Produktion über die OXPHOS oder die Glykolyse im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen (Abb. 35 C und E). Die Energiekarte

in Abbildung 35 G zeigt, dass der Energiephänotyp der SH SY5Y Zellen nach einer 48-stündigen Hypoglykämie zu einem stark ruhenden Energiephänotyp wurde, wobei Zellen mit 8,25 und 16,5 mM Glucose einen zunehmend energetischeren Phänotyp aufwiesen.

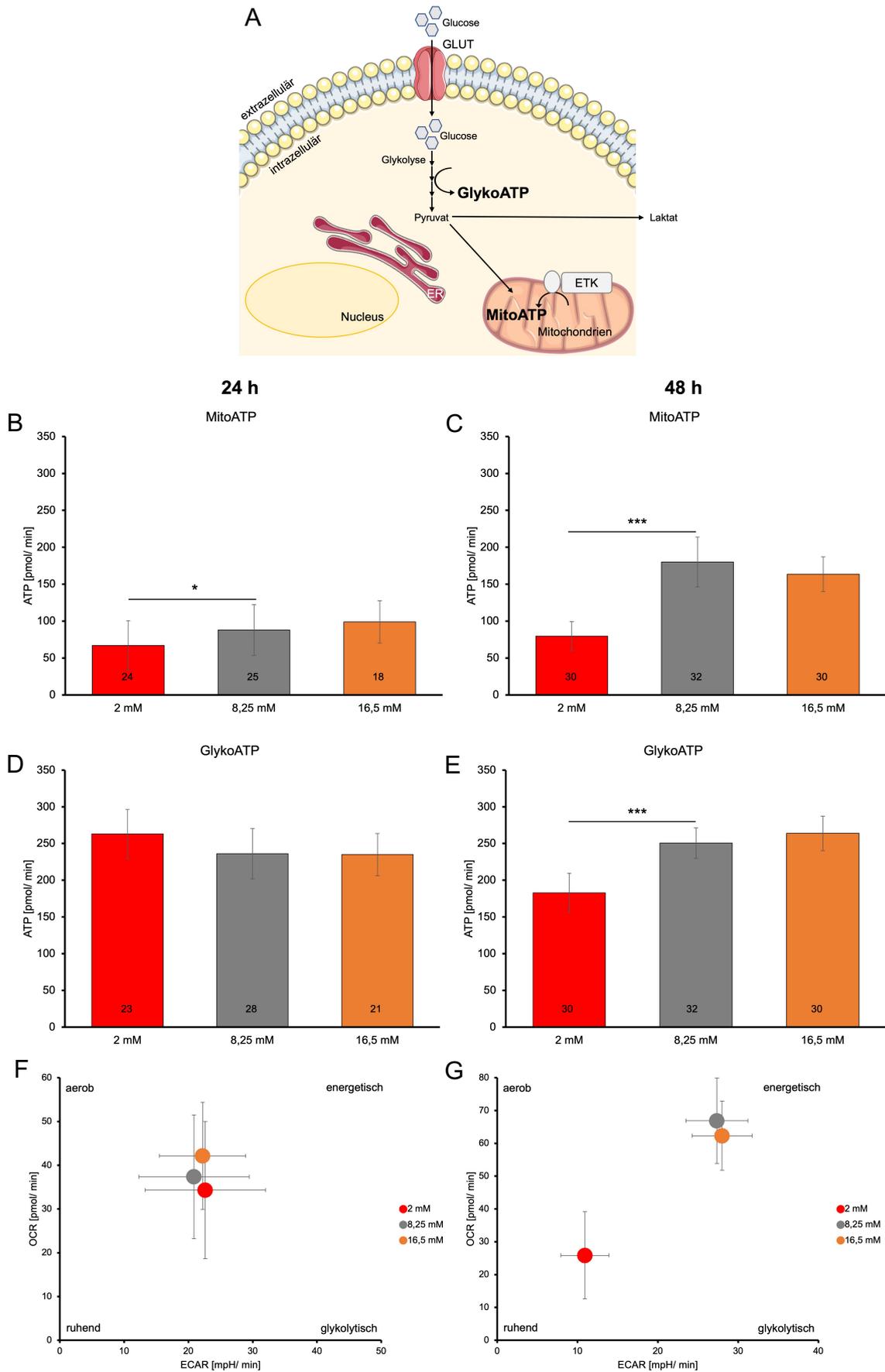


Abbildung 35 Aerobe und anaerobe ATP-Produktion nach 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.

A: Schematische Darstellung der anaeroben ATP-Produktion über die Glykolyse (GlykoATP) und der aeroben ATP-Produktion über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (MitoATP). **B, C:** Aerob produziertes ATP über die oxidative Phosphorylierung (MitoATP). **D, E:** Anaerob produziertes ATP über die Glykolyse (GlykoATP). Dargestellt wurde die Mittelwerte und Standardabweichungen der ATP-Produktion in pmol/ min normiert auf die Zellzahl und das Hintergrund-Signal nach der Behandlung der SH SY5Y Zellen mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B, D**) oder 48 h (**C, E**). Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. **F, G:** Energiekarte der SH SY5Y Zellen nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**F**) oder 48 h (**G**). Aufgetragen wurde die Mittelwerte und Standardabweichungen der oxidativen Verbrauchsrate (OCR) in pmol/min gegen die extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) in mpH/min normiert auf die Zellzahl und das Hintergrund-Signal. (Statistik: zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben: $p_{24\text{ h MitoATP } 2\text{ vs } 8,25\text{ mM}}=0,0214$; $p_{48\text{ h MitoATP } 2\text{ vs } 8,25\text{ mM}}<0,001$; $p_{48\text{ h GlykoATP } 2\text{ vs } 8,25\text{ mM}}<0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Die gemessenen Beiträge der ATP-Produktion über die zwei Hauptstoffwechselwege bestätigen die Ergebnisse der Verbrauchsmessungen. SH SY5Y Zellen gewinnen ihre Energie hauptsächlich über den anaeroben Weg, die Glykolyse, und die aerobe Energiegewinnung über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung leistet einen geringen Beitrag. Dabei ist der Beitrag über die OXPHOS in den Mitochondrien nach langzeitiger Hypoglykämie kleiner als bei normo- und hyperglykämisch kultivierten SH SY5Y Zellen.

Die Bestimmung des aeroben Anteils der ATP-Produktion erlaubt Aussagen über die Produktion von RONS durch die Mitochondrien. In Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit im Medium ändert sich der Anteil der ATP-Produktion über die Mitochondrien, so dass auch auf Änderungen in der Superoxid-Produktion in den Mitochondrien geschlossen werden könnte.

4.4.3 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie wirken sich auf die Mitochondrien aus

Da die Ergebnisse dieser Arbeit eine Änderung der ATP-Produktion über die Mitochondrien nach langzeitiger Hypoglykämie zeigen, kann auch auf eine Änderung in der mitochondrialen ROS-Produktion geschlossen werden.

Die mitochondriale ROS- und ATP-Produktion ist eng mit der Morphologie der Mitochondrien verbunden, welche sich dynamisch an die bioenergetischen Anforderungen der Zellen, wie den Energiemetabolismus, anpasst (Gómez-Valadés et al., 2017; Horbay & Bilyy, 2016; Ježek et al., 2018). Daher wurden zunächst die Auswirkungen der Glucose-Verfügbarkeit im Medium auf die mitochondriale Masse untersucht.

4.4.3.1 Hyperglykämie reduziert nach 48 h die mitochondriale Masse

Um die mitochondriale Masse und Länge der Mitochondrien in den SH SY5Y Zellen zu bestimmen, wurden die Mitochondrien mittels CellLight Mitochondria-GFP, BacMam 2.0 markiert. Mit Hilfe der BacMam2.0-Technologie wird das Fusionskonstrukt aus der *Leader*-Sequenz der E1-Alpha-Pyruvat-Dehydrogenase und emGFP in die Zellen eingebracht, verpackt in das Insekten-Baculo-Virus. Das Konstrukt wird mit einer hohen Effizienz und minimaler Toxizität in den meisten Säugertierzellen repliziert. In Zelllinien weist die BacMam2.0-Technologie eine Transduktionseffizienz von mehr als 50 % auf (ThermoFisher Scientific, Schwerte). In der verwendeten SH SY5Y Zelllinie zeigte sich eine 43 ± 16 %-ige Transfektionseffizienz von CellLight Mitochondria-GFP.

Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Länge der Mitochondrien („branch length mean“), welche sich je nach Stadium der mitochondrialen Dynamik verändern kann, ergab sich nach der Auswertung mittels MiNA Pulgin in ImageJ kein Unterschied zwischen den drei Glucose-Konzentrationen unabhängig von der Dauer der Behandlung (Anhang Tab. 20).

Bei der Betrachtung der mitochondrialen Masse, normiert auf die Behandlungsgruppe mit 8,25 mM Glucose für 24 h, ergab sich nach 24 h Hypo- und Hyperglykämie keine Unterschiede. Zu diesem Zeitpunkt lag die mitochondriale Masse pro Zelle bei 100 bis 123 %. Nach 48 h lag die mitochondriale Masse pro Zelle bei etwa 110 bis 120 %. Eine hyperglykämische Behandlung mit 16,5 mM Glucose über 48 h führte zu einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Masse pro Zelle um etwa 38 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen, so dass die mitochondriale Masse pro Zellen nur noch bei 82 % lag (Tab. 2).

Tabelle 2 Mitochondriale Masse pro SH SY5Y Zelle nach 24- oder 48-stündiger Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der mitochondrialen Masse pro Zelle in Prozent, normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, die Anzahl der ausgewerteten Fluoreszenzaufnahmen (n) sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen 8,25 mM).

Inkubationszeit	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	122,55	100,00	99,10	110,79	119,30	81,79
Standardabw.	37,86	48,07	40,27	60,63	56,30	33,55
Anzahl	21	24	22	14	21	18
Statistik	ns		ns	ns		0,0166

4.4.3.2 Hypoglykämie beeinflusst die mitochondriale Superoxid-Produktion

Die Effekte einer langzeitigen Hypo- und Hyperglykämie auf die mitochondriale Superoxid-Produktion wurden mit Hilfe des spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX Red untersucht (Abb. 36 A).

Die SH SY5Y Zellen wurden mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose in DMEM (0,1 % FCS) für 24 oder 48 h behandelt und anschließend der kinetische Verlauf des Fluoreszenzsignals des Farbstoffes MitoSOX Red in Hank´s Puffer (8 mM) gemessen. Die Steigungen des MitoSOX Red-Signals wurden auf den Mittelwert der Zellen, welche für 24 h mit 8,25 mM Glucose behandelt wurden, normiert und als mitochondriales O_2^- in Prozent dargestellt. Diese Normierung (8,25 mM, 24 h = 100 %) wurde gewählt, um Unterschiede im relativen mitochondrialen Superoxid-Signal zwischen den Inkubationszeiten von 24 und 48 h innerhalb der Glucose-Konzentrationen zu veranschaulichen (Anhang Tab. 30).

Eine signifikante Abnahme der mitochondrialen O_2^- -Konzentration um 18 % trat nach 24-stündiger Hypoglykämie auf im Vergleich zu den normoglykämischen behandelten Zellen (Abb. 36 B). Die Behandlung der Zellen mit 2 mM Glucose für 48 h führte zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen O_2^- -Konzentration um 20 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Abb. 36 C). Hyperglykämische Bedingungen hatten keine Auswirkungen auf die O_2^- -Konzentration im Vergleich zu einer Normoglykämie (Abb. 36 A und B).

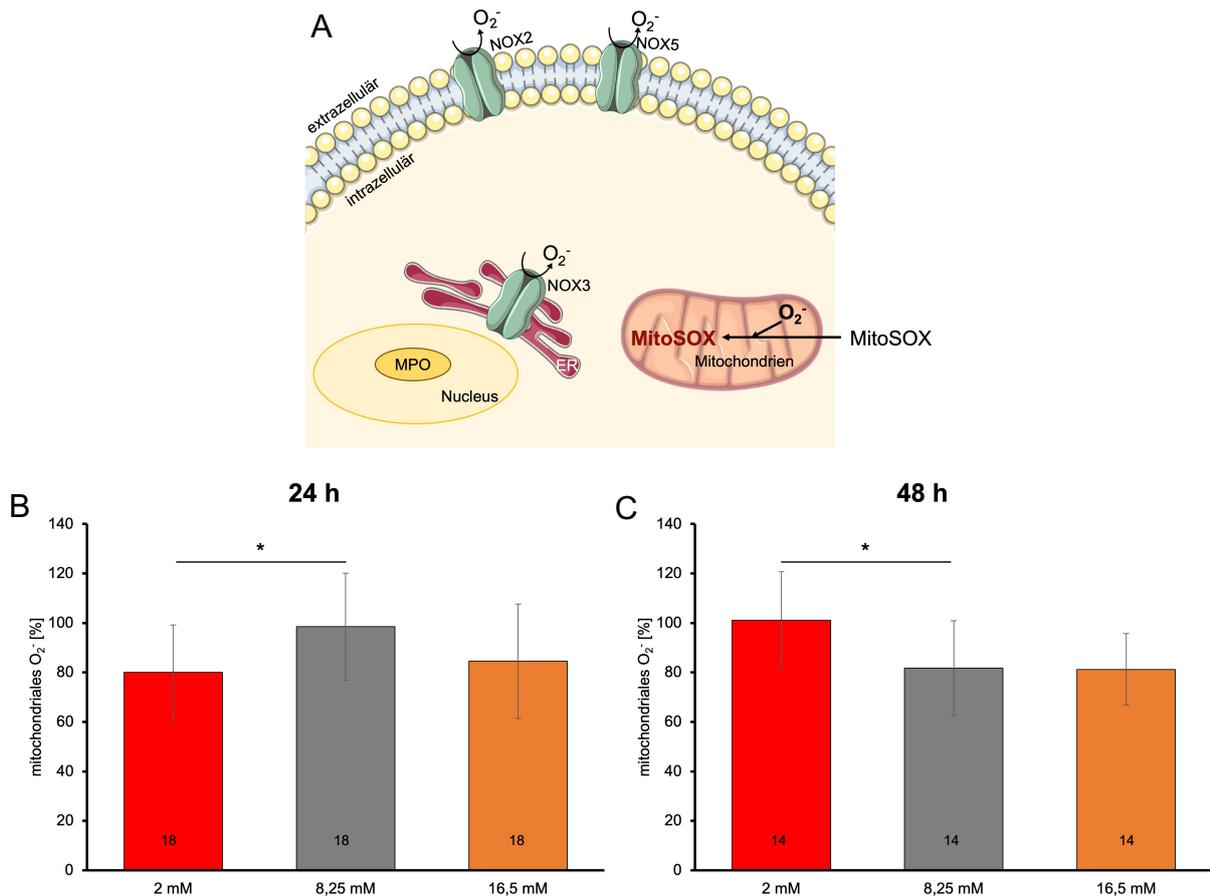


Abbildung 36 Mitochondriale O₂-Konzentration nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.

A: Schematische Darstellung der Messung des mitochondrialen O₂ mittels MitoSOX Red. Der Fluoreszenzfarbstoff dringt in die Mitochondrien ein und fluoresziert stark nach der Oxidation durch O₂. **B, C:** Mitochondriales O₂-Signal nach Inkubation der Zellen mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen des mitochondrialen O₂-Signals in Prozent, normiert auf die Behandlungsgruppe 8,25 mM für 24 h (= 100 %). Die Anzahl von je vier gemittelten Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben: $p_{24\text{ h } 2\text{ vs } 8,25\text{ mM}}=0,0025$; $p_{48\text{ h } 2\text{ vs } 8,25\text{ mM}}=0,0136$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Die Abnahme des mitochondrialen Superoxids nach 24-stündiger Hypoglykämie stimmt mit der verringerten mitochondrialen ATP-Produktion überein, so dass die Reduktion des mitochondrialen ATPs auf eine verminderte Aktivität der Mitochondrien zurückgeführt werden könnte. Nach 48-stündiger Hypoglykämie wurde weniger MitoATP gebildet bei einer tendenziell verringerten mitochondrialen Masse, aber es lag eine erhöhte mitochondrialen Superoxid-Produktion vor. Nach 48-stündiger Hyperglykämie blieben trotz verringerter mitochondrialer Masse die mitochondriale Superoxid-Produktion und das mitochondrial produzierte ATP unverändert.

4.4.4 Die AMPK beeinflusst die intrazelluläre RONS-Produktion

Eine Abnahme der mitochondrialen ATP-Produktion nach langzeitiger Hypoglykämie führt zur Änderung des zellulären AMP/ ATP-Verhältnisses. Dadurch kommt es zur Aktivierung des zellulären Energiesensors AMPK. Die Aktivierung der AMPK hat wiederum Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie, die Glucose-Aufnahme oder die Redox-Homöostase. Die AMPK wirkt aktivierend auf die NO-Synthase (NOS) und GLUT4 und inhibierend auf die NADPH-Oxidasen (NOX), die Myeloperoxidase (MPO) und die GLUT1 (Ježek et al., 2018; Ma et al., 2017; Muraleedharan & Dasgupta, 2022) (Abb. 37).

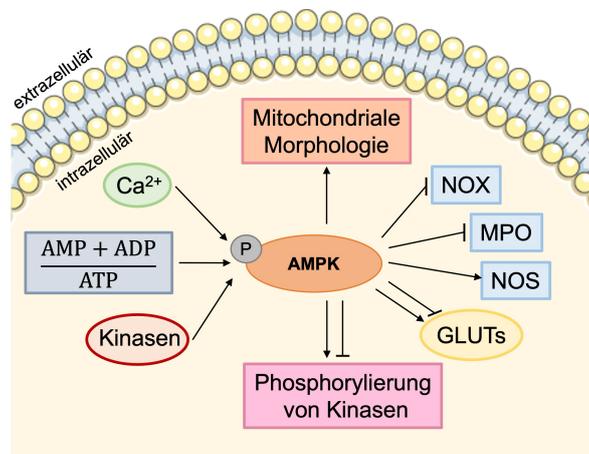


Abbildung 37 Schema der Aktivierung und Ziele der (p)AMPK.

Kinasen, das intrazelluläre Verhältnis von AMP/ ADP zu ATP sowie Calcium aktivieren die AMPK. Die aktivierte AMPK wirkt inhibierend oder aktivierend auf verschiedene Ziele wie die mitochondriale Morphologie, die NADPH-Oxidasen (NOX), die Myeloperoxidase (MPO), die NO-Synthase (NOS), die Glucose-Aufnahme über die GLUTs und die Phosphorylierung verschiedener Kinasen (verändert nach Muraleedharan & Dasgupta (2022), erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Um zu analysieren, ob sich die Glucose-Verfügbarkeit im Medium und die daraus resultierenden Änderungen in der ATP-Produktion auf den Energiesensor AMPK auswirken, wurde das Verhältnis der pAMPK zur AMPK mittels ELISA quantifiziert. Normiert wurde auf die Behandlungsgruppe, welche 8,25 mM Glucose für 24 h erhielt. Die Berechnungen der relativen Verhältnisse der pAMPK zur AMPK ergaben, dass eine 24-stündige Hypoglykämie zu einer signifikanten Zunahme des Verhältnisses der pAMPK zu der inaktiven AMPK um 24 % führte im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen. Das relative Verhältnis der pAMPK zur AMPK sank unter Hypoglykämie nach 48 h auf etwa 98 %. Insgesamt lag das das relative Verhältnis der aktivierten

Form der AMPK bei etwa 100 % bei normo- und hyperglykämisch kultivierten Zellen für 24 und 48 h (Tab. 3).

Tabelle 3 Relatives Verhältnis der pAMPK zur AMPK nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Verhältnisses der pAMPK/ AMPK in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, die Anzahl von je vier gemittelten Wells sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test für unabhängige Stichproben gegen 8,25 mM).

Inkubationszeit	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	124,33	100,00	102,76	98,18	106,82	100,51
Standardabw.	2,82	1,97	9,19	8,06	11,89	1,32
Anzahl	3	3	3	3	3	3
Statistik	<0,0001		ns	ns		ns

Um nun den Anteil der RONS, welche durch die AMPK moduliert werden, und so die Quellen der RONS-Produktion einzugrenzen, wurde das intrazelluläre RONS-Signal mit dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA nach Inhibition der AMPK mittels Compound C gemessen.

Der Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA wird oxidiert durch Hydroxyl-Radikale (OH[•]), Peroxynitrit (ONOO⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Hypochlorsäure (HOCl), Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O₂⁻). Dabei sind Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit die zwei bevorzugten Spezies für die Oxidation des H₂DCFDA-Farbstoffes (ThermoFisher Scientific, 2010).

Neben dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA existieren spezifischere Fluoreszenzfarbstoffe für einzelne Spezies, zum Beispiel CellROX Deep Red, welches nur durch Superoxid und Hydroxyl-Radikale oxidiert wird, oder Dihydroethidium (DHE), welches nach der Interkalation in die DNA durch Superoxid oxidiert wird. Diese Fluoreszenzfarbstoffe würden eine Zuordnung der beteiligten RONS und damit der RONS-Quellen unter Hypo- oder Hyperglykämie vereinfachen. Beim Testen dieser Fluoreszenzfarbstoffe kam es jedoch zu Mess-Artefakten. Das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes CellROX Deep Red war am Mikroplattenreader nicht messbar und streute bei der Messung am Fluoreszenzmikroskop stark, so dass aufgrund der hohen Standardabweichungen keine Effekte der Behandlungen ermittelt werden

konnten. Das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes DHE wurde durch die Bestandteile des Mediums beeinflusst. Nach der Behandlung Zell-freier Wells mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen waren unterschiedlich starke Signale in Abhängigkeit der Glucose-Konzentrationen am Mikroplattenreader messbar. Daher wurde entschieden den allgemeinen Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA zu verwenden und die verschiedenen RONS und ihre Quellen mittels Inhibitoren zu identifizieren.

Die SH SY5Y Zellen wurden mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose in DMEM klar (0,1 % FCS) für 24 oder 48 h kultiviert. 30 Minuten vor Beginn der Messung wurden 10 µL Compound C, mit einer Endkonzentration von 5 µM, oder die entsprechende Kontrolle (H₂O dest.), angesetzt in Medium mit der jeweiligen Glucose-Konzentration, hinzugegeben. Es wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, um Änderungen im Inhalt des Mediums kurz vor Beginn der Messung zu verhindern. Anschließend wurde der kinetische Verlauf des DCF-Signals in Hank´s Puffer (8 mM) gemessen. Die relativen Steigungen des DCF-Signals nach 24 und 48 h der drei Glucose-Konzentrationen wurden auf die Gruppe, welche mit 8,25 mM Glucose und der Kontrolle behandelt wurden, normiert und in Prozent dargestellt. Für diese Form der Normierung (8,25 mM, 24 h = 100 %) wurde sich entschieden, um die Unterschiede im relativen intrazellulären RONS-Signal zu den verschiedenen Inkubationszeiten zu verdeutlichen (Anhang Tab. 31). Im Folgenden wurden nur die Unterschiede zwischen der jeweiligen Kontrolle und dem verwendeten Inhibitor statistisch betrachtet, um den Beitrag der inhibierten RONS-Quelle am intrazellulären RONS-Signal analysieren zu können.

Nach 24-stündiger Inkubation der SH SY5Y Zellen mit 2 mM und 8,25 mM Glucose im Medium führte eine Inhibition der AMPK zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären RONS-Signals. Dabei nahm das intrazelluläre RONS-Signal nach einer Hypoglykämie um 34 % ab im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Behandlung mit 8,25 mM Glucose und dem Inhibitor Compound C kam es zu einer Abnahme um 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine hyperglykämische Behandlung über 24 h zusammen mit der Inhibition der AMPK führte zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären RONS-Signals um 26 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 38 B). Nach 48 h war zu beobachten, dass das intrazelluläre RONS-Signal der Zellen, behandelt mit 2 mM Glucose, nach der Inhibition der AMPK signifikant um 10 % abnahmen im Vergleich zur Kontrolle. Eine AMPK-Inhibition hatte nach 48-stündiger Normoglykämie keine Auswirkungen auf das RONS-Signal. Das intrazelluläre RONS-Signal der Zellen,

welche eine 48-stündige Behandlung mit 16,5 mM Glucose erhielten, stieg um etwa 13 % signifikant an im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 38 C).

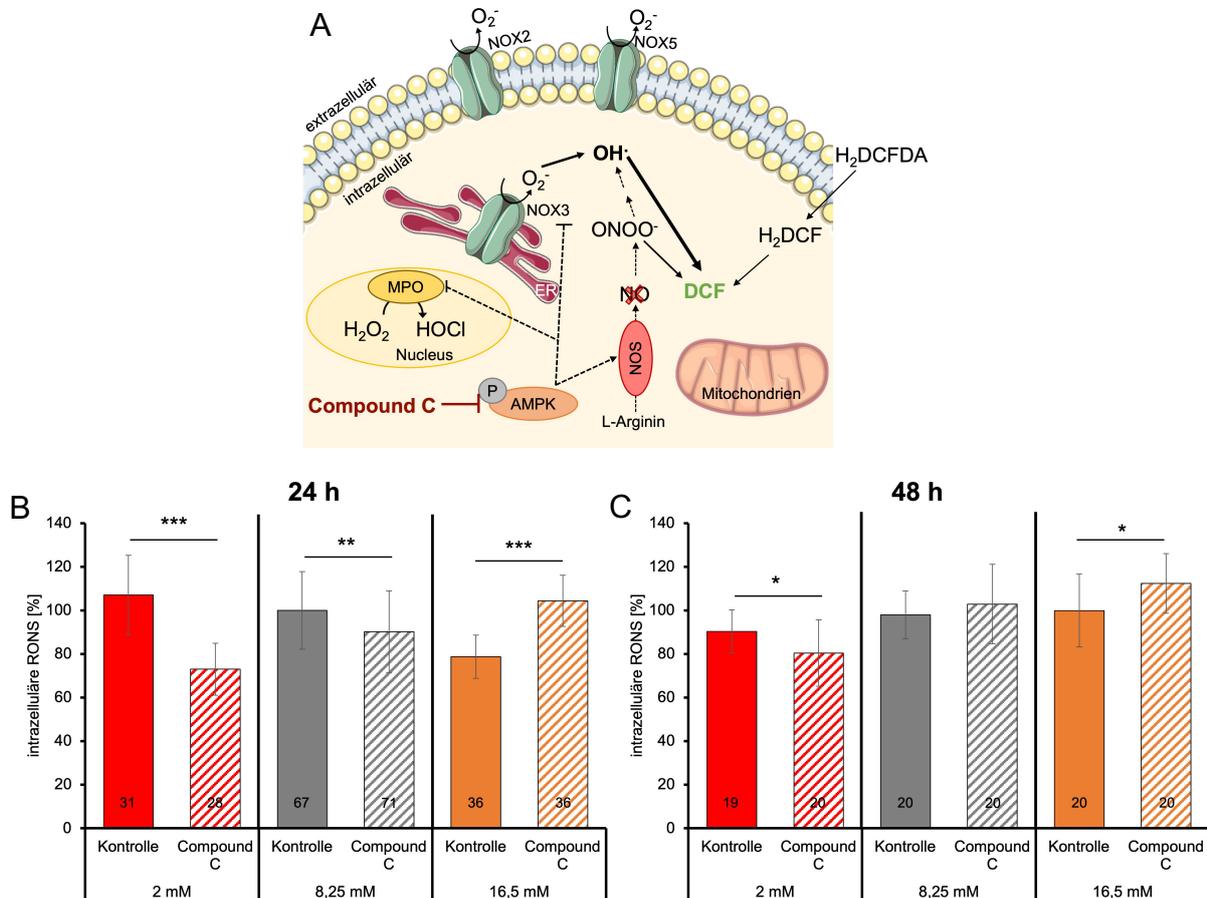


Abbildung 38 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und der Inhibition der AMPK.

A: Schematische Darstellung der Messung der intrazellulären RONS nach Inhibition der AMPK mittels Compound C. **B, C:** Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**) und der Kontrolle oder des Inhibitors Compound C. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose für 24 h normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{24\text{ h } 2\text{ mM}} < 0,001$; $p_{24\text{ h } 8,25\text{ mM}} = 0,002$; $p_{24\text{ h } 16,5\text{ mM}} < 0,001$; $p_{48\text{ h } 2\text{ mM}} = 0,0245$; $p_{48\text{ h } 16,5\text{ mM}} = 0,0136$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Somit ist es möglich, mit diesem Ansatz den durch die AMPK beeinflussten RONS-Beitrag zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Inhibition der AMPK unter hypoglykämischen Bedingungen der Beitrag von RONS in Abhängigkeit von der AMPK erniedrigt wird. Unter langzeitiger Hyperglykämie wird der RONS-Beitrag AMPK-abhängig erhöht. Unter normoglykämischen Bedingungen ist eine geringe, jedoch signifikante Reduktion des AMPK-abhängigen RONS-Beitrags zu sehen.

Insgesamt sind die AMPK-abhängigen RONS-Beiträge nach 48 h kleiner als nach 24 h (Tab. 4).

Tabelle 4 Zusammenfassung des Einflusses der AMPK-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal unter 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.

Pfeil nach unten beschreibt eine Abnahme und Pfeil nach oben eine Zunahme des intrazellulären RONS-Signals nach Inhibition der AMPK. Die Stärke der Pfeile entspricht der Stärke des Effekts. Leere Tabellen-Felder kennzeichnen fehlende Effekte der AMPK-Inhibition.

	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Effekt der AMPK-Inhib.	↓	↓	↑	↓		↑

4.4.5 Langzeitige Hypoglykämie stimuliert die Superoxid-Produktion über NOX3

Um die Quelle der Änderung im intrazellulären RONS-Signal, welche nach Inhibition der AMPK auftrat, eingrenzen zu können, wurde der Anteil von Superoxid am intrazellulären RONS-Signal ermittelt. Superoxid kann neben der mitochondrialen Atmungskette durch die NADPH-Oxidasen produziert werden, auf welche die AMPK eine inhibierende Wirkung hat. Wie im Kapitel 4.1 beschrieben, stellt nur die NOX3 eine intrazelluläre Quelle für Superoxid in den SH SY5Y Zellen dar.

Da die Verwendung eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, welcher nur durch Superoxid oxidiert wird, wie zum Beispiel DHE, nicht möglich war, wurde zur Untersuchung des Anteils von Superoxid am intrazellulären RONS-Signal Tiron verwendet. Tiron reagiert mit Superoxid (O_2^-) und H^+ zu Tiron-Semichinon ($\cdot TH$) und H_2O_2 , so dass Superoxid weggefangen wird. Das $\cdot TH$ spaltet sich anschließend in ein Tiron-Semichinon (T^-) (Taiwo, 2008). Dadurch wird die Konzentration von Superoxid reduziert und die Wasserstoffperoxid-Konzentration erhöht. Wasserstoffperoxid kann nur durch die Umwandlung in OH^- über die Fenton-Reaktion zum DCF-Signal beitragen. Superoxid hingegen kann sowohl über die Haber-Weiss-Reaktion zu OH^- umgewandelt werden als auch mit NO zu $ONOO^-$ reagieren. OH^- und $ONOO^-$ sind die zwei bevorzugten Spezies für die Oxidation des H_2DCFDA -Farbstoffes (ThermoFisher Scientific, 2010). Durch das Wegfangen von Superoxid durch Tiron, kann kein $ONOO^-$ aus O_2^- und NO gebildet werden, so dass der Beitrag von $ONOO^-$, als bevorzugte Spezies, zum DCF-Signal wegfällt, was zu einer Reduktion des DCF-Signals nach der Behandlung mit Tiron führt (Abb. 39 A).

Nach der Inkubation der SH SY5Y Zellen in DMEM (0,1 % FCS) mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h wurden 30 min vor Beginn der Messung 10 µL Tiron, Endkonzentration 100 µM, oder der Lösungsmittel-Kontrolle (1x PBS) hinzugegeben. Anschließend wurde das DCF-Signal in Hank's Puffer (8 mM) kinetisch gemessen. Die relativen Steigungen des DCF-Signals aller nachfolgenden Messungen wurden auf die Kontrolle der Zellen, behandelt mit 8,25 mM Glucose für 24 h (= 100 %) normiert und in Prozent dargestellt.

Nach einer 24-stündigen Behandlung mit 2 und 8,25 mM Glucose und dem Wegfangen von Superoxid mittels Tiron nahm das intrazelluläre RONS-Signal signifikant ab im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Nach einer Hypoglykämie sank das RONS-Signal um 21 % und bei normoglykämisch kultivierten Zellen um 12 % (Abb. 39 B). Die Behandlung mit Tiron hatte nach einer Hyperglykämie keine Auswirkungen, weder nach 24 h noch nach 48 h (Abb. 39 B und C). Nach 48-stündiger Hypoglykämie nahm das RONS-Signal mit Tiron signifikant um 29 % ab im Vergleich zur Kontrolle. Bei normoglykämisch kultivierten Zellen sanken das RONS-Signal signifikant um 26 % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abb. 39 C).

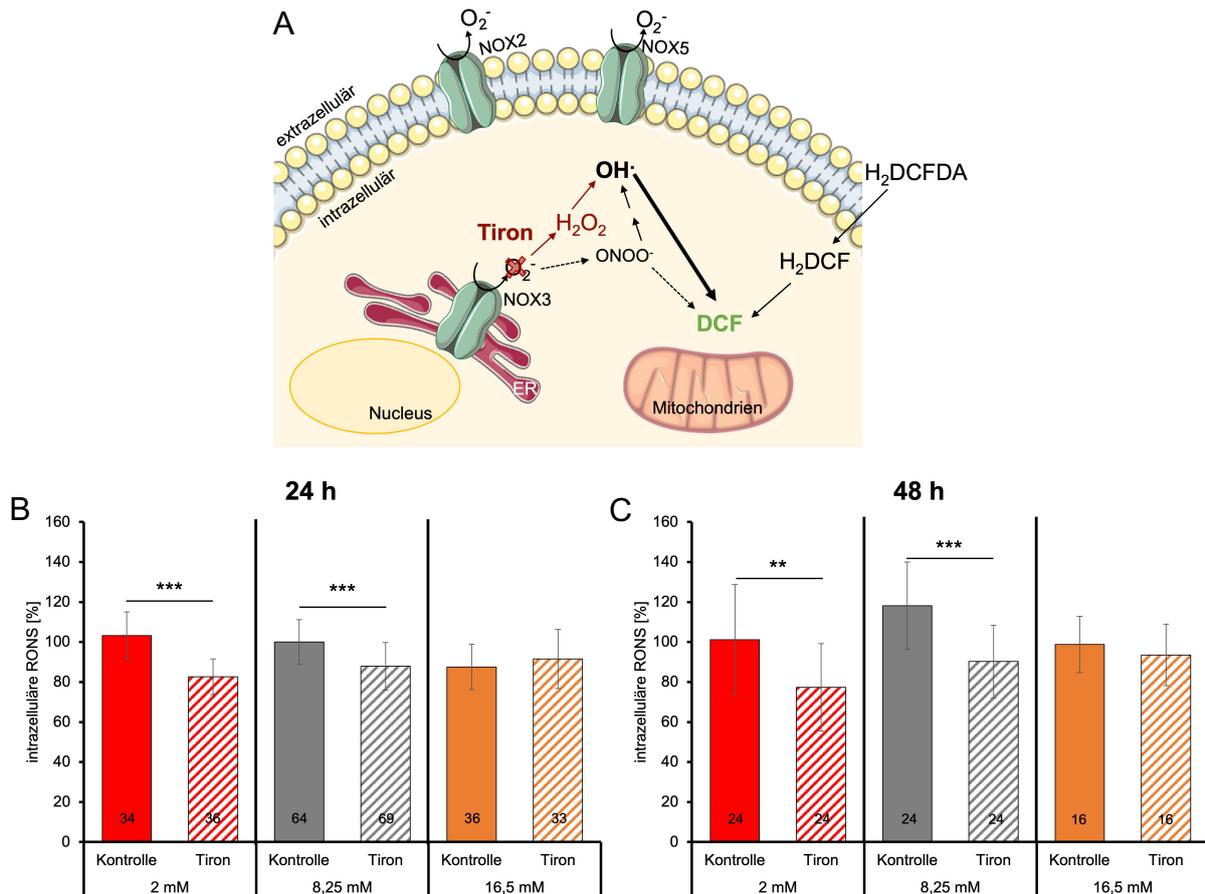


Abbildung 39 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und dem Wegfangen von Superoxid.

A: Schematische Darstellung der Messung der intrazellulären RONS nach dem Wegfangen von Superoxid mittels Tiron. Die Zugabe von Tiron erschöpft das intrazelluläre Superoxid (O_2^-). **B, C:** Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**) und der Kontrolle oder Tiron. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose für 24 h normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{24\text{ h } 2\text{ mM}} < 0,001$; $p_{24\text{ h } 8,25\text{ mM}} < 0,001$; $p_{48\text{ h } 2\text{ mM}} = 0,002$; $p_{48\text{ h } 8,25\text{ mM}} < 0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Der Effekt von Tiron bei hypo- und normoglykämisch kultivierten Zellen für 24 und 48 h weist auf eine Stimulation der Superoxid-Produktion hin. Um die Beteiligung der NOX3 als eine der möglichen Quellen der Superoxid-Produktion zu überprüfen, wurde der NOX3-Inhibitor Ebselen verwendet. Der NOX3-Inhibitor Ebselen blockiert die Bindung der bis-SH3-Domäne der regulatorischen NOX3-Untereinheit NOXO1 mit der C-terminalen Prolin-reichen Domäne der $p22^{\text{phox}}$ -Untereinheit in der Membran. Dadurch wird die Zusammenlagerung eines aktiven NOX-Komplexes und damit die Superoxid-Produktion verhindert (Barua et al., 2019) (Abb. 40 A).

Die SH SY5Y Zellen wurden mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h in DMEM (0,1 % FCS) inkubiert und 30 min vor Beginn der Messung wurden zusätzlich

10 μ L Ebselen, Endkonzentration 10 μ M, oder der Lösungsmittel-Kontrolle (0,1 % DMSO) hinzu pipettiert.

Nach einer 24- und 48-stündigen Hypoglykämie nahm das intrazelluläre RONS-Signal durch die Inhibition der NOX3 mittels Ebselen signifikant ab. Nach 24 h war das RONS-Signal um 9 % verringert und nach 48 h um 32 % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abb. 40 B und C). Nach der Behandlung mit 8,25 mM Glucose für 24 h und der NOX3-Inhibition mittels Ebselen nahm im Vergleich zur Kontrolle das RONS-Signal um 7 % signifikant ab (Abb. 40 B). Nach 48 h hatte die Inhibition der NOX3 mit Ebselen keine Auswirkungen mehr auf das RONS-Signal (Abb. 40 C). Bei hyperglykämisch kultivierten Zellen hatte die Zugabe von Ebselen keinen Effekt auf das intrazelluläre RONS-Signal unabhängig von der Inkubationszeit (Abb. 40 B und C).

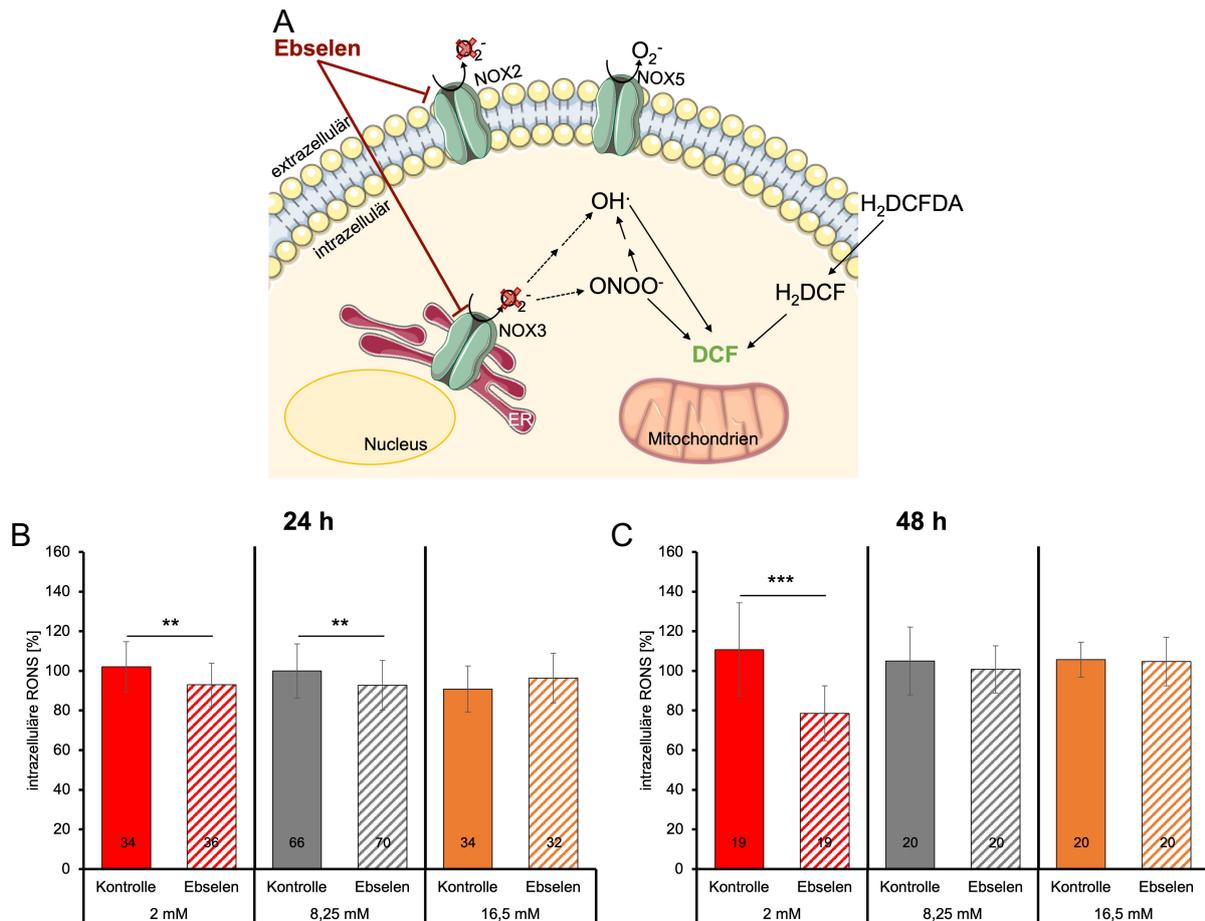


Abbildung 40 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und Inhibition der NOX3.

A: Schematische Darstellung der Messung des intrazellulären RONS nach der Inhibition der NOX3 mittels Ebselen.
B, C: Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**) und der Kontrolle oder Ebselen. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose für 24 h normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{24\text{ h } 2\text{ mM}}=0,002$; $p_{24\text{ h } 8,25\text{ mM}}=0,0022$; $p_{48\text{ h } 2\text{ mM}}<0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei einer langzeitigen Hypoglykämie die intrazelluläre Superoxid-Produktion stimuliert wird. Als Quelle des Superoxids kann auf die im ER lokalisierten NOX3 geschlossen werden. Der Beitrag des NOX3-produzierten Superoxids nach einer Hypoglykämie stieg über die Zeit an. Auch nach 24-stündiger Normoglykämie war der Beitrag von Superoxid, produziert durch die NOX3, erhöht. Dieses Phänomen war nach 48 h nicht mehr zu beobachten. Unter langzeitiger Hyperglykämie leistete Superoxid keinen Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal (Tab. 5).

Tabelle 5 Zusammenfassung des Einflusses der NOX3-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.

Pfeil nach unten beschreibt eine Abnahme und Pfeil nach oben eine Zunahme des intrazellulären RONS-Signals nach Inhibition der NOX3. Die Stärke der Pfeile entspricht der Stärke des Effekts. Leere Tabellen-Felder kennzeichnen fehlende Effekte der NOX3-Inhibition.

Ziel der Inhibition	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
NOX3	↓	↓		↓		

Nach einer langzeitigen Hypoglykämie von 48 h konnte ein hoher Beitrag des NOX3-produzierten Superoxids am intrazellulären RONS-Signal (32 %) ermittelt werden. Da während einer Inkubationszeit von 48 h neben Änderungen in der Enzymaktivität der NOX3 auch transkriptionelle Änderungen stattfinden können, wurde der Proteingehalt der NOX3 mittels ELISA quantifiziert. Es wurde auf den Mittelwert der Behandlungsgruppe, welche mit 8,25 mM Glucose für 24 h inkubiert wurde, normiert. Die Quantifizierung des relativen NOX3-Proteingehalts ergab nach einer 48-stündigen Hypoglykämie einen signifikant erhöhten relativen Proteingehalt der NOX3 um 35 % im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen. Insgesamt stieg der relative NOX3-Proteingehalt der SH SY5Y Zellen nach 48 h auf etwa 113 bis 121 % bei hyper- und normoglykämisch kultivierten Zellen (Tab. 6).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Anstieg des relativen Proteingehalts der NOX3, als RONS-Quelle, eine spezifische Reaktion auf eine veränderte Glucose-Verfügbarkeit im Medium, vor allem bei einem Glucose-Defizit wie bei einer langzeitigen Hypoglykämie, sein könnte.

Tabelle 6 Quantifizierung des relativen NOX3-Proteingehalts nach einer 24- oder 48-stündigen Hypo-Normo- und Hyperglykämie.

Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen NOX3-Proteingehalts normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, quantifiziert mittels ELISA in Prozent, die Anzahl der gemessenen Wells sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen 8,25 mM).

Inkubationszeit	NOX3					
	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	93,19	100,00	107,37	156,03	121,24	113,16
Standardabw.	35,27	44,80	31,71	40,86	37,70	24,06
Anzahl	12	7	12	23	24	23
Statistik	ns		ns	0,0041		ns

4.4.6 Langzeitige Hyperglykämie stimuliert die MPO-vermittelte HOCl-Produktion

Der Anstieg des intrazellulären RONS-Signals nach AMPK-Inhibition unter Hyperglykämie deutete auf eine Inhibition der NOX oder MPO hin. Die NOX3 wurden aufgrund des ausbleibenden Effekts von Ebselen nach langzeitiger Hyperglykämie ausgeschlossen, so dass die Myeloperoxidase (MPO) eine potenzielle Rolle als AMPK-abhängige RONS-Quelle bei langzeitiger Hyperglykämie zu spielen scheint.

Um die Aktivität der MPO zu untersuchen, wurden die SH SY5Y Zellen mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h behandelt und 30 min vor Beginn der H₂DCFDA-Messung wurden entweder 10 µL des irreversiblen MPO-Inhibitors 3-Amino-4-hydroxybenzolsäure (4-AHBA), in einer Endkonzentration von 1 mM, oder der dazugehörigen Lösungsmittel-Kontrolle (1 % DMSO) hinzugegeben. 4-AHBA inhibiert die MPO über die Zerstörung der Häm-Gruppe der MPO durch die Reduktion eines eisenhaltigen MPO-H₂O₂-Komplexes und verhindert somit die Produktion von HOCl (Vermet et al., 2021) (Abb. 41 A).

Die irreversible Inhibition der MPO mittels 4-AHBA ergab eine Zunahme des intrazellulären RONS-Signals nach einer Hyperglykämie. Nach 24 h stieg das RONS-Signal signifikant um 16 % und nach 48 h signifikant um 13 % an, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Der Anstieg des intrazellulären RONS-Signals nach einer Hyperglykämie für 24 und 48 h und der Inhibition der MPO kann darauf zurückgeführt werden, dass H₂O₂ nicht mehr durch die MPO in HOCl umgewandelt werden kann und somit als Substrat für andere Redox-Reaktionen, wie der Fenton-Reaktion, zur

Verfügung steht. Bei der Fenton-Reaktion wird H_2O_2 in Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) umgewandelt. OH^\cdot leistet neben ONOO^\cdot den Hauptbeitrag zum gemessenen DCF-Signal. Der Fluoreszenzfarbstoff H_2DCFDA hat hingegen eine deutlich geringere Affinität gegenüber HOCl (ThermoFisher Scientific, 2010). Die Inhibition der MPO hatte bei hypo- und normoglykämisch kultivierten Zellen, unabhängig von der Behandlungsdauer, keine Auswirkungen (Abb. 41 B und C).

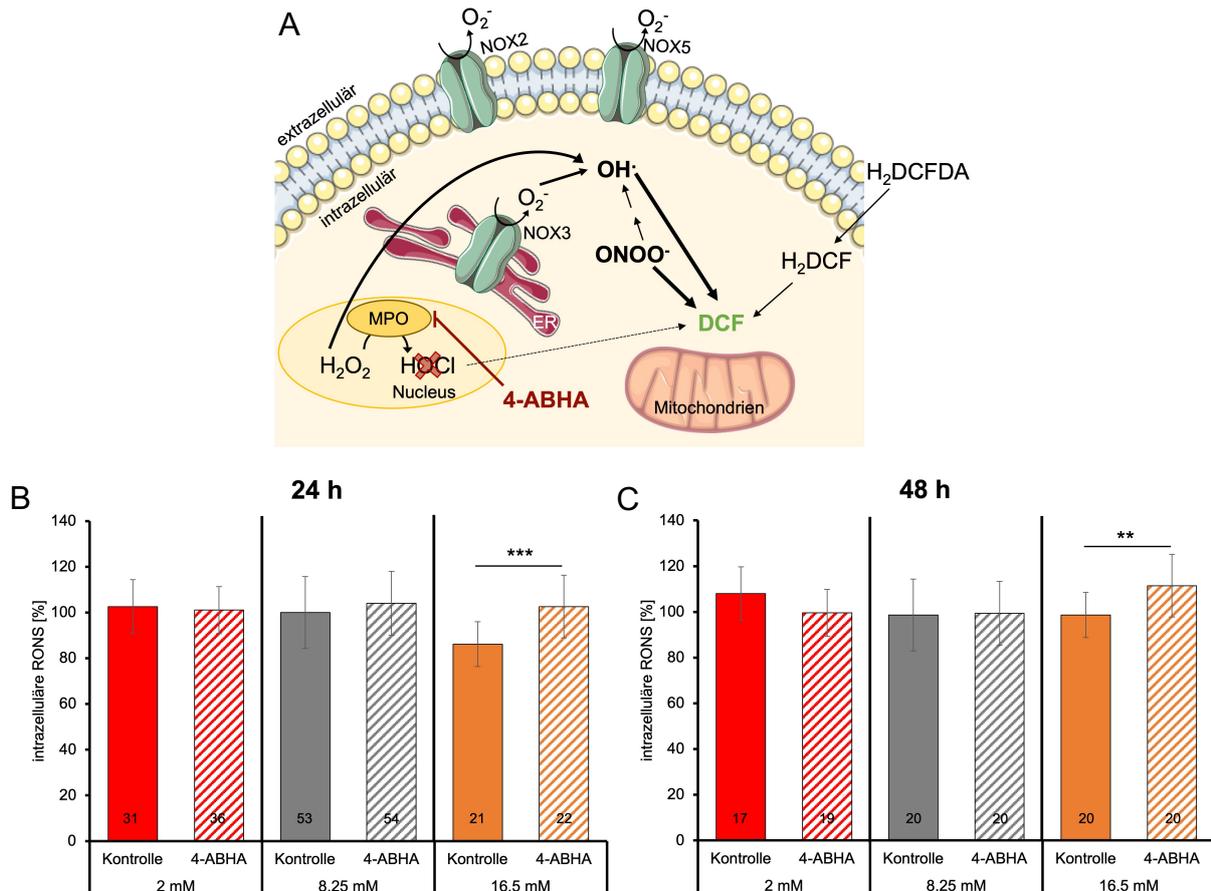


Abbildung 41 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und der Inhibition der MPO.

A: Schematische Darstellung der Messung der intrazellulären RONS nach der Inhibition der MPO mittels 4-ABHA. **B, C:** Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**) und der Lösungsmittel-Kontrolle oder 4-ABHA. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose für 24 h normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{24\text{ h } 16,5\text{ mM}} < 0,001$; $p_{48\text{ h } 16,5\text{ mM}} = 0,0061$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die MPO bei langzeitiger Hyperglykämie in den SH SY5Y Zellen aktiviert wurde und MPO-produziertes HOCl einen entscheidenden Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal leistete (Tab. 7).

Sowohl die Inhibition der MPO als auch die AMPK-Inhibition führten nach langzeitiger Hyperglykämie zu einer Zunahme des intrazellulären RONS-Signals. Durch die Inhibition der AMPK wurde die blockierende Wirkung der AMPK auf Zielproteine, wie die NOX3 oder MPO, aufgehoben, so dass diese Quellen wieder RONS produzieren können. Da ein Effekt der NOX3-Inhibition unter hyperglykämischen Bedingungen ausblieb, kann darauf geschlossen werden, dass die MPO und nicht die NOX3 eine AMPK-abhängige RONS-Quelle bei langzeitiger Hyperglykämie darstellt.

Tabelle 7 Zusammenfassung des Einflusses der MPO-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.

Pfeil nach unten beschreibt eine Abnahme und Pfeil nach oben eine Zunahme des intrazellulären RONS-Signals nach Inhibition der MPO. Die Stärke der Pfeile entspricht der Stärke des Effekts. Leere Tabellen-Felder kennzeichnen fehlende Effekte der MPO-Inhibition.

	24 h			48 h		
Ziel der Inhibition	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
MPO			↑			↑

Wie bereits bei der NOX3 gezeigt, können während Langzeit-Inkubationen neben Änderungen in der Enzymaktivität auch transkriptionelle Änderungen des Enzyms auftreten. Nach 48-stündiger Hypoglykämie konnte eine Abnahme der MPO-Aktivität und damit des Beitrags von HOCl am intrazellulären RONS-Signal festgestellt werden. Aufgrund dessen könnte auch eine Abnahme des MPO-Proteingehalts stattgefunden haben. Daher wurde der Proteingehalt der MPO in den SH SY5Y Zellen mittels ELISA bestimmt. Es wurde auf den Mittelwert der Behandlungsgruppe, welche mit 8,25 mM Glucose für 48 h kultiviert wurde, normiert.

Nach 24-stündiger Inkubation gab es keine Unterschiede im relativen Proteingehalt der MPO zwischen den verschiedenen Glucose-Konzentrationen. Wurden die Zellen 48 h inkubiert, sank der relative Proteingehalt der MPO in den normoglykämisch kultivierten Zellen auf etwa 66 %. Die Behandlung mit 2 mM und 16,5 mM Glucose über 48 h hatten eine signifikante Reduktion des relativen MPO-Proteingehalts auf 48 und 47 % zur Folge im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Tab. 8).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Reduktion des relativen Proteingehalts der MPO eine spezifische Reaktion auf veränderte Glucose-Verfügbarkeiten im Medium ist.

Tabelle 8 Quantifizierung des relativen MPO-Proteingehalts nach einer 24- oder 48-stündigen Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.

Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen MPO-Proteingehalt normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, quantifiziert mittels ELISA, in Prozent, die Anzahl der gemessenen Wells sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen 8,25 mM).

	MPO					
Inkubationszeit	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	94,55	100,00	91,54	48,30	65,98	46,81
Standardabw.	34,37	31,86	31,04	36,39	45,35	30,84
Anzahl	20	23	24	23	22	24
Statistik	ns		ns	0,0159		0,0045

4.4.7 Der Einfluss 24-stündiger Hypo- und Hyperglykämie auf das extrazelluläre H₂O₂-Signal lässt Aussagen über die intrazelluläre H₂O₂-Konzentration zu

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Glucose-Verfügbarkeit im Medium sich auf die intrazelluläre RONS-Produktion über unterschiedliche Quellen auswirkt. Da in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, dass auch RONS-Quellen in der Plasmamembran der SH SY5Y Zellen lokalisiert sind, welche RONS nach extrazellulär produzieren, sollte untersucht werden, ob sich die Glucose-Verfügbarkeit im Medium auch auf diese Komponenten des „RONS-Netzwerks“, NOX2, 5 und SOD3, auswirkt.

Durch die Lokalisation der SOD3 in der Plasmamembran der SH SY5Y Zellen kann auf eine extrazelluläre Konversion des NOX2/ 5-produzierten Superoxids in Wasserstoffperoxid durch die SOD3 geschlossen werden. Wasserstoffperoxid kann extrazellulär sehr spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Amplex Red in Kombination mit der Meerrettich-Peroxidase gemessen werden. Andere extrazelluläre Fluoreszenzfarbstoffe wie WST-1, welcher spezifisch extrazelluläres Superoxid misst, waren nicht geeignet. WST-1 lieferte bei hohen Verdünnungen kein Signal und bei niedrigen Verdünnungen war zwar ein Signal messbar, aber es kam zum Absterben der SH SY5Y Zellen.

Mit dem Amplex Red Assay war es jedoch auch nicht möglich, die Aktivitäten der SOD3 und NOX5 mittels Inhibitoren zu bestimmen, da der Amplex Red Assay sowohl mit dem SOD3-Inhibitor DDC als auch mit dem NOX5-Inhibitor ML-090 zu Mess-Artefakten in Zell-freien Wells führte (Anhang Tab. 29).

Neben der extrazellulären RONS-Produktion durch membranständige NOX können RONS wie ONOO^- oder H_2O_2 durch Aquaporine die Membran passieren und so zu wichtigen physiologischen Transmembran-Signalmechanismen beitragen (Bienert & Chaumont, 2014; Pini et al., 2021; Wang et al., 2020). Da in den SH SY5Y Zellen vor allem die AQP-Isoform AQP1 exprimiert wird (Pini et al., 2021), soll untersucht werden, wie sich die Blockierung der AQP1 auf das extrazelluläre H_2O_2 -Signal auswirkt. Dazu wurden die AQP1 mit dem spezifischen Inhibitor Bacopaside II geblockt und anschließend das extrazelluläre H_2O_2 -Signal mittels des spezifischen Amplex Red Assays gemessen. Bacopaside II als AQP1-Inhibitor verhindert den H_2O_2 -Transport durch AQP1 durch das Andocken an den cytoplasmatischen Vorhof der AQP1 (Pei et al., 2016). Nach der Behandlung der SH SY5Y Zellen und Zell-freier Wells, als Kontrolle, mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose in DMEM (0,1 % FCS) für 24 oder 48 h, wurde 30 min vor Beginn der Messung zusätzlich 10 μL Bacopaside II, in einer Endkonzentration von 10 μM , oder die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle (1 % DMSO) hinzugegeben. Das Resorufin-Signal wurde anschließend in Hank's Puffer (8 mM) kinetisch gemessen und auf die Behandlungsgruppe, welche 8,25 mM Glucose für 24 h und die Lösungsmittel-Kontrolle erhielt (= 100 %), normiert und als extrazelluläres H_2O_2 in Prozent dargestellt.

Der AQP-Inhibitor Bacopaside II hatte keinen Einfluss auf das Hintergrund-Signal, gemessen in den mitgeführten Zell-freien Wells (Anhang Tab. 28).

Anhand der Kontrollen ist zu erkennen, dass eine 24-stündige Hypoglykämie zu einem signifikanten Anstieg des extrazellulären H_2O_2 -Signals um 36 % führte im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ist das extrazelluläre H_2O_2 -Signal der Kontrollgruppe, welche 24 h mit 16,5 mM Glucose behandelt wurde, signifikant um 28 % niedriger als das H_2O_2 -Signal der normoglykämisch kultivierten Zellen ($p < 0,001$) (Abb. 42 B). Nach 48 h sank das extrazelluläre H_2O_2 -Signal der Kontrollen unabhängig von der Glucose-Konzentration auf etwa 60 % ab (Abb. 42 C). Wurden die AQP1 mittels Bacopaside II geblockt, sank das extrazelluläre H_2O_2 -Signal unabhängig von der Glucose-Konzentration nach 24 h auf etwa 50 % und nach 48 h auf etwa 40 % ab (Abb. 42 B und C).

Da alle Behandlungsgruppen, welche mit Bacopaside II inkubiert wurden, auf einen Wert zwischen 40 bis 50 % reduziert wurden, muss das gemessene H_2O_2 aus dem intrazellulären Raum stammen. Das mit abnehmender Glucose-Konzentration ansteigende extrazelluläre H_2O_2 -Signal der Kontrollgruppen lässt damit eine Aussage

über die intrazelluläre Konzentration des gesamten Wasserstoffperoxids zu. Nach 24-stündiger Hypoglykämie könnte das NOX3-produzierte Superoxid durch die SOD1 im Cytosol umgewandelt werden und dann über die AQP1 in den extrazellulären Raum gelangen.

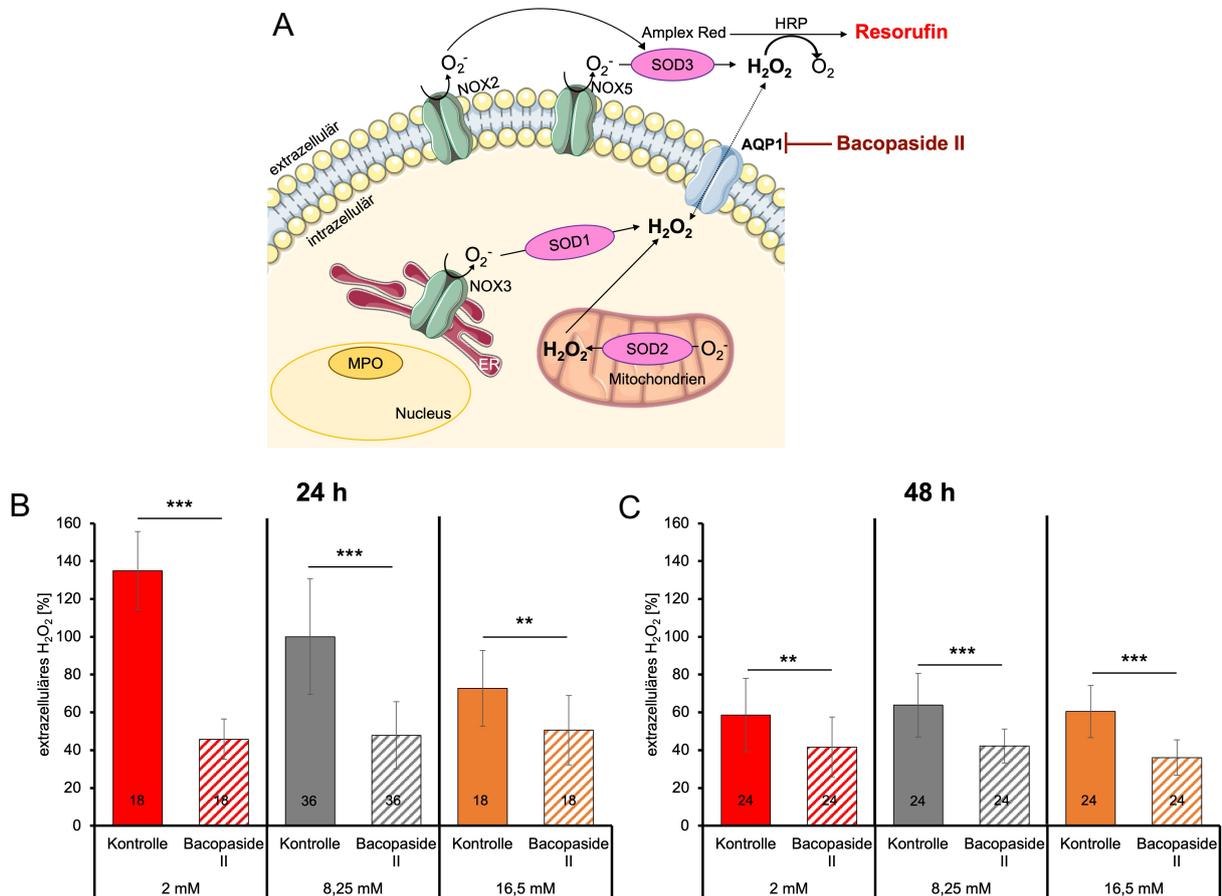


Abbildung 42 Extrazelluläres H₂O₂-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und Inhibition der AQP1.

A: Schematische Darstellung der Messung von extrazellulärem H₂O₂ mittels Amplex Red Assay und der möglichen Quellen des H₂O₂, welches durch AQP1 über der Plasmamembran diffundieren kann. **B, C:** Extrazelluläres H₂O₂-Signal nach Inkubation der Zellen mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**B**) oder 48 h (**C**). Darstellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose für 24 h normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des extrazellulären H₂O₂-Signals in Prozent in Abhängigkeit der Glucose-Konzentrationen im Medium und der Behandlung mit der Lösungsmittel-Kontrolle oder dem AQP1-Inhibitor Bacopaside II. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zwi-tiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{24\text{ h } 2\text{ mM}} < 0,001$; $p_{24\text{ h } 8,25\text{ mM}} < 0,001$; $p_{24\text{ h } 16,5\text{ mM}} = 0,0015$; $p_{48\text{ h } 2\text{ mM}} = 0,0019$; $p_{48\text{ h } 8,25\text{ mM}} < 0,001$; $p_{48\text{ h } 16,5\text{ mM}} < 0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

4.4.8 48-stündige Hypoglykämie beeinflusst die Proteinmenge der NOX5

Die Aktivität der SOD3 wird reguliert durch das Abspalten ihrer Heparin-bindenden Domäne. Nach der proteolytischen Abspaltung der Heparin-bindenden Domäne nimmt die Aktivität der SOD3 ab. Dieser Vorgang führt zu einer Abnahme der Proteinmenge der SOD3 (Bowler et al., 2002; Enghild et al., 1999). Daher wurde der Proteingehalt der SOD3 und NOX5 als extrazelluläre Komponenten des „RONS-Netzwerks“ nach der Behandlung der SH SY5Y Zellen mit DMEM klar (0,1 % FCS) mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h mit Hilfe eines ELISAs untersucht. Es wurde auf den Mittelwert der Behandlungsgruppe, welche 8,25 mM Glucose für 24 h erhielt, normiert. Es gab keinen Unterschied im relativen Proteingehalt der SOD3 zwischen den drei Glucose-Konzentrationen unabhängig von der Inkubationszeit (Anhang Tab. 34).

Der relative Proteingehalt der NOX5 nahm insgesamt über die Zeit zu. Eine Hypoglykämie über 48 h führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen NOX5-Proteinmenge um 82 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Tab. 9).

Tabelle 9 Relativer Proteingehalt der NOX5 nach 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Proteingehalts in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, die Anzahl der gemessenen Wells (n) sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen 8,25 mM).

Inkubationszeit	NOX5					
	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	85,55	100,00	98,02	249,34	166,88	149,11
Standardabw.	57,09	49,88	42,36	93,15	83,97	71,49
Anzahl	11	11	9	12	12	12
Statistik	ns		ns	0,0329		ns

Zusammenfassend wurden nach einer langzeitigen Hypo- und Hyperglykämie unterschiedliche Änderungen im „RONS-Netzwerk“ im Vergleich zur Normoglykämie festgestellt.

Während nach einer Hypoglykämie der Beitrag des gesamten intrazellulären Superoxids über die Zeit zunahm, welches auf eine zunehmende Produktion über die Mitochondrien und die NOX3 zurückgeführt werden konnte, konnte unter Hyperglykämie nur ein Beitrag von MPO-produziertem HOCl zum intrazellulären

RONS-Signal festgestellt werden. Unter normoglykämischen Bedingungen konnte nach 24 h ein Beitrag von NOX3-produziertem Superoxid zum intrazellulären RONS-Signal ermittelt werden (Tab. 10).

Tabelle 10 Zusammenfassung des Beitrags RONS-produzierender Quellen zum intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.

Der Beitrag der Mitochondrien wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX Red gemessen. Die Effekte der Inhibition der NOX3 mittels Ebselen und der MPO mittels 4-ABHA lassen Aussagen auf den Beitrag der NOX3 und MPO zum intrazellulären RONS-Signal gemessen mittels H₂DCFDA zu. Pfeil nach unten beschreibt eine Abnahme und Pfeil nach oben eine Zunahme des MitoSOX Red-Signals oder des intrazellulären RONS-Signals nach der Inhibition der NOX3 oder der MPO. Die Stärke der Pfeile entspricht der Stärke des Effekts. Leere Tabellen-Felder kennzeichnen fehlende Effekte auf das MitoSOX Red-Signal oder der Inhibitionen auf das intrazelluläre RONS-Signal.

Ziel	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mitochondrien	↓			↑		
NOX3 (Ebselen)	↓	↓		↓		
MPO (4-ABHA)			↑			↑

4.5 Kurzzeitiger Glucose-Entzug

Im Zuge dieser Arbeit sollten die Auswirkungen eines zweiten Szenarios, des kurzzeitigen Entzugs von Glucose, auf den Metabolismus und die RONS-Produktion der SH SY5Y Zellen untersucht werden. Der Glucose-Entzug stellt eine extreme Form der Hypoglykämie dar. Der Entzug von Glucose und Sauerstoff, wie er bei einem ischämischen Schlaganfall vorkommt, kann eine Vielzahl von pathogenen Mechanismen hervorrufen wie eine Calcium-Überladung, mitochondriale Dysfunktionen oder oxidativen Stress, ausgelöst durch zellulären Energiemangel (Cimarosti & Henley, 2008). Während eines ischämischen Schlaganfalls können RONS zum oxidativen Stress beitragen oder auch als Signalmoleküle verschiedene Ziele beeinflussen (Chan, 2001).

Eine komplette Unterbrechung des Blutflusses zum Gehirn führt bereits ab fünf Minuten zum Absterben von Neuronen (Lee et al., 2000). Daher wurde der kurzzeitige Effekt eines Glucose-Entzugs auf RONS in den SH SY5Y Zellen untersucht. Die Zellen erhielten DMEM (0,1 % FCS) ohne Glucose oder mit einer physiologischen Glucose-Konzentration von 8,25 mM für 30 min.

4.5.1 Glucose-Entzug hat keinen Einfluss auf die ATP-Produktion

Während eines 30-minütigen Entzugs von Glucose steht den SH SY5Y Zellen keine Glucose zur Verfügung, welche über die Glykolyse oder OXPHOS zur ATP-Produktion verwendet werden könnte. Zur Untersuchung der Auswirkungen des kurzen Glucose-Entzugs auf die zelluläre ATP-Produktion wurde ein Seahorse ATP Rate Assay durchgeführt.

Vor der Messung der zellulären ATP-Produktion wurde die Inkubationszeit der Zellen im XF DMEM genutzt, um die Auswirkungen eines 30-minütigen Glucose-Entzugs auf die Zell-Viabilität zu bestimmen. Die Zellzahl wurde mittels BioTek Cytation 5 System ermittelt. Ein 30-minütiger Entzug der Glucose hatte keine Auswirkungen auf die Zell-Viabilität (Anhang Tab. 18). Um die Vergleichbarkeit der Daten mit den Messungen nach langzeitiger Hypo- und Hyperglykämie zu gewährleisten, wurden trotz dessen alle nachfolgenden Mess-Daten auf die Zellzahl normiert.

Die Ermittlung der zellulären ATP-Produktion mittels Seahorse ATP Rate Assay ergab, dass die SH SY5Y Zellen nach 1,5-stündiger Inkubation in DMEM (0,1 % FCS, 8,25 mM) insgesamt etwa 400 pmol ATP pro Minute produzierten. 30 % des gesamten ATPs, etwa 120 pmol/min ATP, wurden über die mitochondriale oxidative

Phosphorylierung gewonnen. 70 % des gesamten ATPs, zwischen 280 bis 300 pmol/min ATP, wurden über Glykolyse produziert. Nach dem Entzug der Glucose für 30 min blieb die ATP-Produktion über die OXPHOS (MitoATP) und die Glykolyse (GlykoATP) gleich (Abb. 43 B). Anhand der Energiekarte in Abbildung 43 C ist zu erkennen, dass die Zellen nach der 30-minütigen Behandlung mit 0 mM Glucose zu einem eher ruhenden und glykolytischeren Energie-Phänotyp tendierten im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch nach kurzzeitiger Behandlung der SH SY5Y Zellen die Energiegewinnung hauptsächlich anaerob über die Glykolyse stattfindet und diese nicht durch einen kurzen Glucose-Entzug verändert wurde.

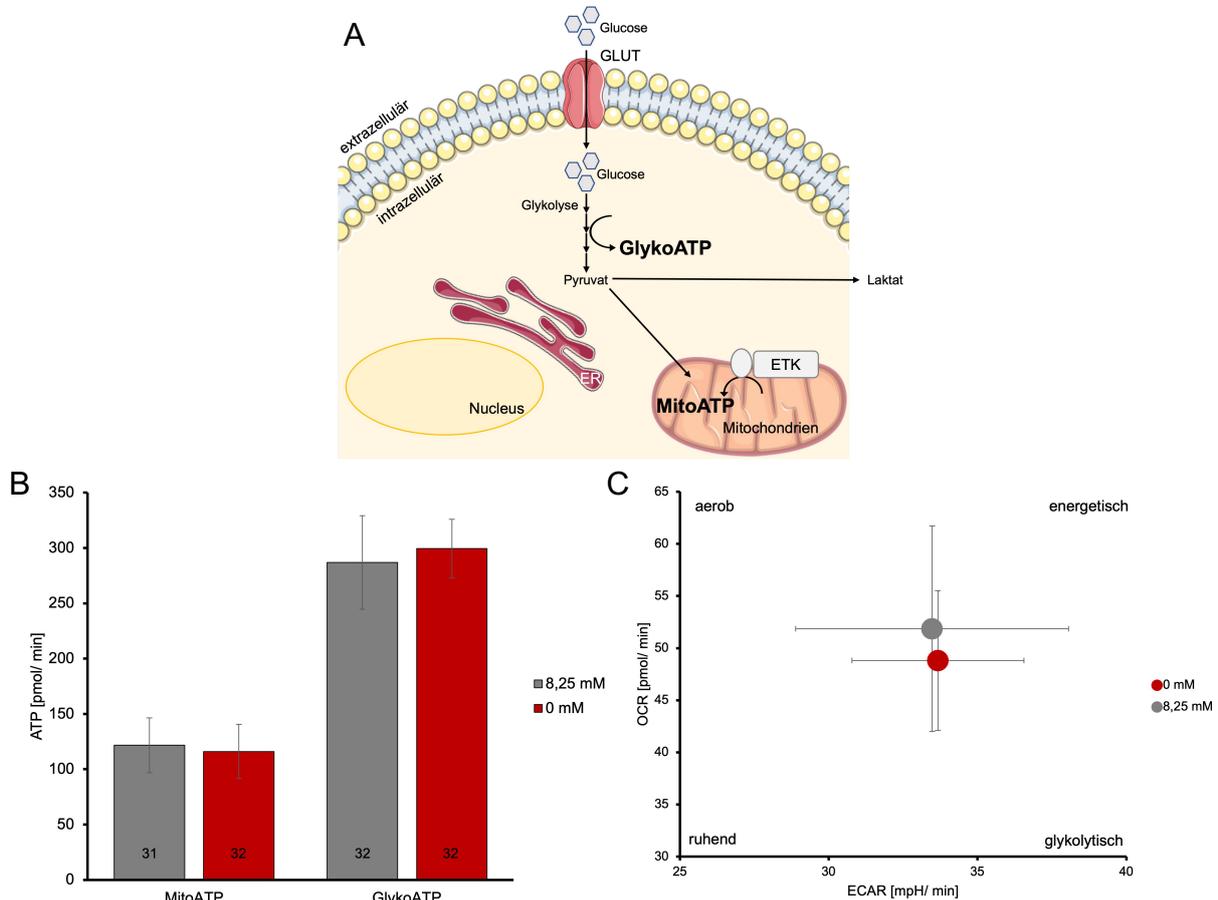


Abbildung 43 Aerobe und anaerobe ATP-Produktion nach kurzzeitigem Glucose-Entzug.

A: Schematische Darstellung der anaeroben ATP-Produktion über die Glykolyse (GlykoATP) und der aeroben ATP-Produktion über die mitochondriale OXPHOS (MitoATP). **B:** MitoATP und GlykoATP. Dargestellt wurde die Mittelwerte und Standardabweichungen der ATP-Produktion in pmol/min normiert auf die Zellzahl und das Hintergrund-Signal nach der Behandlung Zellen mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. **C:** Energiekarte der Zellen nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min. Aufgetragen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der oxidativen Verbrauchsrate (OCR) in pmol/min gegen die extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) in mpH/min normiert auf die Zellzahl und das Hintergrund-Signal (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Die Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion mittels des spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX Red bestätigt die Ergebnisse der Messung der mitochondrialen ATP-Produktion mittels des Seahorse ATP Rate Assay. Ein 30-minütiger Glucose-Entzugs hat keinen Effekt auf die mitochondriale Superoxid-Produktion (Anhang Tab. 36).

4.5.2 Kurzer Glucose-Entzug aktiviert die AMPK

Wie bereits nach 24-stündiger Hypoglykämie gezeigt, wird der Energiesensor AMPK bei einem langzeitigen Glucose-Defizit im Medium der SH SY5Y Zellen aktiviert. Daher sollten die Auswirkungen eines kurzzeitigen Glucose-Entzugs, als Extrem-Form der Hypoglykämie, auf die Aktivität der AMPK mittels ELISA untersucht werden. Die Werte wurden auf den Mittelwert der Behandlungsgruppe, welche mit 8,25 mM Glucose im Medium kultiviert wurden, normiert.

Ein kurzer Glucose-Entzug von 30 min führte zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses der aktivierten und phosphorylierten Form (pAMPK) zur inaktivierten Form der AMPK um 43 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Tab. 11).

Tabelle 11 Relatives Verhältnis der pAMPK zur AMPK nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung des Verhältnisses der pAMPK/ AMPK in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose, die Anzahl von je vier gemittelten Wells sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t Test für unabhängige Stichproben gegen 8,25 mM).

Glucose	8,25 mM	0 mM
Mittelwert	100,00	142,78
Standardabw.	17,84	12,62
Anzahl	4	5
Statistik		0,0089

Die Ergebnisse des ersten Szenarios, der Langzeit-Behandlungen mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen im Medium, zeigen, dass die Inhibition der AMPK mittels Compound C das intrazelluläre RONS-Signal in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration, unterschiedlich verändert. Um daher die Rolle der AMPK bei der Modulation der intrazellulären RONS-Produktion bei dem zweiten Szenario, eines 30-minütigen Glucose-Entzugs, in den SH SY5Y Zellen zu untersuchen, wurden Compound C oder die Kontrolle (1x PBS) gleichzeitig mit der Behandlung von 8,25

oder 0 mM Glucose hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Bei allen nachfolgenden Messungen des DCF-Signals wurden die relativen Steigungen auf den Mittelwert der Gruppe, welche 8,25 mM Glucose und die Kontrolle erhielt, normiert und in Prozent dargestellt. Es kam zu keiner Änderung des RONS-Signals nach der Inhibition der AMPK (Tab. 12).

Tabelle 12 Einfluss von Compound C auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals der SH SY5Y Zellen in Prozent normiert auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die Kontrolle (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Glucose	8,25 mM		0 mM	
	Kontrolle	Compound C	Kontrolle	Compound C
Mittelwert	100,00	99,53	105,29	98,40
Standardabw.	14,81	14,24	13,32	12,58
Anzahl	35	35	32	34
Statistik		ns		ns

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Gegensatz zu einer 24-stündigen Hypoglykämie die AMPK, trotz Aktivitätssteigerung nach 30-minütigem Glucose-Entzug das intrazelluläre RONS-Signal nicht verändert.

Bei der Untersuchung des ersten Szenarios konnte nach langzeitiger Hyperglykämie mittels der Inhibition der Myeloperoxidase auf einen Beitrag des MPO-produzierten HOCl zum intrazellulären RONS-Signal geschlossen werden. Um daher die Rolle der Myeloperoxidase nach kurzzeitigem Glucose-Entzug in den SH SY5Y Zellen zu beurteilen, wurde der Inhibitor 4-AHBA eingesetzt. Die Zellen wurden dafür gleichzeitig mit der Inkubation des Inhibitors 4-ABHA, in einer Endkonzentration von 1 mM, oder der Kontrolle (1 % DMSO) für 30 min in DMEM (0,1 % FCS) mit 8,25 oder 0 mM Glucose behandelt.

Die Inhibition der Myeloperoxidase mittels 4-ABHA hatte keinen Einfluss auf das intrazelluläre RONS-Signal (Tab. 13).

Tabelle 13 Einfluss von 4-ABHA auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals der SH SY5Y Zellen in Prozent normiert auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die Kontrolle (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Glucose	8,25 mM		0 mM	
	Kontrolle	4-ABHA	Kontrolle	4-ABHA
Mittelwert	100,00	101,79	92,01	86,28
Standardabw.	10,16	17,62	13,75	11,94
Anzahl	36	36	36	35
Statistik		ns		ns

Im Gegensatz zu einer langzeitigen Hyperglykämie kann damit die Beteiligung der Myeloperoxidase am intrazellulären RONS-Signal bei kurzem Glucose-Entzug ausgeschlossen werden.

4.5.3 Kurzzeitiger Glucose-Entzug hat keine nachweisbare Wirkung auf die intrazelluläre O₂-Produktion

Die Ergebnisse der Langzeitbehandlungen zeigen, dass vor allem unter Hypoglykämie die Inhibition von Superoxid-produzierenden Quellen, wie der NOX3, einen großen Effekt auf das intrazelluläre RONS-Signal hat, welcher mit zunehmender Behandlungsdauer ansteigt (Abb. 40).

Obwohl die bisherigen Messungen keinen Hinweis für Änderungen in der intrazellulären RONS-Produktion nach Glucose-Entzug liefern, wurde im Folgenden die Rolle der NOX3 bei einem kurzen Entzug der Glucose von nur 30 min untersucht. Ähnlich wie nach den Langzeit-Behandlungen wurde zunächst der Gesamtanteil von Superoxid am intrazellulären RONS-Signal mit Hilfe des Superoxid-spezifischen *Scavengers* Tiron ermittelt. Die Kontrolle (H₂O dest.) oder Tiron, in einer Konzentration von 100 µM, wurden zeitgleich mit dem DMEM (0,1 % FCS), welches 8,25 oder 0 mM Glucose enthielt, zu den Zellen gegeben und für 30 min inkubiert.

Sowohl bei normoglykämisch kultivierten Zellen als auch bei Zellen mit 30-minütigem Glucose-Entzug wurde das intrazelluläre RONS-Signal durch die Zugabe von Tiron signifikant reduziert (Abb. 44 B).

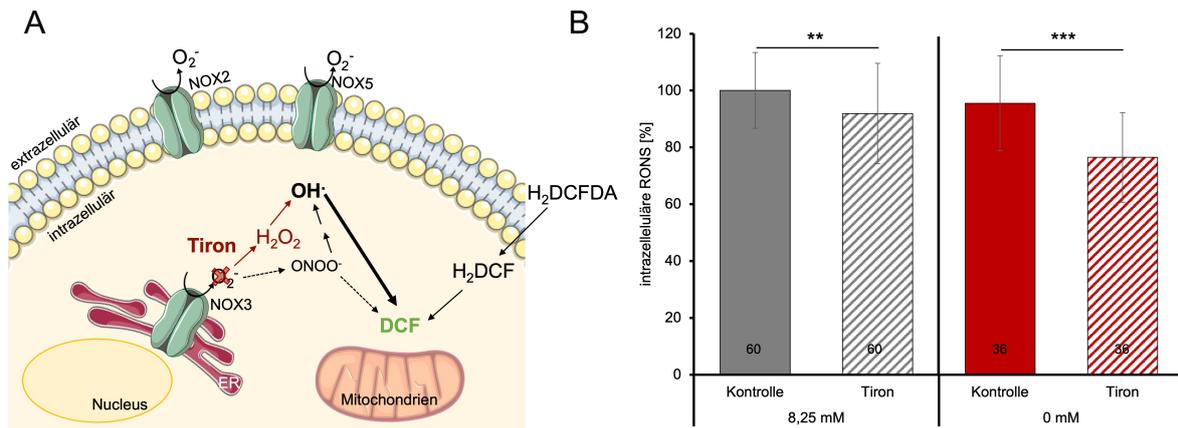


Abbildung 44 Intrazelluläres RONS-Signal nach 30-minütigen Glucose-Entzug und dem Wegfangen von Superoxid.

A: Schematische Darstellung der Messung der intrazellulären RONS nach dem Wegfangen von Superoxid mittels Tiron. Die Zugabe von Tiron erschöpft das intrazelluläre Superoxid (O_2^-). **B:** Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min und der Kontrolle oder Tiron. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{8,25 \text{ mM}}=0,0055$; $p_{0 \text{ mM}}<0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Um nun den Beitrag von NOX3-produziertem Superoxid zum intrazellulären RONS-Signal nach kurzem Glucose-Entzug zu untersuchen, wurde der spezifische NOX3-Inhibitor Ebselen verwendet (Abb. 45 A). Dafür wurden die Zellen 30 min mit 10 μM Ebselen oder der Lösungsmittel-Kontrolle (0,1 % DMSO) und DMEM (0,1 %) mit 8,25 oder 0 mM Glucose inkubiert.

Durch die Inhibition der NOX3 mittels Ebselen nahm das intrazelluläre RONS-Signal unter normoglykämischen Bedingungen signifikant um 20 % und nach dem kurzen Entzug der Glucose für 30 min um etwa 30 % ab, jeweils im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 45 B). Im Gegensatz zur langzeitigen Hypoglykämie zeigen sich keine, für den kurzen Glucose-Entzug spezifischen Unterschiede.

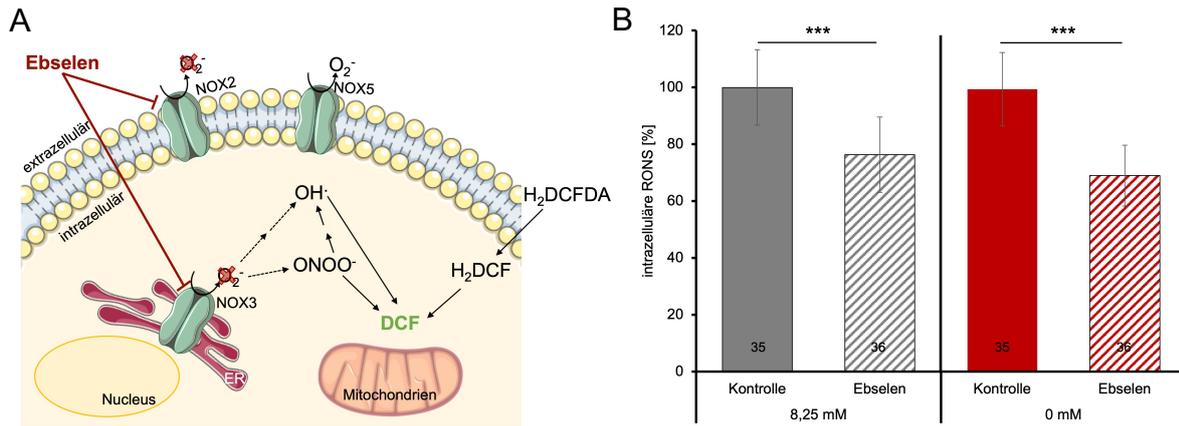


Abbildung 45 Intrazelluläres RONS-Signal nach 30-minütigen Glucose-Entzug und der Inhibition der NOX3.

A: Schematische Darstellung der Messung der intrazellulären RONS nach der Inhibition der NOX3 mittels Ebselen.

B: Intrazelluläres RONS-Signal nach der Inkubation mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min und der Kontrolle oder Ebselen. Dargestellt sind die auf die Kontrolle mit 8,25 mM Glucose normierten Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Wells (n) ist in den Balken angegeben. (Statistik: zweiseitiger t Test mit unabhängigen Stichproben gegen die Kontrolle: $p_{8,25 \text{ mM}} < 0,001$; $p_{0 \text{ mM}} < 0,001$) (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

4.5.4 Kurzer Glucose-Entzug hat keinen Einfluss auf extrazelluläres H_2O_2

Bei der Untersuchung des ersten Szenarios, langzeitiger Behandlungen mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen, konnte anhand des extrazellulären H_2O_2 -Signals eine Aussage über die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration getroffen werden. Mit abnehmender Glucose-Konzentration im Medium stieg das extrazelluläre H_2O_2 -Signal in den Kontrollgruppen.

Daher sollte der Einfluss eines 30-minütigen Glucose-Entzugs auf das extrazelluläre H_2O_2 -Signal mit Hilfe des Amplex Red Assays untersucht werden. Nach der 30-minütigen Inkubation der SH SY5Y Zellen in DMEM (0,1 % FCS) mit 8,25 oder 0 mM Glucose wurde das Resorufin-Signal kinetisch in Hank's Puffer (8 mM) gemessen und die relativen Steigungen auf die Behandlungsgruppe mit 8,25 mM Glucose normiert. Es konnte extrazellulär kein Unterschied im H_2O_2 -Signal nach einem kurzen Glucose-Entzug im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen festgestellt werden (Tab. 14).

Tabelle 14 Einfluss des Glucose-Entzugs auf das extrazelluläre H₂O₂-Signal.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des extrazellulären H₂O₂-Signals der SH SY5Y Zellen in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 8,25 mM (zweiseitiger t-Test gegen unabhängige Stichproben).

Inkubationszeit	20 min	
Glucose	8,25 mM	0 mM
Mittelwert	100,00	104,00
Standardabw.	11,36	10,53
Anzahl	24	23
Statistik		ns

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine der getesteten Komponenten des „RONS-Netzwerks“ nach einem kurzzeitigen Glucose-Entzug eine spezifische Rolle spielen.

4.6 Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit auf Acetylcholin-induzierte intrazelluläre Calcium-Signale

Neuronen passen ihre Aktivität dynamisch an externe Einflüsse, wie die Glucose-Konzentration, an (Lundgaard et al., 2015; Turrigiano, 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit im Zellkultur-Medium unterschiedliche RONS-Quellen aktiviert werden. RONS modulieren ein weiteres zelluläres Kommunikationssystem, Calcium, zum Beispiel über Redox-Modifikationen der Calcium-Kanäle und -Pumpen (Doser & Hoerndli, 2021; Pecchillo Cimmino et al., 2023; Vermot et al., 2021). Des Weiteren modulieren RONS und Calcium die Aktivität des Energiesensors AMPK (Muraleedharan & Dasgupta, 2022; Steinberg & Hardie, 2023). Da es bei SH SY5Y Zellen möglich ist, Transmitter-induzierte intrazelluläre Calcium-Signale mittels Calcium-Messungen zu analysieren (Gould et al., 1992; Ridley et al., 2002), sollen im Folgenden die Auswirkungen verschiedener Glucose-Behandlungen auf das intrazelluläre Calcium-Signal untersucht werden.

4.6.1 Langzeitige Hypo- und Hyperglykämie beeinflussen Transmitter-induzierte Calcium-Signale

Das intrazelluläre Calcium-Signal der SH SY5Y Zellen wurde nach der Inkubation mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose in DMEM (0,1 % FCS) für 24 oder 48 h gemessen. Die SH SY5Y Zellen wurden vor Beginn der Messung für 15 min mit dem Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM beladen. Während der Messung wurden die Zellen zwei kurzen ACh-Stimuli im Abstand von 60 sec in Hank's Puffer (8 mM) unterzogen.

Bei der Auswertung der relativen Calcium-Signale in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit im Medium wurde zunächst die Reaktivität der SH SY5Y Zellen nach der ersten (1.Peak) und der zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) betrachtet. Reagierende Zellen wurden definiert also solche, welche nach der Stimulation mit Acetylcholin eine Schwelle von 1,1, im Vergleich zum Signal vor der ACh-Stimulation (= 1,0), überschritten. Eine Hypoglykämie, induziert durch 2 mM Glucose, für 24 und 48 h führte zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl reagierender Zellen nach der zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) um etwa 18 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen. Eine Hyperglykämie zeigte keine Unterschiede in der Anzahl reagierender Zellen im Vergleich zur Normoglykämie (Tab. 15).

Tabelle 15 Einfluss von Hypo- und Hyperglykämie auf die Anzahl reagierender Zellen nach 24 und 48 h.

Dargestellt wurde der prozentuale Anteil reagierender Zellen an der Gesamtzellzahl sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (Chi²-Test). Als reagierende Zellen galten SH SY5Y Zellen, welche eine relative Fluoreszenzintensität nach der ersten ACh-Stimulation (1.Peak) oder nach der zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) von 1,1 überschritten.

Inkubationszeit	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
1.Peak	99,3	98,5	98,4	98,51	98,79	99,58
Statistik 1.Peak	ns		ns	ns		ns
2.Peak	57,2	75,9	76,8	43,64	60,19	61,87
Statistik 2.Peak	< 0,001		ns	< 0,001		ns

Um zu analysieren, ob sich die Glucose-Konzentration im Medium auf die verschiedenen Phasen der Zell-Stimulation mittels ACh auswirkten, wurde der kinetische Verlauf des relativen Calcium-Signals betrachtet. Dafür wurden nur die Calcium-Signale der reagierenden Zellen analysiert. Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden die Kurven der zwei ACh-Stimulationen in Bereiche unterteilt. Die statistisch betrachteten Zeitfenster sind in Abbildung 46 grau hinterlegt. 24 h nach der Behandlung mit den verschiedenen Glucose-Konzentrationen gab es keinen Unterschied im Maximum des ersten Peaks. Im Vergleich zu den normoglykämisch kultivierten Zellen verläuft die Repolarisation der hyperglykämisch kultivierten Zellen schneller und bei hypoglykämisch kultivierten Zellen langsamer (Abb. 46 A). Aufgrund der unterschiedlich schnell verlaufenden Repolarisation nach der ersten ACh-Stimulation in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit, zeigen die Zellen zum Zeitpunkt der zweiten ACh-Stimulation unterschiedlich hohe Calcium-Signale. Das Maximum des zweiten Peaks ist nach 24-stündiger Hyperglykämie signifikant höher als bei den anderen Behandlungsgruppen. Das Maximum des zweiten Peaks bei hypoglykämisch kultivierten Zellen ist nach 24 h signifikant niedriger (Abb. 46 C). Nach einer Hyperglykämie für 48 h ist das Maximum des ersten Peaks signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Die Repolarisation der hypo- und hyperglykämisch kultivierten Zellen verläuft signifikant langsamer im Vergleich zur Normoglykämie (Abb. 46 B). Das Maximum des zweiten Peaks nach einer Hypoglykämie für 48 h ist signifikant höher. Nach einer Hyperglykämie für 48 h ist das Maximum des zweiten Peaks signifikant niedriger im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Abb. 46 D).

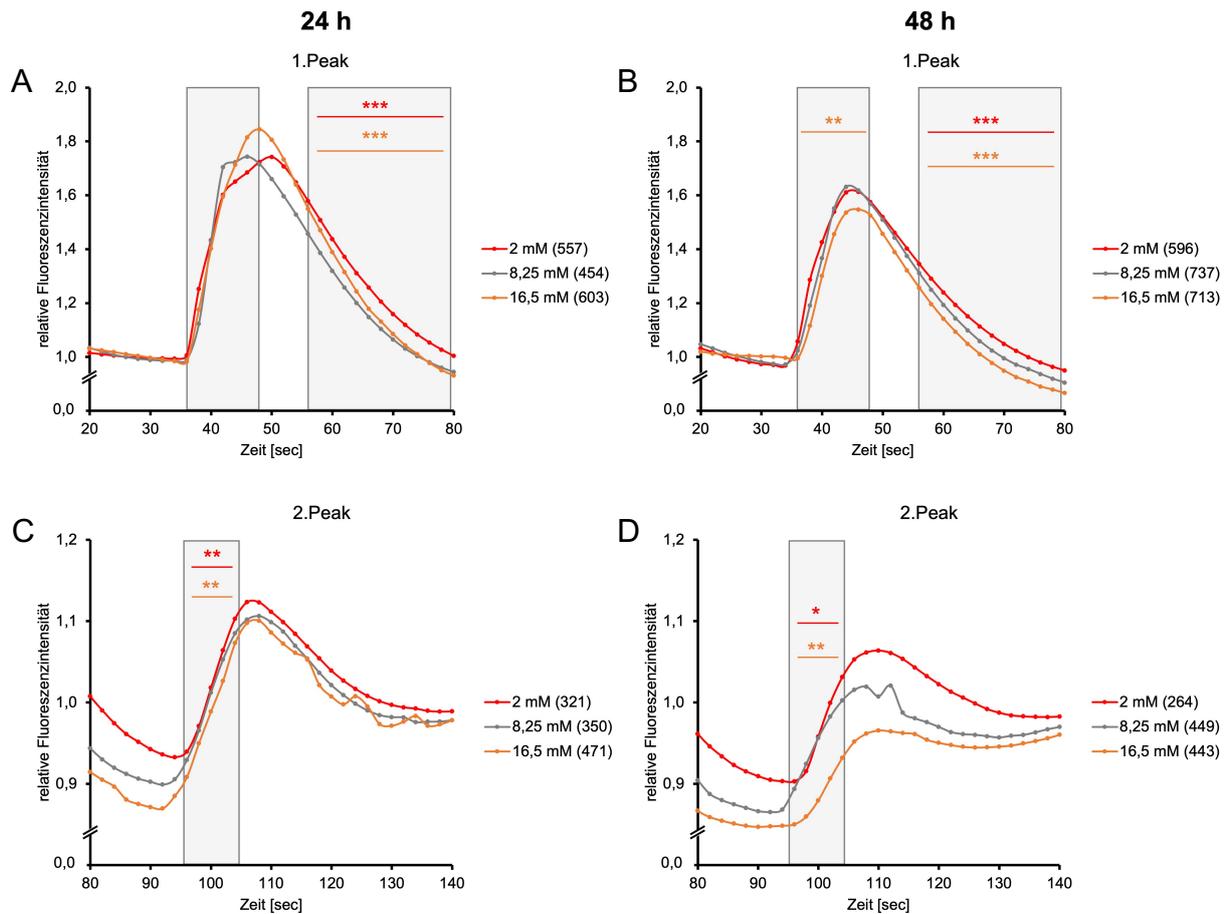


Abbildung 46 Einfluss von 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie auf das Acetylcholin-induzierte Calcium-Signal.

Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität reagierender Zellen nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (A, C) oder 48 h (B, D) und der zweifachen Stimulation mit Acetylcholin nach 20 und 80 Sekunden. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität gegen die Zeit in Sekunden. Die grauen Flächen markieren die statistisch betrachteten Bereiche von Sekunde 36-48, 56-80 (A, B) und Sekunde 98-108 (C, D). A-D: Zeitlicher Verlauf des relativen Calcium-Signals nach der ersten ACh-Stimulation (1.Peak) (A, B) und nach der zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) (C, D). Die Anzahl der reagierenden Zellen (n) ist in Klammern hinter der Behandlung angegeben. (Statistik: einseitiger ANOVA mit wiederholten Messungen: 24 h: $p_{\text{Repolarisation 8,25 vs 16,5 mM}} < 0,001$; $p_{\text{Repolarisation 2 vs 8,25 mM}} < 0,001$ (A); $p_{\text{2.Peak 8,25 vs 16,5 mM}} = 0,0017$; $p_{\text{2.Peak 2 vs 8,25 mM}} = 0,0035$ (C); 48 h: $p_{\text{1.Peak 8,25 vs 16,5 mM}} = 0,0025$; $p_{\text{Repolarisation 2 vs 8,25 mM}} < 0,001$; $p_{\text{Repolarisation 8,25 vs 16,5 mM}} < 0,001$ (B); $p_{\text{2.Peak 2 vs 8,25 mM}} = 0,0198$; $p_{\text{2.Peak 8,25 vs 16,5 mM}} = 0,0069$ (D)) (eigene Abbildung).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Erregbarkeit und das Transmitter-induzierte intrazelluläre Calcium-Signal der SH SY5Y Zellen in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit im Medium ändert. Dabei haben hypo- und hyperglykämische Glucose-Konzentrationen gegensätzliche Auswirkungen auf das intrazelluläre Calcium-Signal.

4.6.2 Kurzzeitiger Glucose-Entzug beeinflusst Acetylcholin-induzierte Calcium-Signale

Die Ergebnisse der Langzeit-Behandlungen zeigen, dass sich eine Hypoglykämie auf die Repolarisation nach der ersten ACh-Stimulation und die Reaktivität und das Maximum nach dem zweiten ACh-Stimulus auswirkt. Um daher die Auswirkungen der Extrem-Form der Hypoglykämie, eines kurzzeitigen Glucose-Entzugs, auf das Transmitter-induzierte intrazelluläre Calcium-Signal zu untersuchen, wurden die SH SY5Y Zellen 15 min nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose in DMEM (0,1 % FCS) für weitere 15 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM inkubiert. Anschließend wurde die Änderung des relativen Fluoreszenzsignals nach zwei kurzen Acetylcholin-Stimuli in einem Abstand von 60 Sekunden analysiert.

Bei der Auswertung der intrazellulären Calcium-Signale wurde zuerst die Anzahl reagierender Zellen nach der ersten (1.Peak) und zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) betrachtet. Eine 30-minütiger Glucose-Entzug führte zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl reagierender Zellen nach dem zweiten Peak um 14 % im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (Tab. 16).

Tabelle 16 Einfluss von kurzzeitigen Glucose-Entzug auf die Anzahl reagierender Zellen.

Dargestellt wurde der prozentuale Anteil reagierender Zellen an der Gesamtzellzahl sowie der p-Wert der statistischen Auswertung (Chi²-Test). Als reagierende Zellen galten SH SY5Y Zellen, welche eine relative Fluoreszenzintensität nach der ersten ACh-Stimulation (1.Peak) oder nach der zweiten ACh-Stimulation (2.Peak) größer 1,1 aufwiesen.

30 min	1.Peak		2.Peak	
	8,25 mM	0 mM	8,25 mM	0 mM
Reagierende Zellen	99,5	99,4	89,9	75,8
Statistik		ns		<0,001

Die Betrachtung des kinetischen Verlaufs des relativen intrazellulären Calcium-Signals, induziert durch Acetylcholin, ergab, dass ein 30-minütiger Glucose-Entzug zu einer signifikanten Reduktion des Maximums des ersten Peaks, einer langsameren Repolarisation (Abb. 47 A) und zu einem signifikant reduzierten Maximum des zweiten Peaks im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen führte (Abb. 47 B).

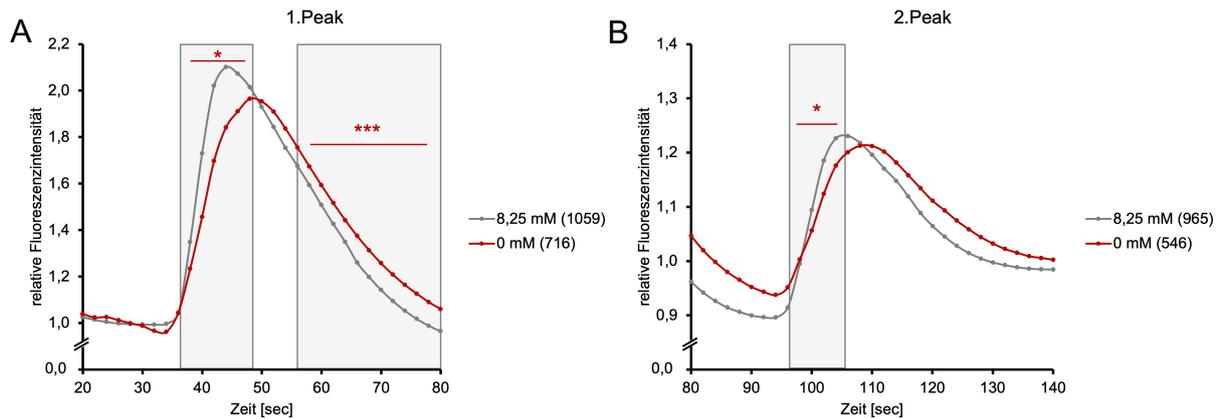


Abbildung 47 Einfluss von 30-minütigem Glucose-Entzug auf das Acetylcholin-induzierte Calcium-Signal.

Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität reagierender Zellen nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose und der zweifachen Stimulation mit Acetylcholin nach 20 und 80 Sekunden. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität gegen die Zeit in Sekunden. Die grauen Flächen markieren die statistisch betrachteten Bereiche von Sekunde 20-24, 36-48, 56-80 (**A**) und Sekunde 98-108 (**B**). **A, B:** Zeitlicher Verlauf des intrazellulären relativen Calcium-Signals nach der ersten ACh-Stimulation bei Sekunde 20 (1.Peak) (**A**) und der zweiten ACh-Stimulation bei Sekunde 80 (2.Peak) (**B**). Die Anzahl der reagierenden Zellen (n) ist in Klammern hinter der Behandlung angegeben. (Statistik: einseitiger ANOVA mit wiederholten Messungen: $p_{\text{Peak-Maximum 8,25 vs 0 mM}}=0,0108$; $p_{\text{Repolarisation 8,25 vs 0}}<0,001$; $p_{\text{2.Peak 8,25 vs 0 mM}}=0,0413$) (eigene Abbildung).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein kurzzeitiger Glucose-Entzug, wie eine langzeitige Hypoglykämie die Repolarisation verlangsamt und die Reaktivität der Zellen nach der zweiten ACh-Stimulation reduziert. Diese zwei Szenarien unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Effekte auf das Maximum des ersten Peaks, welches bei einem Glucose-Entzug reduziert wird, und auf das Maximum des zweiten Peaks, welches nach einer Hypoglykämie höher und nach kurzem Glucose-Entzug niedriger ist im Vergleich zu den jeweiligen normoglykämisch kultivierten Zellen.

5. Diskussion

Abnormalitäten des Glucose-Metabolismus können langfristig zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führen. Verursacht wird ein abnormaler Glucose-Metabolismus durch chronische Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes mellitus, oder unter extremen Bedingungen durch einen ischämischen Schlaganfall. Eine auftretende Hypo- oder Hyperglykämie bei Diabetes mellitus sowie ein Glucose-Entzug durch einen ischämischen Schlaganfall haben die Beteiligung von RONS an ihrer Pathophysiologie gemeinsam (Zhang et al., 2023). RONS können als Signalmoleküle auf die metabolische Programmierung der Zellen, die neuronale Erregbarkeit oder auf andere Enzyme wie die AMPK Einfluss nehmen (Doser & Hoerndli, 2021; Pecchillo Cimmino et al., 2023; Sanderson et al., 2013; Vermot et al., 2021; Zhang et al., 2023). Bei der Untersuchung des Zusammenhangs der RONS und eines abnormalen Glucose-Metabolismus wurde bisher immer nur ein Szenario eines abnormalen Glucose-Metabolismus unabhängig von anderen Szenarien untersucht (Isaev et al., 2008; Lamichhane et al., 2017; Li et al., 2022; Páramo et al., 2010; Zhang et al., 2004). Des Weiteren wurden unterschiedlichste Methoden und Zellkultur-Bedingungen verwendet, welche zu Widersprüchlichkeit in den Erkenntnissen führten. Aufgrund dessen sind die allgemeinen zugrundeliegenden Mechanismen der drei Szenarien einer Hypo- und Hyperglykämie sowie eines Glucose-Entzugs noch weitgehend unklar.

In dieser Arbeit wurden erstmals die Einflüsse aller drei Szenarien einer veränderten Glucose-Verfügbarkeit, einer langzeitigen Hyper- und Hypoglykämie für 24 und 48 h, sowie eines kurzzeitigen Glucose-Entzugs von 30 min, vergleichend zu normoglykämischen Bedingungen in der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH SY5Y untersucht. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist es jetzt möglich, die zugrundeliegenden Mechanismen dieser drei Szenarien zu identifizieren. Dafür wurden, im Gegensatz zur bisherigen Literatur (McKee & Komarova, 2017), physiologische Glucose-Konzentrationen verwendet, welche sich an den Blut-Glucose-Werten des Menschen orientieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch im Vergleich zur Normoglykämie langzeitige Hyper- und Hypoglykämie zu unterschiedlichen Änderungen im „RONS-Netzwerk“ führen. Der Einfluss eines kurzzeitigen Glucose-Entzug auf das „RONS-Netzwerk“ unterschied sich nicht von dem der kurzzeitigen Normoglykämie. Während

bei langzeitiger Hyperglykämie MPO-produziertes HOCl einen entscheidenden Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal leistete, konnte unter Hypoglykämie eine zunehmende Superoxid-Produktion über die Mitochondrien und die NOX3 festgestellt werden. Die NOX3 leisteten auch nach der kurzen Behandlungsdauer von 30 min, unabhängig von der Glucose-Konzentration im Medium, einen Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal. Das ansteigende extrazelluläre H_2O_2 -Signal mit abnehmender Glucose-Konzentration lässt auf Änderungen der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit im Medium schließen, welches mit den intrazellulär identifizierten aktiven RONS-Quellen übereinstimmt (Abb. 48).

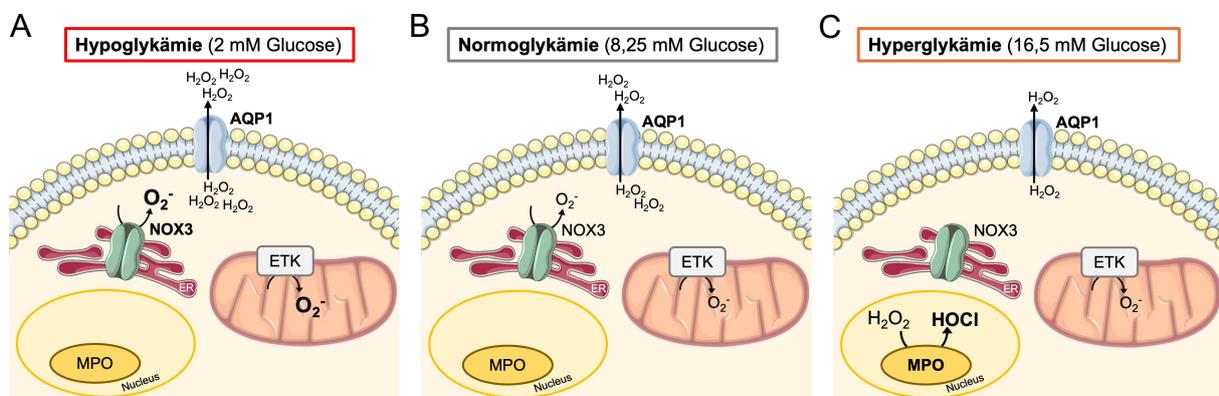


Abbildung 48 Schematische Darstellung des Einflusses der Glucose-Verfügbarkeit auf die RONS-Produktion der SH SY5Y Zellen.

A: Unter langzeitiger Hypoglykämie leistete das NOX3-produzierte Superoxid und das mitochondrial produzierte Superoxid einen ansteigenden Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal. **B:** Nach 24-stündiger Normoglykämie wurden die NOX3 als Superoxid-Quelle identifiziert. **C:** Nur unter langzeitiger Hyperglykämie konnte eine erhöhte Aktivität der MPO festgestellt werden. Das ansteigende extrazelluläre H_2O_2 -Signal mit abnehmender Glucose-Konzentration sowie der Effekt der AQP1-Inhibition lassen auf Änderungen in der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit schließen (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

5.1 Hyperglykämie wirkt über Myeloperoxidase-vermittelte HOCl-Produktion auf physiologische Prozesse

Eine langzeitige Hyperglykämie unterschied sich hinsichtlich des Einflusses auf das „RONS-Netzwerk“ deutlich von den hypo- und normoglykämischen Bedingungen. Eine 48-stündige Hyperglykämie reduzierte die mitochondriale Masse pro Zelle signifikant im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen, wobei das MitoATP und das mitochondrial produzierte Superoxid sich nicht von der Normoglykämie unterschieden. Des Weiteren konnte nur bei dem Szenario einer langzeitigen Hyperglykämie ein

entscheidender Beitrag des MPO-produzierten HOCl zum intrazellulären RONS-Signal festgestellt werden. Nach 24-stündiger Hyperglykämie diffundierte auch weniger H_2O_2 von intra- nach extrazellulär im Vergleich zur Normoglykämie.

Auf die Rolle der Myeloperoxidase bei chronischer Hyperglykämie, verursacht durch Diabetes mellitus oder Übergewicht, wiesen bereits einige wenige *in vitro*-Studien hin. Diese heterogenen Studien untersuchten die Rolle der MPO im Blut-Serum oder dem Gewebe von diabetischen und übergewichtigen Patienten oder Tieren und lieferten keine einheitlichen Erklärungen über die Aufgabe der MPO bei Hyperglykämie (Qaddoumi et al., 2020; Zhang et al., 2004). Die Studie von Qaddoumi et al. (2020) wies sowohl bei übergewichtigen diabetischen als auch nicht-diabetischen Teilnehmer einen erhöhten MPO-Wert im Blut-Plasma mittels ELISA nach. Der Mechanismus der MPO bei Übergewicht oder Diabetes wurde in dieser Studie nicht ermittelt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wies Zhang et al. (2004) im Gewebe diabetischer übergewichtiger Ratten (*Zucker rats*) unter Hyperglykämie eine erhöhte extrazelluläre H_2O_2 -Konzentration und Superoxid-Produktion durch die NOX nach. Induziert wurde die Hyperglykämie durch eine fünfständige Inkubation des isolierten Aorten-Gewebes der Ratten in Lösungen mit 44 mM Glucose, welches etwa dem sechsfachen einer normoglykämischen Glucose-Konzentration entspricht und den Blut-Glucose-Wert einer Hyperglykämie um das Vierfache überschreitet (Jacob et al., 2002; Robertson et al., 2003). Die extrazelluläre H_2O_2 -Konzentration wurde mittels Amplex Red Assay gemessen und die Superoxid-Produktion durch die NOX wurde mittels eines Lucigenin-abgeleiteten Chemilumineszenz Assays und der NOX-Inhibitoren DPI und Apocynin nachgewiesen. Ein erhöhter Proteingehalt der MPO in übergewichtigen diabetischen und nicht-diabetischen Ratten wurde mittels eines ELISA-Verfahrens ermittelt. Aus den Ergebnissen dieser Studie wurde interpretiert, dass die ansteigende extrazelluläre H_2O_2 -Konzentration aufgrund einer erhöhten Superoxid-Produktion durch die NOX unter Hyperglykämie zu dem Anstieg der MPO-Aktivität geführt haben muss und dass somit das MPO-produzierte HOCl eine wichtige Rolle bei diabetisch verursachten Schäden spielen muss (Zhang et al., 2004). Im humanen Modell unter physiologischen Glucose-Konzentrationen wurde diese Aussage bisher nicht bestätigt.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Messungen der extrazellulären H_2O_2 -Konzentration unter Hyperglykämie aus der Studie von Zhang et al. (2004) und dieser Arbeit deuten auf gewebespezifische Effekte der MPO hin.

Die Beteiligung enzymatischer Quellen wie die NOX3 oder die Mitochondrien am intrazellulären RONS-Signal konnten in dieser Arbeit in der humanen Zelllinie SH SY5Y bei einer langzeitigen Hyperglykämie ausgeschlossen werden. Denn der spezifische NOX3-Inhibitor Ebselen hatte keinen Effekt auf das intrazelluläre RONS-Signal und es gab keinen Unterschied im MitoSOX Red-Signal zwischen hyper- und normoglykämisch kultivierten Zellen. Die mitochondriale Superoxid-Produktion hängt mit der Rate der oxidativen Phosphorylierung zusammen (Li et al., 2013). Da keine Unterschiede im MitoATP oder GlykoATP mittels Seahorse ATP Rate Assay zwischen einer Hyper- und Normoglykämie festgestellt wurden, unterstützt dies die Ergebnisse der ROS-Messungen.

In dieser Arbeit konnte unter Hyperglykämie im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen durch die Inhibition der MPO mittels 4-ABHA ein erhöhter Beitrag von MPO-produziertem HOCl zum intrazellulären RONS-Signal nachgewiesen werden. Unterstützt wird die Annahme einer erhöhten MPO-Aktivität nach 24-stündiger Hyperglykämie durch die Messungen des extrazellulären H_2O_2 -Signals mittels Amplex Red Assay und der AQP1-Inhibition, welche Rückschlüsse auf die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration zulässt. Nach 24 h diffundierte unter Hyperglykämie weniger H_2O_2 von intra- nach extrazellulär als bei normoglykämisch kultivierten Zellen. Da H_2O_2 als Substrat für die MPO dient, kann auf eine intrazelluläre Umwandlung von H_2O_2 zu HOCl durch die MPO geschlossen werden, wodurch intrazellulär weniger H_2O_2 vorliegt und somit auch weniger H_2O_2 nach extrazellulär diffundieren könnte. Diese Ergebnisse lassen auf eine entgiftende Aufgabe der MPO gegen H_2O_2 schließen.

MPO-produziertes HOCl stellt kein Substrat für antioxidative Enzyme dar und sammelt sich daher in den Zellen zunehmend an. Aufgrund der hoch cytotoxischen Eigenschaften von MPO-produziertem HOCl könnte dieses über die Oxidation von Biomolekülen zu DNA-Schäden geführt haben, wodurch es auch zur Aktivierung von cytoplasmatische Endonukleasen gekommen sein könnte (Boon et al., 2024; Elmore, 2007; Hosseini et al., 2019). Da nach 48-stündiger Hyperglykämie eine Abnahme des MPO-Proteingehalts mittels ELISA festgestellt wurde, lässt dies auf einen Abbau des

Nukleus und damit der dort lokalisierten MPO durch cytoplasmatische Endonukleasen nach 48 h schließen.

Eine erhöhte Ansammlung von HOCl führt auch zu mitochondrialen Dysfunktionen und der Induktion apoptotischer Prozesse (Whiteman et al., 2005). Nach langzeitiger Hyperglykämie von 48 h konnte eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Masse pro Zelle im Vergleich zur Normoglykämie beobachtet werden. HOCl trägt zu dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der zellulären Respiration bei (Whiteman et al., 2005). Die Reduktion der Respiration könnte auch erklären, warum trotz eines erhöhten Glucose-Verbrauchs unter Hyperglykämie keine Zunahme des MitoATPs im Vergleich zur Normoglykämie zu beobachten war. Der erhöhte Abbau von Mitochondrien ist ein frühes Ereignis bei der Aktivierung apoptotischer Prozesse. Es kommt während der Fragmentierung der Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom c und der damit verbundenen Aktivierung von Caspasen, welche die Apoptose auslösen. Auch andere Komponenten des mitochondrialen Spaltungsmechanismus sind in die Entwicklung von apoptotischen Prozessen einbezogen (Shi, 2004; Suen et al., 2008). Da neben der Abnahme der mitochondrialen Masse nach 48-stündiger Hyperglykämie auch eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Normoglykämie zu beobachten war, lassen diese Ergebnisse auf die frühe Initiierung pro-apoptotischer Signalwege ab dem Zeitpunkt von 48 h unter Hyperglykämie schließen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine AMPK-abhängige Regulation der MPO schließen, jedoch konnte keine Änderung der AMPK-Aktivität bei langzeitiger Hyperglykämie im Vergleich zur Normoglykämie beobachtet werden, so dass die erhöhte MPO-Aktivität und der daraus resultierende Abbau der Mitochondrien und der MPO zum Zeitpunkt der Messung nicht durch die AMPK inhibiert wurden.

MPO-produziertes HOCl wirkt sich auch auf die Erregbarkeit von Zellen aus. HOCl inhibiert die Funktion von Calcium-ATPase-Pumpen, wodurch der Calcium-Transport aus den Zellen oder zurück in das ER verlangsamt wird (Favero et al., 1998). Eine 24-stündige Hyperglykämie führte jedoch zu einer signifikant schnelleren Repolarisation nach einem ACh-Stimulus im Vergleich zur Normoglykämie. Anhand der bisherigen Erkenntnisse der Literatur kann die Zunahme der Repolarisations-Geschwindigkeit unter Hyperglykämie nicht erklärt werden, so dass ein bisher unbekannter Mechanismus der schnelleren Repolarisation unter Hyperglykämie zugrunde liegen muss. Nach 48-stündiger Hyperglykämie ist das Maximum des ersten und zweiten

Peaks signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen Glucose-Konzentration. Aufgrund des Abbaus der MPO nach 48 h und der dadurch fehlenden Umwandlung von H_2O_2 , könnte die Abnahme der Maxima auf die Inhibition der ACh-Rezeptoren durch H_2O_2 zurückgeführt werden. Denn H_2O_2 schwächt die Amplitude von intrazellulärem Calcium in Abhängigkeit von Acetylcholin über muskarinische und nikotinische Rezeptoren (Palee et al., 2016). Durch das niedrige Maximum des ersten Peaks könnte dementsprechend auch die Repolarisation schneller erfolgt sein (Abb. 49).

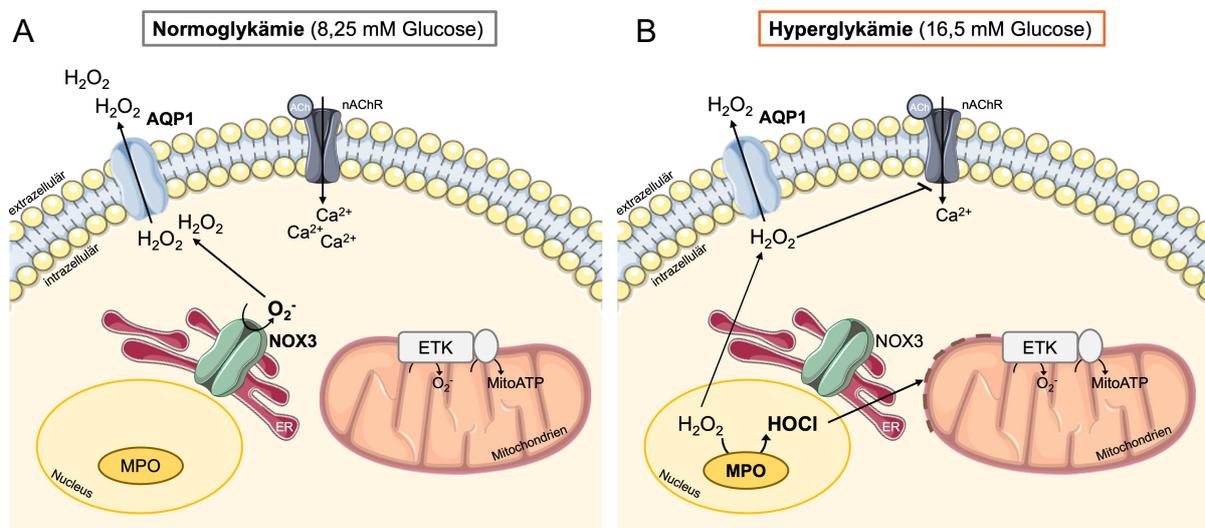


Abbildung 49 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ unter langzeitiger Hyperglykämie im Vergleich zur Normoglykämie.

Der Einfluss einer langzeitigen Hyperglykämie (B) auf das „RONS-Netzwerk“ unterscheidet sich deutlich von dem einer Normoglykämie (A). B: Unter 24-stündiger Hyperglykämie wird die MPO aktiviert, so dass H_2O_2 in HOCl umgewandelt wird, wodurch weniger H_2O_2 nach extrazellulär über AQP1 diffundiert. Die Ansammlung von HOCl führt zum Abbau der Mitochondrien. Nach 48 h kommt es zur Reduktion der MPO-Proteinmenge, so dass sich wieder mehr H_2O_2 in den Zellen ansammeln kann. Die Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die ansteigende intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration zur Abschwächung des ACh-induzierten Calcium-Signals unter Hyperglykämie beiträgt. A: Unter Normoglykämie hingegen leistet das NOX3-produzierte Superoxid einen Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal, welches in Form von H_2O_2 über die AQP1 nach extrazellulär gelangt (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Erkenntnisse aus der Literatur einer erhöhten MPO-Aktivität bei Hyperglykämie und die Annahme der Beteiligung des MPO-produzierten HOCl an frühen Mechanismen der Zell-Schädigung. Jedoch müssen im Menschen andere Wege als die NOX H_2O_2 als Substrat für die MPO unter Hyperglykämie liefern, da die Beteiligung der NOX3 mittels Ebselen in dieser Arbeit in den humanen Zelllinie SH SY5Y im Gegensatz zu der Studie von Zhang et al. (2004),

welche im Aorten-Gewebe von Ratten durchgeführt wurde, ausgeschlossen werden konnten. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sprechen erstmals für eine entgiftende Aufgabe der MPO gegen H_2O_2 im Menschen, um neuronale Funktionen wie die Erregbarkeit aufrecht zu erhalten.

Eine erhöhte MPO-Aktivität stellt somit einen frühen Indikator für Hyperglykämie bei falsch eingestellter Diabetes mellitus in neuronalen Zellen dar. Bei Befunden einer erhöhten Aktivität der MPO könnte rechtzeitig pathophysiologische Änderungen wie zum Beispiel der Dysregulation der Calcium-Homöostase, welche einen häufig zugrundeliegenden Mechanismus für den Zell-Verlust bei neurodegenerativen Erkrankungen darstellt (Calvo-Rodriguez et al., 2020), entgegengewirkt werden und das Risiko der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen bei chronischer Hyperglykämie verringert werden.

5.2 Hypoglykämie moduliert über die Aktivierung der NOX3 physiologische Funktionen

Hypoglykämie stellt bei der Einstellung einer Normoglykämie zur Behandlung von Diabetes mellitus ein weiteres Risiko für das Auftreten eines abnormalen Glucose-Metabolismus dar. In der Literatur wird dieses Szenario jedoch deutlich seltener als Ursache für das erhöhte Risiko der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen bei Diabetes-Patienten betrachtet als Hyperglykämie. Aber auch eine Hypoglykämie führte nachweislich zur Stimulation von Signalkaskaden in Neuronen, welche zu kognitiven Beeinträchtigungen und dem Absterben von Neuronen beitragen (Wang et al., 2020). Wenn das Szenario einer Hypoglykämie in der Literatur betrachtet wurde, dann einzeln, so dass ein Vergleich der zugrundeliegenden Mechanismen bei Hyper- und Hypoglykämie bisher nicht möglich war.

In dieser Arbeit konnte erstmals in der humanen neuronalen Zelllinie SH SY5Y gezeigt werden, dass sich der Einfluss einer Hypoglykämie deutlich von hyper- als auch normoglykämischen Bedingungen unterscheidet. Nach langzeitiger Hypoglykämie konnten eine ansteigende Aktivität und Expression der NOX3, eine zunehmende mitochondriale Superoxid-Produktion sowie eine deutlich erhöhte Abgabe von H_2O_2 nach extrazellulär beobachtet werden. Das Verhältnis des Energie-Sensors AMPK zur seiner aktiven Form pAMPK war nur nach einer 24-stündigen Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie signifikant erhöht. Zu diesem Zeitpunkt war die Glucose

im Medium vollständig aufgebraucht und es konnte unter Hypoglykämie eine Abnahme der mitochondrialen ATP-Produktion festgestellt werden. Nach 48-stündiger Hypoglykämie war zusätzlich eine signifikante Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Normoglykämie zu beobachten.

Einige wenige Studien, welche die Auswirkungen einer Hypoglykämie auf das „RONS-Netzwerk“ untersuchten, zeigten auch einen Anstieg der Superoxid-Produktion unter Hypoglykämie, jedoch meist nur nach kurzen Behandlungszeiten von 30 Minuten bis drei Stunden. Durchgeführt wurden diese Studien in Mäusen und den kortikalen Kulturen von Mäusen, gewonnen aus embryonischen Neuronen. Eine Hypoglykämie wurde in den Mäusen durch die Injektion von Insulin und in der Zellkultur durch Zugabe von Medium mit 2 mM Glucose induziert. Die Superoxid-Produktion wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DHE bestimmt. Es wurde auf die NOX als Quelle von Superoxid geschlossen, jedoch konnten die Mitochondrien als Quelle nicht ausgeschlossen werden. In diesen Studien konnte nach kurzzeitiger Hypoglykämie kein Zell-Verlust festgestellt werden (Amador-Alvarado et al., 2014; Suh et al., 2008). Weitere Studien wiesen hingegen die Beteiligung der Mitochondrien an der ROS-Produktion bei ein- bis zwei-stündiger Hypoglykämie (1-2 mM) durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in neugeborenen Schweinen und Rinder-Aorten-Endothelzellen nach (Kajihara et al., 2017; McGowan et al., 2006). McGowan et al. (2006) deutete diese Ergebnisse als Hinweis, dass mitochondriale ROS eine Rolle bei neuronalen Hirnschäden verursacht durch neonatale Hypoglykämie, spielen müssen. Einige der wenigen Langzeit-Studien über bis zu 48 h zeigen in den Zelllinien PC12 und SH SY5Y unter Hypoglykämie eine starke Abnahme der Zell-Viabilität in Abhängigkeit einer erhöhten Caspase-Aktivität und der Beteiligung von RONS an dem zugrundeliegenden Mechanismus. Dieser Mechanismus ging einher mit der Abnahme der zellulären ATP-Produktion, welche jedoch nachweislich nicht an der Induktion des Zell-Tods beteiligt war. Die intrazelluläre RONS-Produktion wurde, wie in dieser Arbeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA ermittelt, wobei die beteiligten RONS-Quellen nicht untersucht wurden (Lamichhane et al., 2017; Li et al., 2022).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits nach 24-stündiger Hypoglykämie die Glucose im Zellkultur-Medium der SH SY5Y Zellen vollständig aufgebraucht war, wodurch auch die Laktat-Abgabe in das Zellkultur-Medium stagnierte. Dadurch wurde

eine metabolische Umstellung der Zellen notwendig, die über den Energie-Sensor AMPK vermittelt wurde. Die Aktivierung der AMPK nach 24-stündiger Hypoglykämie wurde durch eine signifikante Zunahme des Verhältnisses der aktiven Form pAMPK zu seiner inaktiven Form AMPK im Vergleich zur Normoglykämie mittels ELISA bestätigt. Aktiviert wurde die AMPK nach 24-stündiger Hypoglykämie vermutlich durch das zunehmende zelluläre AMP/ ATP-Verhältnis, welches durch die signifikante Abnahme der mitochondrialen ATP-Produktion, gemessen mittels Seahorse ATP Rate Assay, verursacht wurde. Steigt das zelluläre AMP/ ATP-Verhältnis bindet AMP an eine Untereinheit der AMPK, welches aufgrund von konformationellen Änderungen zur Aktivierung der AMPK führt (Muraleedharan & Dasgupta, 2022). Um das Überleben der Zellen zu fördern, stimuliert die AMPK katabolische Stoffwechselwege wie die Glykolyse oder die Fettsäure-Oxidation (FAO) zur Gewinnung von ATP und reduziert anabolische Wege, welche ATP verbrauchen, wie die Transkription oder Proteinsynthese. Gegen eine Stimulation der Glykolyse spricht, dass keine Glucose mehr zur Verfügung stand und dass mittels Seahorse ATP Rate Assay nach 48-stündiger Hypoglykämie auch eine signifikante Abnahme des GlykoATPs im Vergleich zur Normoglykämie zu beobachten war. Für eine Stimulation der Fettsäure-Oxidation durch die AMPK nach 24 h unter Hypoglykämie spricht die Zunahme der mitochondrialen ATP-Produktion nach 48 h. Die mitochondriale Fettsäure-Oxidation produziert das Substrat Acetyl-CoA für den TCA-Zyklus und liefert somit etwa 4 Moleküle ATP über die mitochondriale OXPHOS (Tang et al., 2019). Des Weiteren wurde ein signifikanter Anstieg der mitochondrialen Superoxid-Produktion nach 48-stündiger Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie mittels des Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX Red gezeigt. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer erhöhten mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Dass die Rate der oxidativen Phosphorylierung mit der mitochondrialen Superoxid-Produktion zusammenhängt (Li et al., 2013), bestätigen auch die Ergebnisse der MitoSOX Red-Messungen nach 24 h. Neben der Reduktion der mitochondrialen ATP-Produktion lag auch das mitochondrial produzierte Superoxid bei Hypoglykämie unter dem von normoglykämisch kultivierten Zellen.

Die Ergebnisse der Messungen der extrazellulären H_2O_2 -Konzentration mittels Amplex Red Assay zeigen, dass nach 24 h unter Hypoglykämie signifikant mehr H_2O_2 nach extrazellulär diffundiert als unter Normoglykämie. Diese erhöhte Abgabe von H_2O_2 ist auf eine erhöhte intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration zurückzuführen, da die AQP1-

Inhibition die extrazelluläre H_2O_2 -Konzentration bei allen drei Szenarien auf die gleiche Konzentration herabsetzte. Da es keinen Unterschied in der NOX-vermittelten Superoxid-Produktion zwischen hypo- und normoglykämisch kultivierten Zellen zu diesem Zeitpunkt gab, muss eine andere Quelle für die erhöhte intrazelluläre H_2O_2 -Produktion unter Hypoglykämie verantwortlich sein. Eine weitere intrazelluläre Quelle von H_2O_2 stellen die metabolisch aktiven Peroxisome dar. In den Peroxisomen findet die Fettsäure-Oxidation statt, wobei H_2O_2 bei der Umwandlung von Trans-Enoyl-CoA zu Acetyl-CoA entsteht (Minard & McAlister-Henn, 1999). Kommt es also durch die AMPK zur Förderung der Fettsäure-Oxidation unter Hypoglykämie, würde sich dadurch mehr H_2O_2 in den Zellen ansammeln und dieses H_2O_2 aufgrund des Konzentrationsgradienten vermehrt nach extrazellulär diffundieren.

Nach 48-stündiger Hypoglykämie sank die Aktivität des Energiesensors AMPK unter Hypoglykämie. Das pAMPK/ AMPK-Verhältnis war zu diesem Zeitpunkt unter Hypoglykämie niedriger als bei normoglykämisch kultivierten Zellen. Nach 48 h konnte auch ein deutlich höherer Beitrag des NOX3-produzierten Superoxids zum intrazellulären RONS-Signal und eine signifikante Zunahme des NOX3-Proteingehalts unter Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie festgesellt werden. Auch der Effekt des AMPK-Inhibitors Compound C hatte nach 48 h im Vergleich zu 24 h bei hypoglykämisch kultivierten Zellen abgenommen. Die AMPK wirkt aktivierend auf die NO-Synthase (NOS) (Fioramonti et al., 2011) und NOS-produziertes NO wirkt wiederum inhibierend auf die NOX (Selemidis et al., 2007). Die Ergebnisse des AMPK-Inhibitors lassen darauf schließen, dass die hohe AMPK-Aktivität nach 24-stündiger Hypoglykämie die NOS und damit die NO-Produktion förderte, was sich wiederum inhibierend auf die NOX3-Aktivität auswirkte. Aufgrund der Abnahme der AMPK-Aktivität nach 48-stündiger Hypoglykämie könnte somit auch die NO-Produktion über die NOS abgenommen haben, welches durch den reduzierten Effekt des AMPK-Inhibitors auf das intrazelluläre RONS-Signal bestätigt wird. Dadurch wird die inhibierende Wirkung von NO auf die NOX3 nach 48 h reduziert und die Aktivität der NOX3 nimmt wieder zu. Dies lässt den Schluss auf eine AMPK-NOS-abhängige Regulation der NOX3 unter Hypoglykämie zu (Abb. 50).

Es stellt sich jedoch die Frage, wie es zur Aktivierung der NOX3-Aktivität unter langzeitiger Hypoglykämie kam. Die Aktivität von NADPH-Oxidasen wie der NOX3 kann über die Phosphorylierungen durch Kinasen, wie der Protein-Kinase C (PKC), gesteigert werden (Vermot et al., 2021). Da bereits eine Aktivierung der PKC unter

dem Entzug von Glucose in anderen Studien festgestellt werden konnte (Surendran, 2019), könnte auch hier unter langzeitiger Hypoglykämie auf die Aktivierung der NOX3 durch die PKC vermittelt worden sein.

Zusätzlich wurde nach 48 h unter Hypoglykämie eine signifikante Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Normoglykämie festgestellt. Da NOX3-produziertes Superoxid als Signalmolekül unter anderem pro-apoptische Prozesse fördern kann, könnte aufgrund der Ergebnisse auf die NOX3-vermittelte Aktivierung pro-apoptischer Mechanismen geschlossen werden. Dies würde bisherige Hinweise über die Auswirkung einer langzeitigen Hypoglykämie auf das Zell-Überleben und die Beteiligung von ROS bestätigen (Lamichhane et al., 2017; Li et al., 2022). Die Ergebnisse weisen erstmals auf die tragende Rolle der NOX3 bei diesem Mechanismus hin. Es wird angenommen, dass die NOX3 die Apoptose über die Aktivierung des MAPK/ ERK-Signalwegs fördert (Lamichhane et al., 2017; Wen et al., 2019).

Eine erhöhte Superoxid-Produktion über die NOX3 unter Hypoglykämie kann sich noch auf andere zelluläre Systeme wie die Calcium-Homöostase auswirken. Unter Hypoglykämie konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Produktion von ROS und einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration festgestellt werden. Bei diesem Prozess, welcher mit der Entstehung von neuronalen Schäden korreliert, wurde eine Calcium-abhängige Aktivierung der ROS-Produktion als Ursache angenommen (Hernández-Fonseca et al., 2008; Páramo et al., 2010).

Umgekehrt können sich auch ROS durch die Modulation der Aktivität von Calcium-Kanälen und -Pumpen wie der PMCA über oxidative Modifikationen von Cystein-Resten auf die Calcium-Homöostase auswirken (Krishnaswamy & Cooper, 2012; Zaidi, 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine verlangsamte Repolarisation, ein erhöhtes Calcium-Signal nach der zweiten ACh-Stimulation und die signifikante Abnahme reagierender Zellen beim zweiten Peak-Maximum unter Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte Superoxid-Produktion durch NOX3 zu einer Reduktion der Aktivität der PMCA über oxidative Modifikationen führte. Dadurch würde die Kopplung zwischen ATP-Bindung und -Hydrolyse der PMCA gestört, wodurch intrazelluläres Calcium langsamer nach extrazellulär transportiert würde. Hinzukommt, dass den SH SY5Y Zellen unter Hypoglykämie mit zunehmender Behandlungsdauer weniger GlykoATP zur Verfügung stand, welches von den PMCA für den Calcium-Transport aus den Zellen benötigt wird

(James et al., 2013). Bleibt also das intrazelluläre Calcium-Signal aufgrund der verlangsamten Repolarisation hoch, führt dies zu einer Verlängerung des Calcium-Signals, was sich auf die Erregbarkeit der Zellen auswirkt (Nikoletopoulou & Tavernarakis, 2012). Dies könnte die signifikant verringerte Anzahl reagierender Zellen und das weiterhin signifikant erhöhte intrazelluläre Calcium-Signal der reagierenden Zellen nach der zweiten ACh-Stimulation erklären. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich auf eine ROS-induzierte Dysregulation der Calcium-Homöostase unter langzeitiger Hypoglykämie in den humanen neuronalen SH SY5Y Zellen schließen.

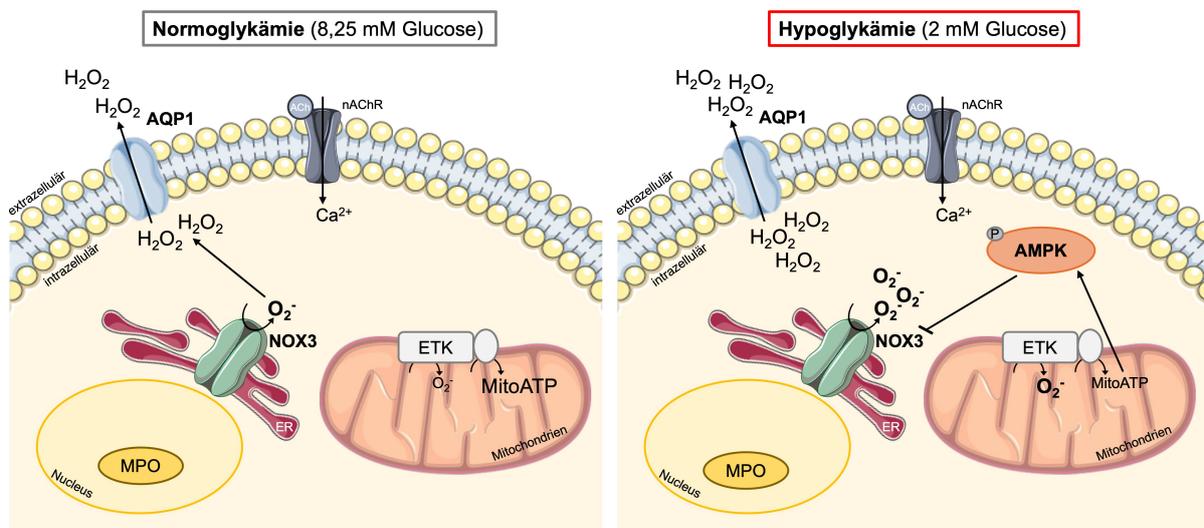


Abbildung 50 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ unter langzeitiger Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie.

Der Einfluss einer langzeitigen Hypoglykämie (**B**) auf das „RONS-Netzwerk“ unterscheidet sich deutlich von dem der Normoglykämie (**A**). **B**: Unter Hypoglykämie aktiviert vermutlich die Abnahme des MitoATPs nach 24 h die AMPK, was sich vermutlich inhibierend auf die Superoxid-Produktion über NOX3 auswirkt. Nach 48 h nahm die AMPK-Aktivität ab und es konnte ein Anstieg der Superoxid-Produktion über die NOX3 beobachtet werden. Nach 24 h wurde vermehrt H₂O₂ nach extrazellulär abgegeben. **A**: Unter Normoglykämie leistet das NOX3-produzierte Superoxid einen geringeren Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal und wurde über die AQP1 nach extrazellulär abgegeben (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Diese Ergebnisse zeigen somit erstmals, dass sich der Einfluss einer Hypoglykämie auf das „RONS-Netzwerk“ deutlich von den anderen Szenarien der Glucose-Verfügbarkeit unterscheidet und das NOX3-produzierte Superoxid eine wichtige Rolle bei dem zugrundeliegenden Mechanismus unter langzeitiger Hypoglykämie spielt. Die Ergebnisse deuten auf die Modulation pro-apoptotischer Signalwege und der Calcium-Homöostase durch das NOX3-produzierte Superoxid hin. Damit widerlegt diese Arbeit die Annahme vieler Studien, dass NOX3 bei der Ursachen-Untersuchung für das erhöhte Risiko für neurodegenerative Erkrankungen bei Diabetes mellitus außen

vorgelassen werden kann. Wie Herb (2024) zusammenfasste und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sollten NOX3 somit nicht völlig aus der neuronalen Forschung ausgeschlossen werden, sondern bieten ein neues Ziel für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten, um neuronale Dysfunktionen bei chronischer Hypoglykämie zu reduzieren.

5.2.1 Kurzzeitiger Glucose-Entzug wirkt sich auf die AMPK-Aktivität und die Calcium-Homöostase aus

Der Entzug von Glucose und Sauerstoff wird in Zellkultur-Modellen verwendet, um die Auswirkungen eines ischämischen Schlaganfalls zu untersuchen (Wang et al., 2018). Desweiteren wird der Glucose-Entzug häufig als Modell zur Nachahmung von hypoglykämischen Bedingungen, wie sie als Komplikation bei der Behandlung von Diabetes mellitus auftreten können, eingesetzt (Amador-Alvarado et al., 2014). In diesen Studien wurde auf eine Beteiligung von RONS, produziert durch die NADPH-Oxidase oder in den Mitochondrien, bei der Regulation physiologischer Prozesse, wie der Calcium-Homöostase, unter kurzzeitigem Glucose-Entzug und damit unter Hypoglykämie in neuronalen Primär-Zellen geschlossen. Diese Annahmen beruhen auf dem signifikanten Effekt des NOX-Inhibitors Ebselen auf das ROS-Signal gemessen mittels H₂DCFDA, welche auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden, und der Effekte von Inhibitoren der mitochondrialen Respiration auf die Superoxid-Produktion gemessen mittels DHE nach dem Entzug von Glucose von bis zu vier Stunden (Isaev et al., 2008; Páramo et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass keine der getesteten Komponenten des „RONS-Netzwerks“ nach einem kurzzeitigen Glucose-Entzug eine spezifische Rolle spielen. Im Vergleich zur Normoglykämie war nach einem kurzzeitigen Glucose-Entzug jedoch eine signifikant erhöhte Aktivität der AMPK, ermittelt an dem pAMPK/AMPK-Verhältnis mittels ELISA, und ein signifikant verringertes Calcium-Signal, eine verlangsamte Repolarisation und die Reduktion reagierender Zellen nach der zweiten ACh-Stimulation zu beobachten. In dieser Arbeit konnte somit die Beteiligung von RONS an der Modulation der Calcium-Homöostase ausgeschlossen werden. Die Aktivierung der AMPK und die Unterschiede im Calcium-Signal nach kurzzeitigem Glucose-Entzug sind daher sehr wahrscheinlich auf RONS-unabhängige Mechanismen zurückzuführen (Abb. 51).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die AMPK unabhängig vom zellulären AMP/ ATP-Verhältnis in der Lage ist die Verfügbarkeit von Glucose zu erkennen. Dieser von Adenin-Nukleotid-Änderungen-unabhängige Aktivierungsmechanismus der AMPK basiert auf der Anwesenheit des glykolytischen Zwischenprodukts Fructose-1,6-biphosphat (FBP). Wird dieses Zwischenprodukt bei Glucose-Entzug nicht mehr produziert, kommt es zur Bildung eines AMPK-Aktivierungskomplex, welcher aus mehreren Enzymen besteht, die zu einer erhöhten Thr172-Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der AMPK beitragen. Dieser Mechanismus bereitet die AMPK auch auf weitere Aktivierung durch Adenin-Nukleotid-abhängige Mechanismen vor, falls sich der Energiestatus der Zelle verschlechtern sollte (Lin & Hardie, 2018). Für diesen Aktivierungsmechanismus der AMPK spricht, dass in dieser Arbeit nach einem kurzen Glucose-Entzug von 30 min im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen keine Änderungen in der zellulären ATP-Produktion festgestellt werden konnte. Da Komponenten des „RONS-Netzwerks“ ausgeschlossen wurden, muss ein anderer Mechanismus für die Änderungen im Calcium-Signal nach einem kurzzeitigen Glucose-Entzug verantwortlich sein. Der einzige weitere Unterschied zwischen einem kurzen Glucose-Entzug und einer Normoglykämie war das erhöhte pAMPK/ AMPK-Verhältnis. Es ist bekannt, dass die AMPK Calcium-Kanäle wie die L-Typ VGCCs inhibiert (Huang et al., 2015). Die ACh-Stimulation nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren induziert die Depolarisation der Membran, welche wiederum L-Typ VGCCs aktiviert, die für den Großteil des intrazellulären Calcium-Anstiegs verantwortlich sind (Letz et al., 1997). Kommt es also bei einem 30-minütigem Glucose-Entzug zur Aktivierung der AMPK und damit zur Inhibition von L-Typ VGCCs könnte dies das signifikant verminderte Calcium-Signal erklären.

Bei einem kurzzeitigen Glucose-Entzug müsste die Repolarisation der Zellen nach einer ACh-Stimulation gleich schnell erfolgen wie die Repolarisation normoglykämisch kultivierten Zellen, da eine Inhibition der PMCA oder SERCA durch RONS ausgeschlossen wurde und auch kein Unterschied in ATP-Produktion im Vergleich zur Normoglykämie festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse der Messungen des ACh-induzierten intrazellulären Calcium-Signals zeigen jedoch eine verlangsamte Repolarisation nach der ersten ACh-Stimulation nach kurzem Glucose-Entzug im Vergleich zur Normoglykämie. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Reduktion der Repolarisation ist jedoch unklar.

Die verlangsamte Repolarisation führt zu einer Verlängerung des intrazellulären Calcium-Signals, was sich auf die Erregbarkeit der Zellen auswirkt (Nikoletopoulou & Tavernarakis, 2012), welches die signifikant verringerte Anzahl reagierender Zellen nach der zweiten ACh-Stimulation bei Glucose-Entzug erklären würde.

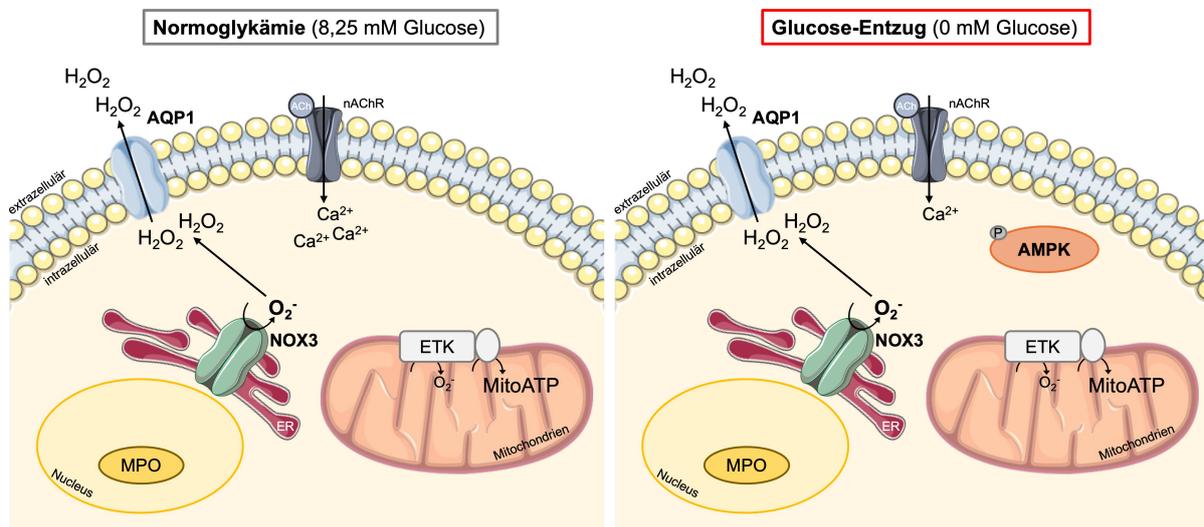


Abbildung 51 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ nach kurzzeitigem Glucose-Entzug im Vergleich zur Normoglykämie.

Der Einfluss eines kurzzeitigen Glucose-Entzugs (B) auf das „RONS-Netzwerk“ unterschied sich nicht von dem einer Normoglykämie (A). B: Nur nach einem kurzzeitigen Glucose-Entzug konnte die erhöhte Aktivierung der AMPK beobachtet werden (eigene Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint und smart.servier.com).

Damit wurde in dieser Arbeit erstmals ein Vergleich der Szenarien einer Hypoglykämie und dem Entzug von Glucose dargestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass den Szenarien einer langzeitigen Hypoglykämie und dem kurzzeitigen Entzug von Glucose unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, welche sich verschieden auf physiologische Prozesse, wie die Calcium-Homöostase auswirken. Dies sollte in Zukunft bei der Verwendung eines Glucose-Entzugs als Modell zur Nachahmung von hypoglykämischen Bedingungen beachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Hypothesen über den zugrundeliegenden Mechanismus eines kurzzeitigen Glucose-Entzugs, wie er bei einem ischämischen Schlaganfall auftritt. Diese Hypothesen müssen in Zukunft durch gezielte Experimente an Gewebe- und Tiermodellen bestätigt werden.

5.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen erstmals die Erkenntnisse aus der Literatur, dass eine erhöhte MPO-Aktivität bei Hyperglykämie vorliegt und dass MPO-produziertes HOCl an frühen Mechanismen der Zell-Schädigung in einer humanen neuronalen Zelllinie beteiligt ist. Da eine erhöhte Ansammlung von H_2O_2 durch eine erhöhte Superoxid-Produktion durch die NOX3 oder Mitochondrien ausgeschlossen werden konnte, ist der Mechanismus, welcher zum Anstieg der MPO-Aktivität unter langzeitiger Hyperglykämie führte, noch unklar. Da sowohl Transkriptions- und Reifungsprozesse sowie Calcium-bindende Domänen an der Funktion und Aktivität der MPO beteiligt sind (Khan et al., 2018), sollten diese Prozesse bei langzeitiger Hyperglykämie in Zukunft näher betrachtet werden, um den Aktivierungsmechanismus der MPO unter Hyperglykämie identifizieren zu können.

Unter langzeitiger Hyperglykämie deuteten die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Beteiligung von MPO-produziertem HOCl an der mitochondrialen Fragmentierung hin. Um dies weiter zu untersuchen könnten die mitochondriale Masse nach langzeitiger Hyperglykämie und der irreversiblen Inhibition der MPO mittels 4-ABHA betrachtet werden.

Da in dieser Arbeit auch erstmals nach einer langzeitigen Hypoglykämie ein Zusammenhang zwischen RONS, den identifizierten RONS-Quellen und Calcium hergestellt werden konnte, sollte dies in Zukunft weiter untersucht werden. Aufgrund des nachgewiesenen Anstiegs des NOX3-produzierten Superoxids und der Verlangsamung der Repolarisation unter langzeitiger Hypoglykämie lässt dies den Rückschluss einer NOX3- O_2^- -vermittelten Inhibition von Calcium-ATPase-Pumpen wie der PMCA zu. Um diese Annahme zu bestätigen, sollten Messungen des ACh-induzierten intrazellulären Calcium-Signals nach der Inhibition der NOX3 mittels Ebselen durchgeführt werden.

Als Aktivierungsmechanismus der NOX3 unter Hypoglykämie wurde in dieser Arbeit auf die PKC geschlossen. Um diese Annahme zu bestätigen, könnte durch den Einsatz eines PKC-Inhibitors, wie Gö6983, vor der Messung des intrazellulären RONS-Signals zum Beispiel mittels des Fluoreszenzfarbstoffes H_2DCFDA die Beteiligung der PKC bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen wiederum darauf schließen, dass die Aktivität der NOX3 durch eine AMPK-NO-vermittelte Inhibition der NOX3 unter Hypoglykämie reguliert wird, wodurch ein früher Zell-Verlust verhindert werden könnte. Die

Beteiligung der AMPK am intrazellulären RONS-Signal unter Hypoglykämie konnte in dieser Arbeit bereits mittels Inhibitor bestätigt werden. Da jedoch der NOS-Inhibitor L-NAME und der NO-Scavenger cPTIO zu Messartefakten des Fluoreszenzfarbstoffes H₂DCFDA führten, müsste die Beteiligung des NOS-produzierten NOs unter Hypoglykämie mittels anderer Fluoreszenzfarbstoffe wie DAF-FM, einem spezifischen NO-Indikator, ermittelt werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Beteiligung des MPO-produzierten HOCl_s unter Hyperglykämie und des NOX3-produzierten Superoxids unter Hypoglykämie an der Aktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen angenommen. Um den genauen Signalweg zu identifizieren, welcher durch die RONS aktiviert wurde und zur Apoptose beitrug, könnte der Einsatz von Inhibitoren gewählt werden. Da in dieser Arbeit die Hypothese eines Cytochrom c-Caspase-vermittelten Signalwegs aufgestellt wurde, könnten die Auswirkungen von Inhibitoren der Caspase oder Cytochrom c verwendet werden, um zu untersuchen, ob eine Inhibition dieser Enzyme das Absterben von Zellen verhindern könnte.

Die vorangegangenen Vorschläge für zukünftige Experimente würden zu einer Identifizierung des genauen Signalwegs von der Aktivierung der RONS-Quellen bis hin zu den funktionellen Effekten der RONS beitragen, welches zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Prozesse unter Hypo- und Hyperglykämie bei Diabetes mellitus führen würde. Dies würde mögliche Therapieansätze gegen das Neuronen-Sterben bei chronischer falsch eingestellter Diabetes mellitus aufzeigen und so auch das Risiko für Neurodegeneration minimieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit gewährten erstmals einen Einblick in die Auswirkungen verschiedener Szenarien wie Hypo- und Hyperglykämie auf den Verbrauch von Energieträgern und den Energie-Metabolismus der als Modell für neurodegenerative Erkrankungen verwendeten SH SY5Y Zelllinie. Dabei zeigte sich ein eher anaeroben Energiephänotyp der SH SY5Y Zellen, so dass die verbrauchte Glucose hauptsächlich über die Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert wurde und dann als Laktat von den Zellen abgegeben wurde. Aufgrund des Glucose-Defizits nach einer langzeitigen Hypoglykämie und der Aktivierung der AMPK wurde auf die AMPK-abhängige Initiierung alternativer Energiegewinnungswege, wie die Fettsäure-Oxidation, geschlossen, um eine metabolische Umstellung der Zellen zu gewährleisten. Um diese Hypothesen zu testen könnten in Zukunft die Aktivität der Fettsäure-Oxidation durch das Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test Kit für die Oxidation für langkettige

Fettsäuren über Inhibitoren, wie den in der Literatur oft verwendeten Inhibitor GSK2837808A, unter Hypoglykämie verwendet werden. Dies würde weitere Klarheit schaffen, um die Effekte von abnormalen Glucose-Metabolismus im Modell der SH SY5Y Zellen besser auf die physiologischen Bedingungen in Geweben zu übertragen.

6. Zusammenfassung

Veränderungen in der Glucose-Verfügbarkeit, durch langzeitige Hypo- oder Hyperglykämie oder kurzen Glucose-Entzug erhöhen das Risiko für neurodegenerative Erkrankungen. Diese Szenarien haben die Beteiligung von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (RONS) an ihrer Pathophysiologie gemeinsam. Der zugrundeliegende Mechanismus und die daran beteiligten RONS-Quellen sind weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit konnte erstmals in einem Modell, der humanen neuronalen SH SY5Y Zelllinie, gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Glucose-Verfügbarkeit unterschiedliche Änderungen im „RONS-Netzwerk“ stattfinden. Dabei unterschied sich der Einfluss eines kurzzeitigen Glucose-Entzug nicht von dem einer Normoglykämie. Bei langzeitiger Hyperglykämie leistete MPO-produziertes HOCl einen entscheidenden Beitrag zum intrazellulären RONS-Signal. Unter Hypoglykämie hingegen nahm die Superoxid-Produktion über die Mitochondrien und die NOX3 mit zunehmender Behandlungsdauer deutlich zu. Auch die Erregbarkeit und das Transmitter-induzierte intrazelluläre Calcium-Signal der Zellen änderte sich in Abhängigkeit der Glucose-Verfügbarkeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten neue Therapieziele, um neurodegenerative Prozesse aufgrund einer veränderten Glucose-Verfügbarkeit zu verlangsamen.

7. Summary

Changes in glucose availability, due to long-term hypoglycemia or hyperglycemia or short-term glucose deprivation, increase the risk of neurodegenerative diseases. All these scenarios have the involvement of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in their pathophysiology in common. The underlying mechanism and the sources of RONS involved are still largely unknown.

In this study, for the first time it was shown in one model, the human neuronal SH SY5Y cell line, that different changes in the “RONS network” occur depending on glucose availability. The influence of short-term glucose deprivation did not differ from that of normoglycemia. During long-term hyperglycemia, MPO-produced HOCl contributed significantly to intracellular RONS signaling. In contrast, under hypoglycemia, superoxide production via the mitochondria and NOX3 increased significantly with increasing treatment duration. Also, the excitability and the transmitter-induced intracellular calcium signal of the cells differed depending on the availability of glucose. The results of this study offer new therapeutic targets to inhibit neurodegenerative processes due to altered glucose availability.

8. Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnisse

Abbildung 1 Transport von Nährstoffen über die Blut-Hirn-Schranke.	9
Abbildung 2 Glucose metabolisierende Wege in Neuronen.	11
Abbildung 3 Bildung Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies.	15
Abbildung 4 ROS-Produktion in Mitochondrien.	17
Abbildung 5 Struktur der Kern-Untereinheiten der NOX.	19
Abbildung 6 Aktivierungsmechanismus der NOX2.	20
Abbildung 7 Regulatorische Untereinheiten der NOX-Isoformen.	21
Abbildung 8 Glucose-Metabolismus und ROS-bildende Wege.	24
Abbildung 9 Beispiel zur Berechnung der Proteinmenge im Zell-Lysat.	43
Abbildung 10 Schema eines indirekten ELISAs.	46
Abbildung 11 Allgemeiner Versuchsablauf des indirekten ELISAs.	47
Abbildung 12 Belegungsschema zur Bestimmung der Proteinmenge der AMPK und pAMPK mittels ELISA.	48
Abbildung 13 Beispiel einer 12-Well Silikonkammer.	49
Abbildung 14 Allgemeiner Versuchsablauf einer immunohistologischen Färbung.	51
Abbildung 15 Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 AM.	54
Abbildung 16 Aufbau des Messsystems für das relative Calcium-Signal.	55
Abbildung 17 Allgemeiner Versuchsablauf der Messung des relativen Calcium- Signals.	56
Abbildung 18 Einzel, nacheinander durchgeführten Schritte bei der Auswertung der Filmsequenzen der Messung des relativen Calcium-Signals in ImageJ.	57
Abbildung 19 Exemplarischer Reaktionsverlauf einer reagierenden SH SY5Y Zelle.	59
Abbildung 20 Beispiel einer nicht-reagierenden und einer reagierenden SH SY5Y Zelle.	60
Abbildung 21 Prinzip des Nachweises von Energieträgern im Medium-Überstand mittels Amplex Red Assay.	61
Abbildung 22 Allgemeiner Versuchsablauf der Verbrauchsmessung der Energieträger mittels Amplex Red.	62

Abbildung 23 Beispiel zur Berechnung der Glucose-Konzentration im Medium-Überstand.	63
Abbildung 24 Konversion von H₂DCFDA.	67
Abbildung 25 Allgemeiner Versuchsaufbau der H₂DCFDA-Messung.	69
Abbildung 26 Allgemeiner Versuchsablauf der MitoSOX Red-Messung	71
Abbildung 27 Konversion von Amplex Red.	72
Abbildung 28 Allgemeiner Versuchsablauf der Amplex Red-Messungen.	73
Abbildung 29 Proteinnachweis der NADPH-Oxidasen in den SH SY5Y Zellen. ..	78
Abbildung 30 Subzelluläre Lokalisation der NOX2, NOX3 und NOX5 in den SH SY5Y Zellen.	81
Abbildung 31 Subzelluläre Lokalisation der Myeloperoxidase (MPO) in den SH SY5Y Zellen.	83
Abbildung 32 Subzelluläre Lokalisation der Superoxid-Dismutase 3 (SOD3) in den SH SY5Y Zellen.	85
Abbildung 33 Subzelluläre Lokalisation der NOX2, NOX3 und NOX5, der MPO und der SOD3 in den SH SY5Y Zellen.	86
Abbildung 34 Glucose-, Laktat-, Pyruvat- und L-Glutamin-Konzentration im Medium-Überstand der SH SY5Y Zellen nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose über 48 h.	89
Abbildung 35 Aerobe und anaerobe ATP-Produktion nach 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.	93
Abbildung 36 Mitochondriale O₂⁻-Konzentration nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.	97
Abbildung 37 Schema der Aktivierung und Ziele der (p)AMPK.	98
Abbildung 38 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und der Inhibition der AMPK.	101
Abbildung 39 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und dem Wegfangen von Superoxid.	104
Abbildung 40 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und Inhibition der NOX3.	106
Abbildung 41 Intrazelluläres RONS-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und der Inhibition der MPO.	109
Abbildung 42 Extrazelluläres H₂O₂-Signal nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie und Inhibition der AQP1.	113

Abbildung 43 Aerobe und anaerobe ATP-Produktion nach kurzzeitigem Glucose-Entzug.	117
Abbildung 44 Intrazelluläres RONS-Signal nach 30-minütigen Glucose-Entzug und dem Wegfangen von Superoxid.....	121
Abbildung 45 Intrazelluläres RONS-Signal nach 30-minütigen Glucose-Entzug und der Inhibition der NOX3.	122
Abbildung 46 Einfluss von 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie auf das Acetylcholin-induzierte Calcium-Signal.	126
Abbildung 47 Einfluss von 30-minütigem Glucose-Entzug auf das Acetylcholin-induzierte Calcium-Signal.	128
Abbildung 48 Schematische Darstellung des Einflusses der Glucose-Verfügbarkeit auf die RONS-Produktion der SH SY5Y Zellen.....	130
Abbildung 49 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ unter langzeitiger Hyperglykämie im Vergleich zur Normoglykämie.....	134
Abbildung 50 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ unter langzeitiger Hypoglykämie im Vergleich zur Normoglykämie.	140
Abbildung 51 Hypothetisches Modell des „RONS-Netzwerks“ nach kurzzeitigem Glucose-Entzug im Vergleich zur Normoglykämie.	143
Abbildung 52 ImageJ-Macro zur Ermittlung der Zellflächen.	176
Abbildung 53 Beispiele der Standardreihen zur Berechnung der Energieträger-Konzentration im Medium-Überstand.	177
Abbildung 54 Exemplarischer Verlauf der Steigung des Resorufin-Signals bei der Messung der Energieträger mittels Amplex Red.....	178
Abbildung 55 Exemplarischer Verlauf der Steigung des DCF-Signals.....	183
Abbildung 56 Exemplarischer Verlauf der Steigung des MitoSOX Red-Signals.	184
Abbildung 57 Exemplarischer Verlauf der Steigung des Resorufin-Signals. ..	184

8.2 Tabellenverzeichnisse

Tabelle 1 Verbrauchsraten von Glucose, Pyruvat, L-Glutamin und die Produktionsrate von Laktat der SH SY5Y Zellen.	90
Tabelle 2 Mitochondriale Masse pro SH SY5Y Zelle nach 24- oder 48-stündiger Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose.	96
Tabelle 3 Relatives Verhältnis der pAMPK zur AMPK nach 24- oder 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.	99
Tabelle 4 Zusammenfassung des Einflusses der AMPK-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal unter 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.	102
Tabelle 5 Zusammenfassung des Einflusses der NOX3-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.	107
Tabelle 6 Quantifizierung des relativen NOX3-Proteingehalts nach einer 24- oder 48-stündigen Hypo- Normo- und Hyperglykämie.	108
Tabelle 7 Zusammenfassung des Einflusses der MPO-Inhibition auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.	110
Tabelle 8 Quantifizierung des relativen MPO-Proteingehalts nach einer 24- oder 48-stündigen Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.	111
Tabelle 9 Relativer Proteingehalt der NOX5 nach 24- und 48-stündiger Hypo-, Normo- und Hyperglykämie.	114
Tabelle 10 Zusammenfassung des Beitrags RONS-produzierender Quellen zum intrazelluläre RONS-Signal nach 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.	115
Tabelle 11 Relatives Verhältnis der pAMPK zur AMPK nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.	118
Tabelle 12 Einfluss von Compound C auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.	119
Tabelle 13 Einfluss von 4-ABHA auf das intrazelluläre RONS-Signal nach 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.	120
Tabelle 14 Einfluss des Glucose-Entzugs auf das extrazelluläre H ₂ O ₂ -Signal.	123
Tabelle 15 Einfluss von Hypo- und Hyperglykämie auf die Anzahl reagierender Zellen nach 24 und 48 h.	125

Tabelle 16 Einfluss von kurzzeitigen Glucose-Entzug auf die Anzahl reagierender Zellen.	127
Tabelle 17 Mittlere Zellzahl nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.	176
Tabelle 18 Mittlere Zellzahl nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.	176
Tabelle 19 Mittlere Konzentration der Energieträger im Medium von Zell-freien Wells.	179
Tabelle 20 Durchschnittliche Länge mitochondrialer Strukturen pro SH SY5Y Zelle.	180
Tabelle 21 Quantifizierung der NOX-Isoformen mittels ELISA.	181
Tabelle 22 Quantifizierung der Myeloperoxidase mittels ELISA.	182
Tabelle 23 Quantifizierung der Superoxid-Dismutase 3 mittels ELISA.	183
Tabelle 24 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels H₂DCFDA.	185
Tabelle 25 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels MitoSOX Red.	186
Tabelle 26 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels Amplex Red.	186
Tabelle 27 Verhältnis des Resorufin-Signals der SH SY5Y Zellen zum Hintergrund-Signal.	186
Tabelle 28 Einfluss von Bacopaside II auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells.	187
Tabelle 29 Einfluss von DDC und ML090 auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells.	188
Tabelle 30 Einfluss der Behandlungsdauer auf das MitoSOX Red-Signal.	189
Tabelle 31 Einfluss der Behandlungsdauer auf das DCF-Signal.	189
Tabelle 32 Einfluss der Behandlungsdauer auf das Resorufin-Signal.	190
Tabelle 33 Einfluss von cPTIO und L-NAME auf das DCF-Signal Zell-freier Wells.	190
Tabelle 34 Relativer Proteingehalt der SOD3 nach der Behandlung mit 2, 8,25 und 16,5 mM Glucose für 24 und 48 h.	191
Tabelle 35 Effekt eines Glucose-Entzugs in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer auf das intrazelluläre RONS-Signal.	191

Tabelle 36 Einfluss des Glucose-Entzugs auf die mitochondriale Superoxid-Produktion.192

8.3 Abkürzungsverzeichnis

4-ABHA	3-Amino-4-hydroxybenzolsäure
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
nAChR	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
pAMPK	Phosphorylierte AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AQP	Aquaporine
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,,4,5,5- tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DDC	Potassiumsalz Natriumdiethyl-Dithiocarbamattrihydrat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUOX	Duale Oxidase
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETK	Elektronen-Transport-Kette
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBP	Fructose-1,6-biphosphat
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
F6P	Fructose-6-Phosphat

GLUT	Glucose-Transporter
Glutaminase	GLS
GlykoATP	Glykolytisches ATP
G3P	Glyceraldehyd-3-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
h	Stunde
HK	Hexokinase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ DCFDA	2,7-Dichlorodihydrofluorescein
HOCl	Hypochlorsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IHC	Immunohistologische Färbung
KD	<i>Knockdown</i>
L-NAME	<i>N</i> _ω -Nitro-L-Arginine-Methylester- hydrochlorid
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MitoATP	Mitochondriales ATP
min	Minute
mM	Milimolar
μM	Micromolar
MPO	Myeloperoxidase
mtROS	Mitochondrial produzierte ROS
MW	Mittelwert
NAD ⁺	Oxidiertere Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffoxid
NOS	Stickstoffoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
NOX2	gp91 ^{phox}
NPP	Nitrophenyl-Phosphat
ns	Nicht signifikant
O ₂ ⁻	Superoxid

OH ⁻	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PB	Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PGC	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-Gamma-Coaktivator
PKC	Protein-Kinase C
PMCA	Plasmamembran-Calcium-ATPase
Poldip2	<i>Polymerase-δ Interacting Protein 2</i>
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
P/S	Penicillin-Streptomycin
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RONs	Reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
R5P	Ribulose-5-Phosphat
sec	Sekunden
SDS	Natriumodecylsulfat
SERCA	<i>Sarcoplasmic/ Endoplasmatic reticulum Calcium ATPase</i>
SLC	<i>Solute Carrier Proteins</i>
Standardabw.	Standardabweichung
SOD	Superoxid-Dismutase
TMD	Transmembrandomäne
UdS	Universität des Saarlandes
UE	Untereinheit
ü.N.	Über Nacht
VGCC	Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle
WB	Western Blot
XO	Xanthin-Oxidase
ZChL	Zentrales Chemikalienlager

8.4 Literaturverzeichnis

- Abi-Saab, W. M., Maggs, D. G., Jones, T., Jacob, R., Srihari, V., Thompson, J., Kerr, D., Leone, P., Krystal, J. H., Spencer, D. D., During, M. J., & Sherwin, R. S. (2002). Striking Differences in Glucose and Lactate Levels between Brain Extracellular Fluid and Plasma in Conscious Human Subjects: Effects of Hyperglycemia and Hypoglycemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(3), 271–279. <https://doi.org/10.1097/00004647-200203000-00004>
- Abu-Soud, H. M., & Hazen, S. L. (2000). Nitric Oxide Modulates the Catalytic Activity of Myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5425–5430. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5425>
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(9), 1342–1353. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027>
- Ahsan, A., Liu, M., Zheng, Y., Yan, W., Pan, L., Li, Y., Ma, S., Zhang, X., Cao, M., Wu, Z., Hu, W., Chen, Z., & Zhang, X. (2021). Natural compounds modulate the autophagy with potential implication of stroke. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(7), 1708–1720. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.018>
- Albrecht, J., Hanganu, I. L., Heck, N., & Luhmann, H. J. (2005). Oxygen and glucose deprivation induces major dysfunction in the somatosensory cortex of the newborn rat. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2295–2305. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04398.x>
- Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W. M., Wingler, K., & Schmidt, H. H. H. W. (2015). Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(5), 406–427. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5814>
- Amador-Alvarado, L., Montiel, T., & Massieu, L. (2014). Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metabolic Brain Disease*, 29(3), 711–719. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9508-5>
- Auer, S., Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Breitenbach-Koller, H., Geisberger, R., Aigner, E., Cadamuro, J., Richter, K., Sopjani, M., Haschke-Becher, E., Felder, T. K., & Breitenbach, M. (2017). The human NADPH oxidase, Nox4, regulates cytoskeletal organization in two cancer cell lines, HepG2 and SH-SY5Y. *Frontiers in Oncology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00111>

- Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G. Z., Krause, K. H., & Cox, J. A. (2004). Mechanism of Ca²⁺ Activation of the NADPH Oxidase 5 (NOX5). *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18583–18591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310268200>
- Bang, J., Son, K. H., Heo, H.-R., Park, E., Kwak, H.-J., Uhm, K.-O., Chung, M.-H., Kim, Y.-Y., & Lim, H. J. (2023). Exogenous 8-Hydroxydeoxyguanosine Attenuates PM2.5-Induced Inflammation in Human Bronchial Epithelial Cells by Decreasing NLRP3 Inflammasome Activation. *Antioxidants*, 12(6), 1189. <https://doi.org/10.3390/antiox12061189>
- Barua, S., Kim, J. Y., Yenari, M. A., & Lee, J. E. (2019). The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases. *IBRO Reports*, 7, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.07.1721>
- Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10, 23–48.
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). *The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.-For
- Belarbi, K., Cuvelier, E., Destée, A., Gressier, B., & Chartier-Harlin, M. C. (2017). NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0225-5>
- Bhardwaj, V., & He, J. (2020). Reactive Oxygen Species, Metabolic Plasticity, and Drug Resistance in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3412. <https://doi.org/10.3390/ijms21103412>
- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Böhm, A., Trosien, S., Avrutina, O., Kolmar, H., & Biesalski, M. (2018). Covalent Attachment of Enzymes to Paper Fibers for Paper-Based Analytical Devices. *Frontiers in Chemistry*, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00214>

- Bonds, D. E., Miller, M. E., Dudl, J., Feinglos, M., Ismail-Beigi, F., Malozowski, S., Seaquist, E., Simmons, D. L., & Sood, A. (2012). Severe hypoglycemia symptoms, antecedent behaviors, immediate consequences and association with glycemia medication usage: Secondary analysis of the ACCORD clinical trial data. *BMC Endocrine Disorders*, *12*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-12-5>
- Boon, N. J., Oliveira, R. A., Körner, P.-R., Kochavi, A., Mertens, S., Malka, Y., Voogd, R., van der Horst, S. E. M., Huismans, M. A., Smabers, L. P., Draper, J. M., Wessels, L. F. A., Haahr, P., Roodhart, J. M. L., Schumacher, T. N. M., Snippert, H. J., Agami, R., & Brummelkamp, T. R. (2024). DNA damage induces p53-independent apoptosis through ribosome stalling. *Science*, *384*(6697), 785–792. <https://doi.org/10.1126/science.adh7950>
- Bournival, J., Francoeur, M.-A., Renaud, J., & Martinoli, M.-G. (2012). Quercetin and Sesamin Protect Neuronal PC12 Cells from High-Glucose-Induced Oxidation, Nitrosative Stress, and Apoptosis. *Rejuvenation Research*, *15*(3), 322–333. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1242>
- Bowler, R. P., Nicks, M., Olsen, D. A., Thøgersen, I. B., Valnickova, Z., Højrup, P., Franzusoff, A., Enghild, J. J., & Crapo, J. D. (2002). Furin Proteolytically Processes the Heparin-binding Region of Extracellular Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 16505–16511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105409200>
- Calvo-Rodriguez, M., Kharitonova, E. K., & Bacskai, B. J. (2020). Therapeutic Strategies to Target Calcium Dysregulation in Alzheimer’s Disease. *Cells*, *9*(11), 2513. <https://doi.org/10.3390/cells9112513>
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, *36*(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/emj.201695810>
- Chan, P. H. (2001). Reactive Oxygen Radicals in Signaling and Damage in the Ischemic Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *21*(1), 2–14. <https://doi.org/10.1097/00004647-200101000-00002>
- Chen, S., Chen, H., Du, Q., & Shen, J. (2020). Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. *Frontiers in Physiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00433>

- Cheng, G., Ritsick, D., & Lambeth, J. D. (2004). Nox3 Regulation by NOXO1, p47, and p67. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34250–34255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400660200>
- Cho, D.-H., Nakamura, T., & Lipton, S. A. (2010). Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3435–3447. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0435-2>
- Chopra, M., Kaul, K., Tarr, J., Choudhury, R., Kohner, E. M., & Chibber, R. (2012). Oxidative stress in diabetic neuropathy: source of reactive oxygen species. *Endocrinology Studies*, 2(2), 6. <https://doi.org/10.4081/es.2012.e6>
- Cimarosti, H., & Henley, J. M. (2008). Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: Potential involvement of protein SUMOylation. In *Neuroscientist* (Vol. 14, Issue 6, pp. 626–636). <https://doi.org/10.1177/1073858408322677>
- Diebold, B. A., Wilder, S. G., De Deken, X., Meitzler, J. L., Doroshov, J. H., McCoy, J. W., Zhu, Y., & Lambeth, J. D. (2019). Guidelines for the Detection of NADPH Oxidases by Immunoblot and RT-qPCR (pp. 191–229). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_12
- Dienel, G. A., & Cruz, N. F. (2004). Nutrition during brain activation: does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochemistry International*, 45(2–3), 321–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.10.011>
- Doser, R. L., & Hoerndli, F. J. (2021). Regulation of neuronal excitability by reactive oxygen species and calcium signaling: Insights into brain aging. *Current Research in Neurobiology*, 2, 100012. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100012>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Enghild, J. J., Thøgersen, I. B., Oury, T. D., Valnickova, Z., Højrup, P., & Crapo, J. D. (1999). The Heparin-binding Domain of Extracellular Superoxide Dismutase Is Proteolytically Processed Intracellularly during Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 14818–14822. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14818>

- Entezari, M., Hashemi, D., Taheriazam, A., Zabolian, A., Mohammadi, S., Fakhri, F., Hashemi, M., Hushmandi, K., Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Ertas, Y. N., Mirzaei, S., & Samarghandian, S. (2022). AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *146*, 112563. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112563>
- Favero, T. G., Colter, D., Hooper, P. F., & Abramson, J. J. (1998). Hypochlorous acid inhibits Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Applied Physiology*, *84*(2), 425–430. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.425>
- Ferdous, M., R, S. C., Mudi, S. R., Ali, M., Jasmin, S., Fariduddin, M., Alam, S. M. K., Arslan, M. I., & Biswas, S. K. (2020). Expression of neutrophil elastase and myeloperoxidase mRNA in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *14*(2), 83–85. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.01.001>
- Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R. P., Beuve, A., & Routh, V. H. (2011). Hypothalamic Nitric Oxide in Hypoglycemia Detection and Counterregulation: A Two-Edged Sword. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(3), 505–517. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3331>
- Gómez-Valadés, A. G., Gonzalez-Franquesa, A., Gama-Perez, P., Claret, M., & Garcia-Roves, P. M. (2017). Emerging Concepts in Diabetes: Mitochondrial Dynamics and Glucose Homeostasis. *Current Diabetes Reviews*, *13*(4), 370–385. <https://doi.org/10.2174/1573399812666151012115229>
- González, P., Lozano, P., Ros, G., & Solano, F. (2023). Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(11), 9352. <https://doi.org/10.3390/ijms24119352>
- Gould, J., Reeve, H. L., Vaughan, P. F. T., & Peers, C. (1992). Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Neuroscience Letters*, *145*(2), 201–204. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90022-Y](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90022-Y)
- Green, P. S., Mendez, A. J., Jacob, J. S., Crowley, J. R., Growdon, W., Hyman, B. T., & Heinecke, J. W. (2004). Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *90*(3), 724–733. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02527.x>

- Griffith, O. W., & Stuehr, D. J. (1995). Nitric Oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 707–734. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003423>
- Han, D., Canali, R., Rettori, D., & Kaplowitz, N. (2003). Effect of Glutathione Depletion on Sites and Topology of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production in Mitochondria. *Molecular Pharmacology*, 64(5), 1136–1144. <https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1136>
- Hauser, M., & Cornelius, E. (1976). Letter: Pleural oligemia seen in bone scanning. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 17(9), 851–852.
- Herb, M. (2024). NADPH Oxidase 3: Beyond the Inner Ear. *Antioxidants*, 13(2), 219. <https://doi.org/10.3390/antiox13020219>
- Hernández-Fonseca, K., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J., & Massieu, L. (2008). Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 86(8), 1768–1780. <https://doi.org/10.1002/jnr.21634>
- Horbay, R., & Bilyy, R. (2016). Mitochondrial dynamics during cell cycling. In *Apoptosis* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1327–1335). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1295-5>
- Hosseini, M., Rezvani, H. R., Aroua, N., Bosc, C., Farge, T., Saland, E., Guyonnet-Dupérat, V., Zaghdoudi, S., Jarrou, L., Larrue, C., Sabatier, M., Mouchel, P. L., Gotanègre, M., Piechaczyk, M., Bossis, G., Récher, C., & Sarry, J.-E. (2019). Targeting Myeloperoxidase Disrupts Mitochondrial Redox Balance and Overcomes Cytarabine Resistance in Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Research*, 79(20), 5191–5203. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0515>
- Huang, C. C. Y., Shi, L., Lin, C.-H., Kim, A. J., Ko, M. L., & Ko, G. Y.-P. (2015). A new role for AMP-activated protein kinase in the circadian regulation of L-type voltage-gated calcium channels in late-stage embryonic retinal photoreceptors. *Journal of Neurochemistry*, 135(4), 727–741. <https://doi.org/10.1111/jnc.13349>
- Huang, T.-J., Sayers, N. M., Verkhatsky, A., & Fernyhough, P. (2005). Neurotrophin-3 prevents mitochondrial dysfunction in sensory neurons of streptozotocin-diabetic rats. *Experimental Neurology*, 194(1), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.03.001>

- Hwang, J. J., Jiang, L., Hamza, M., Sanchez Rangel, E., Dai, F., Belfort-DeAguiar, R., Parikh, L., Koo, B. B., Rothman, D. L., Mason, G., & Sherwin, R. S. (2017). Blunted rise in brain glucose levels during hyperglycemia in adults with obesity and T2DM. *JCI Insight*, 2(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95913>
- Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Dirnagl, U., Plotnikov, E. Yu., Kuvshinova, E. A., & Zorov, D. B. (2008). Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons. *Biochemistry (Moscow)*, 73(2), 149–155. <https://doi.org/10.1134/S0006297908020053>
- Jacob, R. J., Fan, X., Evans, M. L., Dziura, J., & Sherwin, R. S. (2002). Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: No evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism*, 51(12), 1522–1524. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.36347>
- James, A. D., Chan, A., Erice, O., Siriwardena, A. K., & Bruce, J. I. E. (2013). Glycolytic ATP fuels the plasma membrane calcium pump critical for pancreatic cancer cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 36007–36019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502948>
- Jang, J., Kim, S. R., Lee, J. E., Lee, S., Son, H. J., Choe, W., Yoon, K.-S., Kim, S. S., Yeo, E.-J., & Kang, I. (2023). Molecular Mechanisms of Neuroprotection by Ketone Bodies and Ketogenic Diet in Cerebral Ischemia and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 124. <https://doi.org/10.3390/ijms25010124>
- Ježek, J., Cooper, K. F., & Strich, R. (2018). Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: The yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. In *Antioxidants* (Vol. 7, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox7010013>
- Kaisto, T. (2003). Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Experimental Cell Research*, 289(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00231-3)
- Kajihara, N., Kukidome, D., Sada, K., Motoshima, H., Furukawa, N., Matsumura, T., Nishikawa, T., & Araki, E. (2017). Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells. *Journal of Diabetes Investigation*, 8(6), 750–761. <https://doi.org/10.1111/jdi.12678>

- Karakuzu, O., Cruz, M., Liu, Y., & Garsin, D. (2019). Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *BIO-PROTOCOL*, 9(21). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3409>
- Kawahara, T., Quinn, M. T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-109>
- Khan, A. A., Alsahli, M. A., & Rahmani, A. H. (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>
- Krishnaswamy, A., & Cooper, E. (2012). Reactive oxygen species inactivate neuronal nicotinic acetylcholine receptors through a highly conserved cysteine near the intracellular mouth of the channel: implications for diseases that involve oxidative stress. *The Journal of Physiology*, 590(1), 39–47. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214007>
- Kronenberger, L., Mett, J., Hoppstädter, J., & Müller, U. (2024). Metabolic Profiling of SH-SY5Y and Neuro2A Cells in Relation to Fetal Calf Serum (FCS) Concentration in Culture Media. *Metabolites*, 14(4), 188. <https://doi.org/10.3390/metabo14040188>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lamichhane, S., Bastola, T., Pariyar, R., Lee, E.-S., Lee, H.-S., Lee, D., & Seo, J. (2017). ROS Production and ERK Activity Are Involved in the Effects of d-β-Hydroxybutyrate and Metformin in a Glucose Deficient Condition. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 674. <https://doi.org/10.3390/ijms18030674>
- Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., Choi, J. S., Kim, G. D., Joo, S. T., Choi, I., & Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. In *Food Science of Animal Resources* (Vol. 42, Issue 5, pp. 775–799). Korean Society for Food Science of Animal Resources. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>
- Lee, J.-M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., & Choi, D. W. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *Journal of Clinical Investigation*, 106(6), 723–731. <https://doi.org/10.1172/JCI11003>

- Letz, B., Schomerus, C., Maronde, E., Korf, H. W., & Korbmayer, C. (1997). Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca^{2+} channels in rat pinealocytes. *The Journal of Physiology*, 499(2), 329–340. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021930>
- Li, C., Chai, X., Pan, J., Huang, J., Wu, Y., Xue, Y., Zhou, W., Yang, J., Zhu, X., & Zhao, S. (2022). β -Hydroxybutyrate Alleviates Low Glucose-Induced Apoptosis via Modulation of ROS-Mediated p38 MAPK Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*, 72(5), 923–938. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01974-3>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, 27(2), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>
- Liu, Z., Gu, S., Lu, T., Wu, K., Li, L., Dong, C., & Zhou, Y. (2020). IFI6 depletion inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression through reactive oxygen species accumulation via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01646-3>
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J. D. R., Sun, W., Goldman, S., Blekot, S., Nielsen, M., Takano, T., Deane, R., & Nedergaard, M. (2015). Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature Communications*, 6(1), 6807. <https://doi.org/10.1038/ncomms7807>
- Ma, A., Wang, J., Yang, L., An, Y., & Zhu, H. (2017). AMPK activation enhances the anti-atherogenic effects of high density lipoproteins in apoE^{-/-} mice. *Journal of Lipid Research*, 58(8), 1536–1547. <https://doi.org/10.1194/jlr.M073270>
- Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>

- Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2007). Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 100(4), 460–473. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258450.44413.96>
- Matsumoto, M., Katsuyama, M., Iwata, K., Ibi, M., Zhang, J., Zhu, K., Nauseef, W. M., & Yabe-Nishimura, C. (2014). Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.013>
- McGowan, J. E., Chen, L., Gao, D., Trush, M., & Wei, C. (2006). Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia. *Neuroscience Letters*, 399(1–2), 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.034>
- McKee, T. J., & Komarova, S. V. (2017). Is it time to reinvent basic cell culture medium? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(5), C624–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00336.2016>
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 36, Issue 10, pp. 587–597). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Mikhail, A. I., Ng, S. Y., Mattina, S. R., & Ljubicic, V. (2023). AMPK is mitochondrial medicine for neuromuscular disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 29(7), 512–529. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.03.008>
- Minard, K. I., & McAlister-Henn, L. (1999). Dependence of peroxisomal beta-oxidation on cytosolic sources of NADPH. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3402–3406. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3402>
- Morand, S., Agnandji, D., Noel-Hudson, M.-S., Nicolas, V., Buisson, S., Macon-Lemaitre, L., Gnidehou, S., Kaniewski, J., Ohayon, R., Virion, A., & Dupuy, C. (2004). Targeting of the Dual Oxidase 2 N-terminal Region to the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30244–30251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405406200>
- Munhoz, A. C., Riva, P., Simões, D., Curi, R., & Carpinelli, A. R. (2016). Control of Insulin Secretion by Production of Reactive Oxygen Species: Study Performed in Pancreatic Islets from Fed and 48-Hour Fasted Wistar Rats. *PLOS ONE*, 11(6), e0158166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158166>

- Muraleedharan, R., & Dasgupta, B. (2022). AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. In *FEBS Journal* (Vol. 289, Issue 8, pp. 2247–2262). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.16151>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Mustapha, N. M., Tarr, J. M., Kohner, E. M., & Chibber, R. (2010). NADPH Oxidase versus Mitochondria-Derived ROS in Glucose-Induced Apoptosis of Pericytes in Early Diabetic Retinopathy. *Journal of Ophthalmology*, 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/746978>
- Nakano, Y., Banfi, B., Jesaitis, A. J., Dinauer, M. C., Allen, L. A. H., & Nauseef, W. M. (2007). Critical roles for p22^{phox} in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochemical Journal*, 403(1), 97–108. <https://doi.org/10.1042/BJ20060819>
- Nikoletopoulou, V., & Tavernarakis, N. (2012). Calcium homeostasis in aging neurons. *Frontiers in Genetics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00200>
- Nikolova, S., Lee, Y. S., Lee, Y. S., & Kim, J. A. (2005). Rac1-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radical Research*, 39(12), 1295–1304. <https://doi.org/10.1080/10715760500176866>
- Okada, S. S., de Oliveira, E. M., de Araújo, T. H., Rodrigues, M. R., Albuquerque, R. C., Mortara, R. A., Taniwaki, N. N., Nakaya, H. I., Campa, A., & Moreno, A. C. R. (2016). Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. *Cellular Immunology*, 300, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.11.003>
- Palee, S., Apaijai, N., Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2016). Acetylcholine Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Intracellular Calcium Dyshomeostasis Through Both Muscarinic and Nicotinic Receptors in Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 341–349. <https://doi.org/10.1159/000445628>
- Pandey, D., Patel, A., Patel, V., Chen, F., Qian, J., Wang, Y., Barman, S. A., Venema, R. C., Stepp, D. W., Daniel Rudic, R., & Fulton, D. J. R. (2012). Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(10), H1919–H1928. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00910.2011>

- Papachristoforou, E., Lambadiari, V., Maratou, E., & Makrilakis, K. (2020). Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Journal of Diabetes Research*, 2020, 7489795. <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A. M., Jiménez, N., Hernández-Cruz, A., & Massieu, L. (2010). Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 167(4), 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.074>
- Pecchillo Cimmino, T., Ammendola, R., Cattaneo, F., & Esposito, G. (2023). NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2086. <https://doi.org/10.3390/ijms24032086>
- Pei, J. V, Kourghi, M., De Ieso, M. L., Campbell, E. M., Dorward, H. S., Hardingham, J. E., & Yool, A. J. (2016). Differential Inhibition of Water and Ion Channel Activities of Mammalian Aquaporin-1 by Two Structurally Related Bacopaside Compounds Derived from the Medicinal Plant *Bacopa monnieri*. *Molecular Pharmacology*, 90(4), 496–507. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105882>
- Peng, J.-Y., Lin, C.-C., Chen, Y.-J., Kao, L.-S., Liu, Y.-C., Chou, C.-C., Huang, Y.-H., Chang, F.-R., Wu, Y.-C., Tsai, Y.-S., & Hsu, C.-N. (2011). Automatic Morphological Subtyping Reveals New Roles of Caspases in Mitochondrial Dynamics. *PLoS Computational Biology*, 7(10), e1002212. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002212>
- Pini, N., Huo, Z., Kym, U., Holland-Cunz, S., & Gros, S. J. (2021). AQP1-Driven Migration Is Independent of Other Known Adverse Factors but Requires a Hypoxic Undifferentiated Cell Profile in Neuroblastoma. *Children*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.3390/children8010048>
- Prior, K.-K., Wittig, I., Leisegang, M. S., Groenendyk, J., Weissmann, N., Michalak, M., Jansen-Dürr, P., Shah, A. M., & Brandes, R. P. (2016). The Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin Is a NADPH Oxidase NOX4 Interacting Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 7045–7059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710772>

- Purisai, M. G., McCormack, A. L., Cumine, S., Li, J., Isla, M. Z., & Di Monte, D. A. (2007). Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiology of Disease*, 25(2), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.10.008>
- Qaddoumi, M. G., Alanbaei, M., Hammad, M. M., Al Khairi, I., Cherian, P., Channanath, A., Thanaraj, T. A., Al-Mulla, F., Abu-Farha, M., & Abubaker, J. (2020). Investigating the Role of Myeloperoxidase and Angiopoietin-like Protein 6 in Obesity and Diabetes. *Scientific Reports*, 10(1), 6170. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63149-7>
- Quinn, M. T., & Gauss, K. A. (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(4), 760–781. <https://doi.org/10.1189/jlb.0404216>
- Raad, H., Paciet, M.-H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Dang, P. M.-C., & El-Benna, J. (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67^{phox}, and p47^{phox}. *The FASEB Journal*, 23(4), 1011–1022. <https://doi.org/10.1096/fj.08-114553>
- Raccuglia, D. (2011). Die Rolle des Neurotransmitters GABA bei der Gedächtnisbildung und Modulation neuronaler Aktivität in Honigbiene und Fruchtfliege. *Dissertation Zur Erlangung Des Akademischen Grades Des Doktors Der Naturwissenschaften Der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- Und Werkstoffwissenschaften Der Universität Des Saarlandes*.
- Ridley, D. L., Pakkanen, J., & Wonnacott, S. (2002). Effects of chronic drug treatments on increases in intracellular calcium mediated by nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *British Journal of Pharmacology*, 135(4), 1051–1059. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704508>
- Rizza, S., Cirotti, C., Montagna, C., Cardaci, S., Consales, C., Cozzolino, M., Carri, M. T., Cecconi, F., & Filomeni, G. (2015). S -Nitrosoglutathione Reductase Plays Opposite Roles in SH-SY5Y Models of Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2015(1). <https://doi.org/10.1155/2015/536238>

- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. (2003). Glucose Toxicity in β -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes*, 52(3), 581–587. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.581>
- Romero, N., Rogers, G., Neilson, A., & Dranka, B. P. (2018). White Paper Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology 2.
- Romero, N., Swain, P., Neilson, A., & Dranka, B. P. (2021). White Paper Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology.
- Sakagami, H., Suzuki, R., Shirataki, Y., Iwama, S., Nakagawa, M., Suzuki, H., Tanaka, K., Tamura, N., & Takeshima, H. (2017). Re-evaluation of culture condition of PC12 and SH-SY5Y cells based on growth rate and amino acid consumption. *In Vivo*, 31(6), 1089–1095. <https://doi.org/10.21873/invivo.11174>
- Sanderson, T. H., Reynolds, C. A., Kumar, R., Przyklenk, K., & Hüttemann, M. (2013). Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 9–23. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z>
- Selemidis, S., Dusting, G., Peshavariya, H., Kempfarper, B., & Drummond, G. (2007). Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 75(2), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.030>
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979–1987. <https://doi.org/10.1110/ps.04789804>
- Shibuya, S., Watanabe, K., Ozawa, Y., & Shimizu, T. (2021). Xanthine Oxidoreductase-Mediated Superoxide Production Is Not Involved in the Age-Related Pathologies in Sod1-Deficient Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3542. <https://doi.org/10.3390/ijms22073542>
- Shimomura, Y., Suga, M., Kuriyama, N., Nakamura, T., Sakai, T., Kato, Y., Hara, Y., Yamashita, C., Nagasaki, H., Kaneki, M., & Nishida, O. (2016). Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro. *Journal of Intensive Care*, 4(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0177-9>
- Steinberg, G. R., & Hardie, D. G. (2023). New insights into activation and function of the AMPK. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 24(4), 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00547-x>

- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784–44790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>
- Suen, D.-F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, 22(12), 1577–1590. <https://doi.org/10.1101/gad.1658508>
- Suh, S. W., Shin, B. S., Ma, H., Van Hoecke, M., Brennan, A. M., Yenari, M. A., & Swanson, R. A. (2008). Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Annals of Neurology*, 64(6), 654–663. <https://doi.org/10.1002/ana.21511>
- Surendran, D. (2019). PKC γ and PKC ϵ are Differentially Activated and Modulate Neurotoxic Signaling Pathways During Oxygen Glucose Deprivation in Rat Cortical Slices. *Neurochemical Research*, 44(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02876-4>
- Taiwo, F. A. (2008). Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Spectroscopy*, 22, 491–498. <https://doi.org/10.3233/SPE-2008-0362>
- Tang, Z., Ye, W., Chen, H., Kuang, X., Guo, J., Xiang, M., Peng, C., Chen, X., & Liu, H. (2019). Role of purines in regulation of metabolic reprogramming. *Purinergic Signalling*, 15(4), 423–438. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09676-z>
- Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2013). Reactive oxygen species and the cardiovascular system. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2013/862423>
- Terzi, A., & Suter, D. M. (2020). The role of NADPH oxidases in neuronal development. *Free Radical Biology and Medicine*, 154, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.027>
- ThermoFisher Scientific. (2010). *Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition (2010) Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives The Molecular Probes® Handbook A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES 11th Edition (2010)*. www.invitrogen.com/probes
- Touyz, R. M., Anagnostopoulou, A., Rios, F., Montezano, A. C., & Camargo, L. L. (2019). NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Experimental Physiology*, 104(5), 605–616. <https://doi.org/10.1113/EP086204>

- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R.-D., & Huang, P. (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(8), 1343–1374. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957>
- Turrigiano, G. (2011). Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annual Review of Neuroscience*, *34*(1), 89–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153238>
- Ungvari, Z., Labinskyy, N., Mukhopadhyay, P., Pinto, J. T., Bagi, Z., Ballabh, P., Zhang, C., Pacher, P., & Csiszar, A. (2009). Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *297*(5), H1876–H1881. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00375.2009>
- Ushio-Fukai, M., Ash, D., Nagarkoti, S., Belin de Chantemèle, E. J., Fulton, D. J. R., & Fukai, T. (2021). Interplay Between Reactive Oxygen/Reactive Nitrogen Species and Metabolism in Vascular Biology and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *34*(16), 1319–1354. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8161>
- Valente, A. J., Maddalena, L. A., Robb, E. L., Moradi, F., & Stuart, J. A. (2017). A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochemica*, *119*(3), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.001>
- Vaziri, N. D., Dicus, M., Ho, N. D., Boroujerdi-Rad, L., & Sindhu, R. K. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International*, *63*(1), 179–185. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00702.x>
- Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., & Fieschi, F. (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*, *10*(6), 890. <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
- Wang, H., Schoebel, S., Schmitz, F., Dong, H., & Hedfalk, K. (2020). Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1862*(2), 183065. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183065>
- Wang, H., Wang, Z., Ding, Y., Piao, M., Feng, C., Chi, G., Luo, Y., & Ge, P. (2018). Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *24*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1111/cns.12771>

- Wang, S., Zhao, H., Lin, S., Lv, Y., Lin, Y., Liu, Y., Peng, R., & Jin, H. (2023). New therapeutic directions in type II diabetes and its complications: mitochondrial dynamics. *Frontiers in Endocrinology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1230168>
- Wang, X., Hu, X., Zhang, L., Xu, X., & Sakurai, T. (2020). Nicotinamide mononucleotide administration after severe hypoglycemia improves neuronal survival and cognitive function in rats. *Brain Research Bulletin*, *160*, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.04.022>
- Wen, Y., Liu, R., Lin, N., Luo, H., Tang, J., Huang, Q., Sun, H., & Tang, L. (2019). NADPH Oxidase Hyperactivity Contributes to Cardiac Dysfunction and Apoptosis in Rats with Severe Experimental Pancreatitis through ROS-Mediated MAPK Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/4578175>
- Whiteman, M., Rose, P., Siau, J. L., Cheung, N. S., Tan, G. S., Halliwell, B., & Armstrong, J. S. (2005). Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology & Medicine*, *38*(12), 1571–1584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.030>
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *112*, 531–552. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>
- Xie, Z., Dong, Y., Zhang, M., Cui, M.-Z., Cohen, R. A., Riek, U., Neumann, D., Schlattner, U., & Zou, M.-H. (2006). Activation of Protein Kinase C ζ by Peroxynitrite Regulates LKB1-dependent AMP-activated Protein Kinase in Cultured Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(10), 6366–6375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511178200>
- Yang, C., Ko, B., Hensley, C. T., Jiang, L., Wasti, A. T., Kim, J., Sudderth, J., Calvaruso, M. A., Lumata, L., Mitsche, M., Rutter, J., Merritt, M. E., & DeBerardinis, R. J. (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular Cell*, *56*(3), 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.025>

- Zaidi, A. (2010). Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. *World Journal of Biological Chemistry*, 1(9), 271–280. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i9.271>
- Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., Guo, C., & Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report*, 27(1), 45–52. <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2046423>
- Zhang, C., Yang, J., Jacobs, J. D., & Jennings, L. K. (2003). Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(6), H2563–H2572. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00435.2003>
- Zhang, C., Yang, J., & Jennings, L. K. (2004). Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose--induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose--stimulated, vascular non--leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes*, 53(11), 2950–2959. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.11.2950>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1). <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, S., Zhang, Y., Wen, Z., Yang, Y., Bu, T., Bu, X., & Ni, Q. (2023). Cognitive dysfunction in diabetes: abnormal glucose metabolic regulation in the brain. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1192602>
- Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., & Du, G. (2018). PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>
- Zmijewski, J. W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E. R., & Abraham, E. (2010). Exposure to Hydrogen Peroxide Induces Oxidation and Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33154–33164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143685>
- Zoccarato, F., Cavallini, L., Bortolami, S., & Alexandre, A. (2007). Succinate modulation of H₂O₂ release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. *Biochemical Journal*, 406(1), 125–129. <https://doi.org/10.1042/BJ20070215>

9. Anhang

9.1 ImageJ-Macros

```
run("Set Scale...", "distance=0 known=0 pixel=1 unit=pixel");
run("Find Edges");
run("Enhance Contrast...", "saturated=1");
run("Multiply...", "value=4");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
setAutoThreshold("Huang dark");
run("Analyze Particles...", "size=300-Infinity display clear include add");
```

Abbildung 52 ImageJ-Macro zur Ermittlung der Zellflächen.

Mit Hilfe des *Thresholds* „Huang dark“ wurden für alle Zellen ab einer Größe von 300 Quadratpixeln die Fläche („Area“) berechnet. Mit Hilfe diese Macros wurde die mitochondriale Masse pro SH SY5Y Zelle ermittelt (eigene Abbildung).

9.2 Einfluss der Glucose-Verfügbarkeit auf die Zell-Viabilität

Tabelle 17 Mittlere Zellzahl nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h.

Dargestellt wurde die mittlere Zellzahl pro Behandlungsgruppe gemessen mittels BioTek Cytation 5 System sowie die Standardabweichung, die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Inkubationszeit	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	28884	30166	30644	23967	31828	30424
Standardabw.	3023	2355	2993	3707	1988	2331
Anzahl	23	22	24	30	32	30
Statistik	ns		ns	<0,001		0,0137

Tabelle 18 Mittlere Zellzahl nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 30 min.

Dargestellt wurde die mittlere Zellzahl pro Behandlungsgruppe gemessen mittels BioTek Cytation 5 System sowie die Standardabweichung, die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Inkubationszeit	30 min	
	8,25 mM	0 mM
Mittelwert	31977	32670
Standardabw.	1973	1965
Anzahl	11	12
Statistik		ns

9.3 Energieträger-Messungen

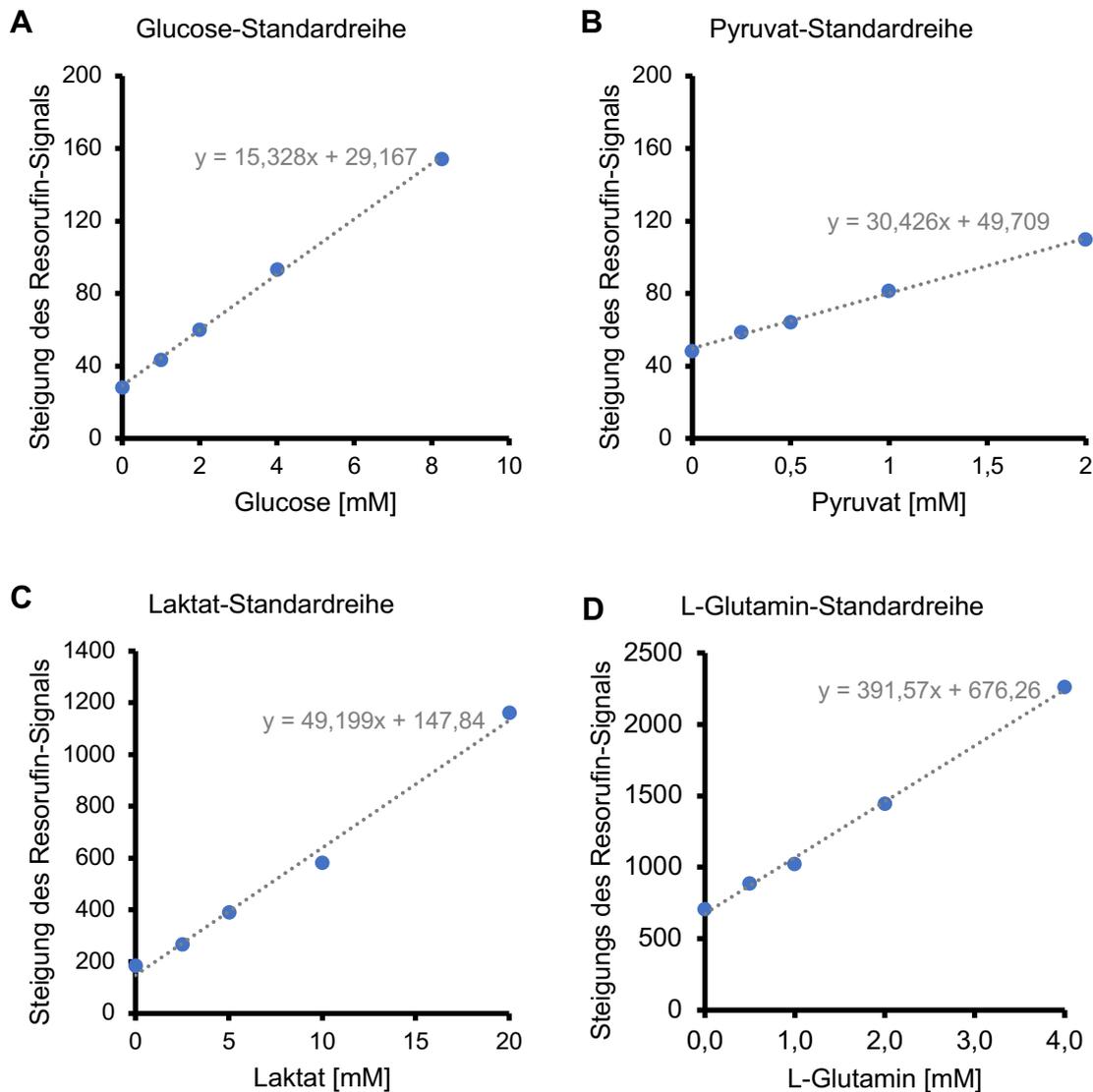


Abbildung 53 Beispiele der Standardreihen zur Berechnung der Energieträger-Konzentration im Medium-Überstand.

Aufgetragen wurde die berechnete einheitslose Steigung des Resorufin-Signals nach der Amplex Red-Messung gegen die Konzentrationen der mitgeführten Energieträger-Standards in mM. Jede Konzentration wurde als Doppelbestimmung bei der jeweiligen Messung mitgeführt. Die graue Linie stellt die lineare Trendlinie dar. Die Formel der Trendlinie wurde zur Berechnung der Konzentration der Energieträger im Medium-Überstand für die Wells mit SH SY5Y Zellen nach x umgestellt. **A:** Standardreihe zur Berechnung der Glucose-Konzentration. Die verwendete Formel als Beispiel zur Berechnung der Glucose-Konzentration lautete wie folgt: $x = (y - 29,167) / 15,328$, so dass sich bei einer eingesetzten Steigung des Resorufin-Signals von 154,4 eine Glucose-Konzentration von 8,17 mM ergab. **B:** Standardreihe zur Berechnung der Pyruvat-Konzentration. **C:** Standardreihe zur Berechnung der Laktat-Konzentration. **D:** Standardreihe zur Berechnung der L-Glutamin-Konzentration. (eigene Abbildung).

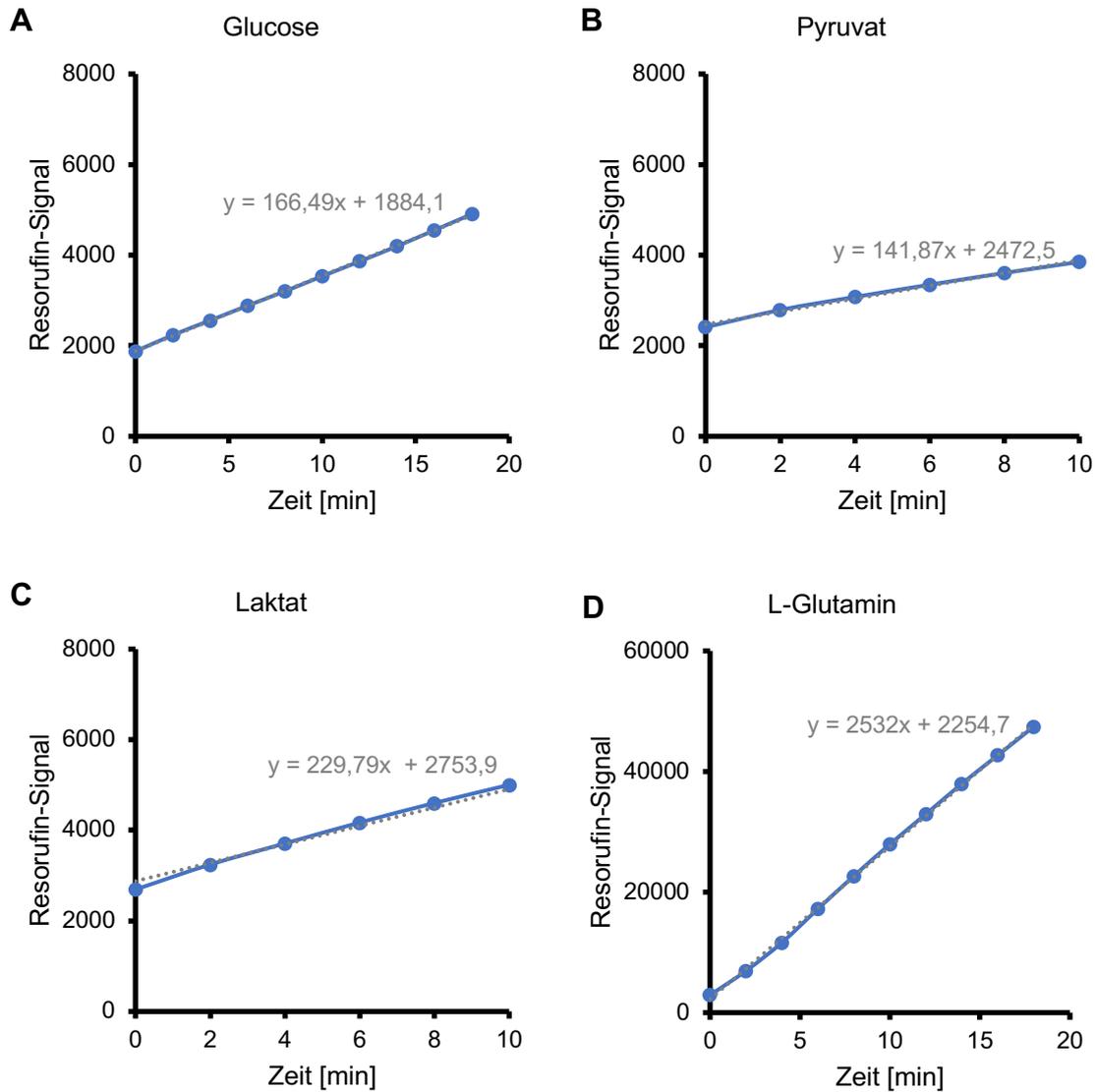


Abbildung 54 Exemplarischer Verlauf der Steigung des Resorufin-Signals bei der Messung der Energieträger mittels Amplex Red.

Aufgetragen wurde das einheitslose Resorufin-Signal gegen die Zeit seit Zugabe des Reaktionsmixes mit der jeweiligen Oxidase in Minuten. Es wurde der Medium-Überstand von 30.000 SH SY5Y Zellen/Well gemessen. Die graue Linie stellt die Steigungsgerade dar. **A:** Messung mit der Glucose-Oxidase. Zur Berechnung der Steigung wurde der Messzeitraum von 20 min verwendet. Ein Beispiel zur Berechnung der Steigung für das hier dargestellte Well lautet: $y = 166,49x + 1884,1$, somit beträgt die Steigung 167,7 **B:** Messung mit der Pyruvat-Oxidase über einen Messzeitraum von 10 min. **C:** Messung mit der Laktat-Oxidase über einen Messzeitraum von 10 min. **D:** Messung mit der L-Glutamat-Oxidase über einen Zeitraum von 20 min (eigene Abbildung).

Tabelle 19 Mittlere Konzentration der Energieträger im Medium von Zell-freien Wells.

Die Inkubation der Zell-freien Wells erfolgte über einen Zeitraum von 0 bis 48 h in DMEM (0,1 % FCS) mit 2, 8, 25 oder 16,5 mM Glucose. Dargestellt wurden die mittleren berechneten Konzentrationen der Energieträger im Medium-Überstand Zell-freier Wells in mM sowie die Standardabweichung, die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen den Zeitpunkt 0 h (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). **A:** Mittlere Glucose-Konzentrationen. **B:** Mittlere Pyruvat-Konzentrationen. **C:** Mittlere Laktat-Konzentrationen. **D:** Mittlere L-Glutamin-Konzentrationen.

A Glucose [mM]

Glucose-Konzentration	2 mM			8,25 mM			16,5 mM			
	Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Mittelwert		3,3	2,8	3,2	10,9	10,1	10,7	20,7	20,8	22,0
Standardabw.		1,2	0,9	0,4	0,8	0,5	0,6	2,9	1,8	4,8
Anzahl		4	4	4	4	4	4	4	4	4
Statistik			ns	ns		ns	ns		ns	ns

B Pyruvat [mM]

Glucose-Konzentration	2 mM			8,25 mM			16,5 mM			
	Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Mittelwert		4,4	3,1	4,2	3,9	2,3	3,0	3,3	2,8	3,3
Standardabw.		1,6	0,8	0,7	1,8	0,4	0,4	0,7	0,6	1,1
Anzahl		4	4	4	4	4	3	4	4	4
Statistik			ns	ns		ns	ns		ns	ns

C Laktat [mM]

Glucose-Konzentration	2 mM			8,25 mM			16,5 mM			
	Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Mittelwert		6,1	4,7	2,0	4,1	3,1	1,0	3,1	1,3	1,1
Standardabw.		1,4	2,0	1,7	3,6	3,7	2,2	4,1	2,5	2,7
Anzahl		4	4	4	4	4	4	4	4	4
Statistik			ns	ns		ns	ns		ns	ns

D L-Glutamin [mM]									
Glucose-Konzentration	2 mM			8,25 mM			16,5 mM		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Mittelwert	2,9	2,9	3,1	2,7	2,7	2,6	2,9	2,9	3,2
Standardabw.	0,6	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,6
Anzahl	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Statistik		ns	ns		ns	ns		ns	ns

9.4 Charakterisierung der Mitochondrien mittels CellLight Mitochondria-GFP

Tabelle 20 Durchschnittliche Länge mitochondrialer Strukturen pro SH SY5Y Zelle.

Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Länge mitochondrialer Strukturen („branch length mean“) in Zentimeter nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der ausgewerteten Mikroskopaufnahmen (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die jeweilige Behandlungsgruppe, welche 8,25 mM Glucose erhielt (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Inkubationszeit	24 h			48 h		
	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	0,0559	0,0559	0,0559	0,0559	0,0559	0,0559
Standardabw.	0,0102	0,0102	0,0102	0,0152	0,0102	0,0102
Anzahl	21	24	22	14	21	19
Statistik	ns		ns	ns		ns

9.5 Quantifizierung der Komponenten des „RONS-Netzwerks“ mittels ELISA

Tabelle 21 Quantifizierung der NOX-Isoformen mittels ELISA.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte der NOX-Isoformen gemessen am Mikroplattenreader Spark der verschiedenen Zellzahlen der SH SY5Y Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 0 Zellen (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Mittlere optische Dichte der verschiedenen Zellzahlen der NOX1 und NOX2 (gp91^{phox}) (**A**), der NOX3 und NOX4 (**B**), der NOX5 (**C**), der DUOX1 und 2 (**D**).

A	NOX1				gp91^{phox}				
	Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert		0,029	0,032	0,039	0,058	0,032	0,080	0,114	0,146
Standardabw.		0,002	0,003	0,004	0,017	0,001	0,005	0,008	0,014
Anzahl		6	6	6	6	6	6	6	6
Statistik			ns	ns	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001

B	NOX3				NOX4				
	Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert		0,064	0,452	0,718	0,844	0,036	0,037	0,045	0,040
Standardabw.		0,008	0,042	0,052	0,056	0,007	0,013	0,007	0,007
Anzahl		6	6	6	6	6	6	6	6
Statistik			<0,001	<0,001	<0,001		ns	ns	ns

C	NOX5				
	Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert		0,044	0,273	0,403	0,482
Standardabw.		0,008	0,016	0,038	0,032
Anzahl		6	6	6	6
Statistik			<0,001	<0,001	0,0022

D	DUOX1				DUOX2				
	Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert		0,036	0,067	0,093	0,112	0,033	0,071	0,098	0,145
Standardabw.		0,011	0,004	0,012	0,021	0,004	0,005	0,004	0,016
Anzahl		6	6	6	6	6	6	6	6
Statistik			0,0039	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle 22 Quantifizierung der Myeloperoxidase mittels ELISA.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte der Myeloperoxidase gemessen am Mikrop/attenreader Spark der verschiedenen Zellzahlen der SH SY5Y Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 0 Zellen (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

MPO				
Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert	0,069	0,099	0,138	0,135
Standardabw.	0,025	0,038	0,035	0,028
Anzahl	18	18	18	18
Statistik		0,0101	0,0028	ns

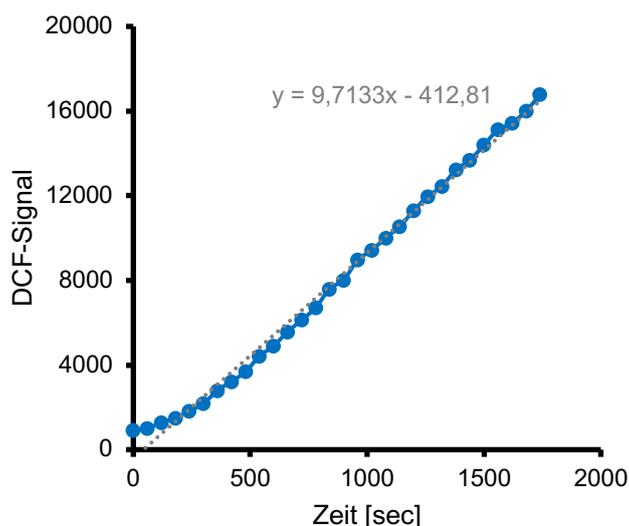
Tabelle 23 Quantifizierung der Superoxid-Dismutase 3 mittels ELISA.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte der SOD3 gemessen am Mikroplattenreader Spark der verschiedenen Zellzahlen der SH SY5Y Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 0 Zellen (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

	SOD3			
Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert	0,076	0,268	0,467	0,553
Standardabw.	0,029	0,034	0,099	0,046
Anzahl	18	18	18	18
Statistik		<0,001	<0,001	0,0026

9.6 Messungen der RONS-Signale mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

9.6.1 Exemplarische Steigungsverläufe der RONS-Fluoreszenzfarbstoffe

**Abbildung 55 Exemplarischer Verlauf der Steigung des DCF-Signals.**

Aufgetragen wurden das einheitslose DCF-Signal eines Wells mit 20.000 SH SY5Y Zellen gegen die Zeit seit der Zugabe der H₂DCFDA-Messlösung in Sekunden. Gemessen wurde über 30 min in einem Abstand von einer Minute. Die graue Linie stellt die Steigungsgerade dar. Die Formel zur Berechnung der Steigung für das hier dargestellte Well lautet: $y = 9,7133x - 412,81$, somit beträgt die Steigung für dieses Well 9,71 (eigene Abbildung).

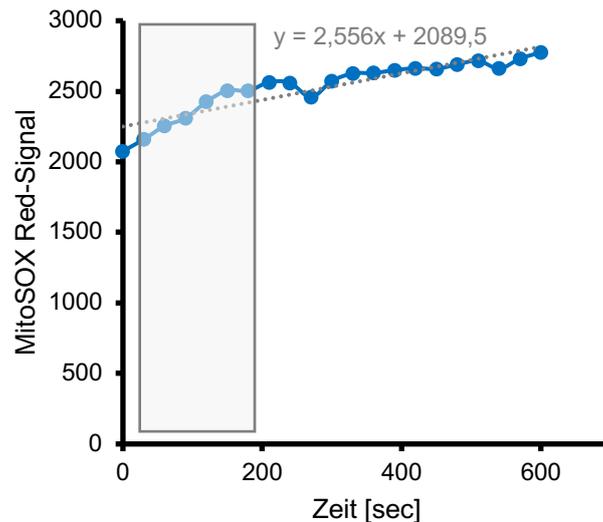


Abbildung 56 Exemplarischer Verlauf der Steigung des MitoSOX Red-Signals.

Aufgetragen wurde das MitoSOX Red-Signal gegen die Messzeit in Sekunden von einem Well mit 20.000 SH SY5Y Zellen. Gemessen wurde das MitoSOX Red-Signal über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 30 Sekunden. Zur Berechnung der Steigung wurde nur der Messzeitraum von null bis drei Minuten betrachtet (grauer Kasten), da danach eine Sättigung des MitoSOX Red-Signals zu beobachten war. Die Formel zur Berechnung der Steigung für das Zeitfenster von null bis drei Minuten für das hier dargestellte Well lautet: $y = 2,556x + 2089,5$, somit beträgt die Steigung für dieses Well 2,556 (eigene Abbildung).

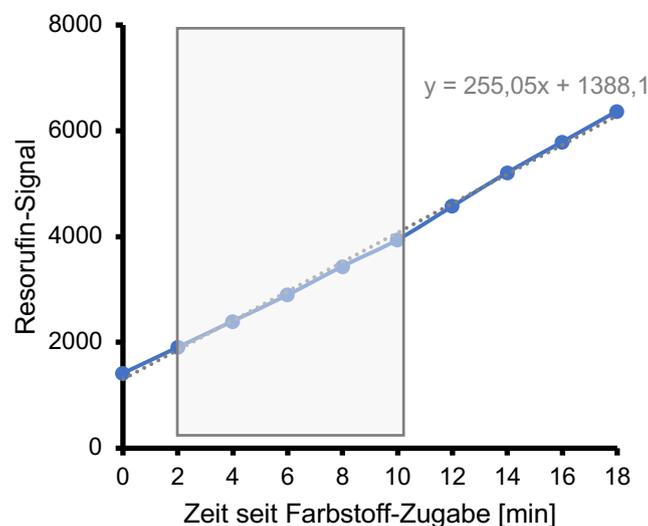


Abbildung 57 Exemplarischer Verlauf der Steigung des Resorufin-Signals.

Aufgetragen wurde das einheitslose Resorufin-Signal eines Wells mit 20.000 SH SY5Y Zellen gegen die Zeit seit der Zugabe der Amplex Red + HRP-Messlösung in Minuten. Gemessen wurde alle 2 Minuten über einen Messzeitraum von 18 Minuten. Die graue Linie stellt die Steigungsgerade dar. Zur Berechnung der Steigung wurde der Messzeitraum von zwei bis 10 Minuten betrachtet (grauer Kasten), da über diesen Zeitraum das Signal-Rausch-Verhältnis am höchsten war. Die Formel zur Berechnung der Steigung über den Zeitraum von zwei bis 10 Minuten für das hier dargestellte Well lautet: $y = 255,05x + 1388,1$, somit beträgt die Steigung für dieses Well 255. (eigene Abbildung).

9.6.2 Etablierung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung verschiedener RONS-Signale

Tabelle 24 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels H₂DCFDA.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen DCF-Signals über den Messzeitraum von 30 min normiert auf 0 Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Es wurden pro Well 10.000, 20.000 und 30.000 SH SY5Y Zellen ausgesät. Zur Ermittlung des Hintergrund-Signals wurden Wells ohne Zellen (0) mitgeführt. Das DCF-Signal der Zellen lag deutlich über dem des Hintergrund-Signals, so dass dieses vernachlässigt werden konnte. Die statistische Auswertung ergab einen linearen Anstieg mit steigender Zellzahl, so dass sich für 20.000 SH SY5Y Zellen pro Well für zukünftige Messungen entschieden wurde.

Rel. DCF-Signal/Zeit				
Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert	1,00	20,87	38,39	54,17
Standardabw.	0,41	3,57	6,17	5,52
Anzahl	24	24	24	24
Statistik			10.000 vs 20.000	20.000 vs 30.000
			<0,0001	<0,0001

Tabelle 25 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels MitoSOX Red.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen MitoSOX Red-Signals über den Messzeitraum von 3 min normiert auf 0 Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Es wurden pro Well 10.000, 20.000 und 30.000 SH SY5Y Zellen ausgesät. Zur Ermittlung des Hintergrund-Signals wurden Wells ohne Zellen (0) mitgeführt. Das Verhältnis des MitoSOX Red-Signals der Zellen bei 20.000 Zellen pro Well zum Hintergrund-Signal der Zell-freien Wells betrug 1:2,93, so dass sich für 20.000 SH SY5Y pro Well für zukünftige Messungen entschieden wurde.

Rel. MitoSOX Red-Signal/Zeit				
Zellzahl	0	10.000	20.000	30.000
Mittelwert	1,00	1,92	2,93	2,76
Standardabw.	1,10	0,83	1,20	0,96
Anzahl	22	23	24	24
Statistik		0 vs 10.000	10.000 vs 20.000	20.000 vs 30.000
		0,0189	0,0062	ns

Tabelle 26 Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Well für die Messung mittels Amplex Red.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Resorufin-Signals über den Messzeitraum von 2-10 min normiert auf 0 Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Es wurden pro Well 20.000, 25.000, 30.000 und 35.000 SH SY5Y Zellen ausgesät. Zur Ermittlung des Hintergrund-Signals wurden Wells ohne Zellen (0) mitgeführt. Die statistische Auswertung ergab einen linearen Anstieg des Resorufin-Signals mit steigender Zellzahl bis zu 30.000 Zellen/Well. Bereits bei 20.000 Zellen/Well lag das Resorufin-Signal der Zellen deutlich über dem Hintergrund-Signal, so dass sich für 20.000 SH SY5Y Zellen für zukünftige Messungen entschieden wurde.

Rel. Resorufin-Signal/Zeit					
Zellzahl	0	20.000	25.000	30.000	35.000
Mittelwert	1,00	5,77	8,43	8,88	9,589
Standardabw.	0,53	1,54	1,81	2,13	2,41
Anzahl	48	36	36	35	36
Statistik		0 vs 20.000	20.000 vs 25.000	25.000 vs 30.000	30.000 vs 35.000
		<0,0001	<0,0001	ns	ns

Tabelle 27 Verhältnis des Resorufin-Signals der SH SY5Y Zellen zum Hintergrund-Signal.

Es wurde die Steigung über verschiedene Zeiträume der Messung des Resorufin-Signals der SH SY5Y Zellen berechnet und durch die Steigung des Hintergrund-Signals dividiert. Es wurde der Messzeitraum von null bis zwei Minuten, von den Minuten zwei bis 10, 10 bis 18 min und für den gesamten Messzeitraum von 18 min betrachtet. Das Signal-Rausch-Verhältnis im Zeitraum von zwei bis 10 Minuten war am höchsten, so dass dieser Zeitraum zur Berechnung der Steigung des Resorufin-Signals verwendet wurde.

Messzeitraum	Signal Zellen/Hintergrund-Signal
0-2 min	1,19
2-10 min	1,50
10-18 min	1,12
0-18 min	1,40

9.6.3 Auswirkung der Inhibitoren auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells

Tabelle 28 Einfluss von Bacopaside II auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Resorufin-Signals Zell-freier Wells in Prozent, normiert auf das Resorufin-Signal der Zellen, welche mit 8,25 mM Glucose für 24 h behandelt wurden, nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 h (**A**) oder 48 h (**B**) in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die Kontrolle (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Die Wells wurden nach der Behandlung mit den verschiedenen Glucose-Konzentrationen 30 min vor der Messung des Resorufin-Signals mit 10 µM Bacopaside II, einem AQP1-Inhibitor, oder der Kontroll-Lösung (1 % DMSO) behandelt. Der AQP1-Inhibitor hatte keinen Effekt auf das Hintergrund-Signal.

A	24 h					
	2 mM		8,25 mM		16,5 mM	
Glucose-Konzentration	Kontrolle	Bacopaside II	Kontrolle	Bacopaside II	Kontrolle	Bacopaside II
Mittelwert	11,8	11,3	13,7	12,3	14,9	13,2
Standardabw.	8,0	7,2	6,4	5,8	0,8	1,2
Anzahl	18	18	30	30	8	9
Statistik		ns		ns		ns

B	48 h					
	2 mM		8,25 mM		16,5 mM	
Glucose-Konzentration	Kontrolle	Bacopaside II	Kontrolle	Bacopaside II	Kontrolle	Bacopaside II
Mittelwert	22,65	18,28	27,79	24,23	25,00	20,07
Standardabw.	9,52	4,53	12,51	11,18	10,46	8,14
Anzahl	6	6	6	6	6	6
Statistik		ns		ns		ns

Tabelle 29 Einfluss von DDC und ML090 auf das Resorufin-Signal Zell-freier Wells.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Resorufin-Signals Zell-freier Wells in Prozent sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die jeweilige Kontrolle (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Die Zell-freien Wells wurden für 30 min mit DMEM (0,1 % FCS, 8,25 mM), dem SOD3-Inhibitor DDC in einer Endkonzentration von 10 µM oder der Lösungsmittel-Kontrolle (H₂O dest.) oder dem NOX5-Inhibitor ML090 in einer Endkonzentration von 100 nM oder der Lösungsmittel-Kontrolle (0,01 % DMSO) behandelt. Beide Inhibitoren hatten einen signifikanten Effekt auf das Hintergrund-Signal.

	Kontrolle	DDC	Kontrolle	ML-090
Mittelwert	38,51	101,88	28,39	33,43
Standardabw.	19,91	58,28	6,50	4,22
Anzahl	24	24	24	24
Statistik		<0,001		0,0028

9.6.4 Auswirkung der Behandlungsdauer auf die Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung verschiedener RONS

Tabelle 30 Einfluss der Behandlungsdauer auf das MitoSOX Red-Signal.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des einheitslosen relativen MitoSOX Red-Signals der SH SY5Y Zellen, normiert auf den jeweiligen Mittelwert aller Wells einer Mikrotiterplatte pro Messtag, nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung zwischen 24 und 48 h (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

relatives MitoSOX Red-Signal [einheitslos]						
Glucose	2 mM		8,25 mM		16,5 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Mittelwert	0,93	0,97	1,21	1,05	1,06	0,99
Standardabw.	0,37	0,29	0,39	0,36	0,46	0,27
Anzahl	68	52	67	56	68	52
Statistik		ns		0,0202		ns

Tabelle 31 Einfluss der Behandlungsdauer auf das DCF-Signal.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des einheitslosen relativen DCF-Signals der SH SY5Y Zellen, normiert auf den jeweiligen Mittelwert aller Wells einer Mikrotiterplatte pro Messtag, nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung zwischen 24 und 48 h (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

relatives DCF-Signal [einheitslos]						
Glucose	2 mM		8,25 mM		16,5 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Mittelwert	1,11	0,84	1,06	1,19	0,90	1,08
Standardabw.	0,16	0,15	0,12	0,14	0,05	0,07
Anzahl	12,00	12,00	24,00	12,00	12,00	12,00
Statistik		<0,001		0,0122		<0,001

Tabelle 32 Einfluss der Behandlungsdauer auf das Resorufin-Signal.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des einheitslosen relativen Resorufin-Signals der SH SY5Y Zellen, normiert auf den jeweiligen Mittelwert aller Wells einer Mikrotiterplatte pro Messtag, nach der Behandlung mit 2, 8,25 oder 16,5 mM Glucose für 24 oder 48 h in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung zwischen 24 und 48 h (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

relatives Resorufin-Signal [einheitslos]						
Glucose	2 mM		8,25 mM		16,5 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Mittelwert	1,05	0,84	1,00	1,12	0,96	1,04
Standardabw.	0,15	0,27	0,16	0,20	0,19	0,16
Anzahl	36	40	73	40	36	40
Statistik		<0,001		0,0018		ns

9.6.5. Identifizierung des Beitrags verschiedener Komponenten des „RONS-Netzwerks“

Tabelle 33 Einfluss von cPTIO und L-NAME auf das DCF-Signal Zell-freier Wells.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des DCF-Signals in Prozent nach der Behandlung der Zell-freien Wells, normiert auf das relative DCF-Signal der Zellen, für 30 min mit DMEM (0,1 % FCS, 8,25 mM) und 20 mM des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME, 100 µM von cPTIO, welcher NO wegfängt, der Lösungsmittel-Kontrolle (Hank´s Puffer (8 mM)) oder der Kombination von L-NAME und cPTIO sowie die Anzahl der gemessenen Wells und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen die Kontrolle (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Beide Stoffe hatten einen signifikanten Effekt auf das Hintergrund-Signal des Fluoreszenzfarbstoffes H₂DCFDA, so dass der Anteil von NO am intrazellulären RONS-Signal nicht spezifisch bestimmt werden konnte.

	Kontrolle	cPTIO	L-NAME	L-NAME+cPTIO
Mittelwert	2,01	9,73	-0,08	-0,18
Standardabw.	1,16	4,10	0,13	0,19
Anzahl	24	24	24	24
Statistik		<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle 34 Relativer Proteingehalt der SOD3 nach der Behandlung mit 2, 8,25 und 16,5 mM Glucose für 24 und 48 h.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Proteingehalts der SOD3 in den SH SY5Y Zellen in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose für 24 h, bestimmt mittels ELISA sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 8,25 mM Glucose für 24 und 48 h (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben). Es wurde auf den Mittelwert der Behandlungsgruppe 8,25 mM Glucose für 24 h normiert.

SOD3						
Inkubationszeit	24 h			48 h		
Glucose	2 mM	8,25 mM	16,5 mM	2 mM	8,25 mM	16,5 mM
Mittelwert	101,08	100,00	96,10	93,27	99,06	96,88
Standardabw.	9,64	11,48	11,55	11,50	12,31	15,71
Anzahl	22	22	24	22	23	24
Statistik	ns		ns	ns		ns

9.6.6 Einfluss von Glucose-Entzug auf RONS

Tabelle 35 Effekt eines Glucose-Entzugs in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer auf das intrazelluläre RONS-Signal.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des intrazellulären RONS-Signals der SH SY5Y Zellen gemessen mittels H2DCFDA, nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose für „0“, 10,20,60 oder 120 min in DMEM (0,1 % FCS) normiert auf 8,25 mM Glucose für „0“ min sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 8,25 mM (zweiseitiger t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Inkubationszeit	"0" min		10 min		20 min		60 min		120 min	
	8,25 mM	0 mM	8,25 mM	0 mM	8,25 mM	0 mM	8,25 mM	0 mM	8,25 mM	0 mM
Mittelwert	95,5	91,4	99,6	90,5	97,7	85,1	105,5	87,7	96,3	76,1
Standardabw.	10,9	12,6	9,0	9,4	11,8	11,9	10,7	17,1	16,3	13,3
Anzahl	24	24	24	24	46	48	20	24	24	23
Statistik		ns		0,0015		<0,001		<0,001		<0,001

Tabelle 36 Einfluss des Glucose-Entzugs auf die mitochondriale Superoxid-Produktion.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des mitochondrialen Superoxids der SH SY5Y Zellen in Prozent normiert auf 8,25 mM Glucose, gemessen mittels MitoSOX Red, nach der Behandlung mit 8,25 oder 0 mM Glucose für 20 min in DMEM (0,1 % FCS) sowie die Anzahl der gemessenen Wells (n) und der p-Wert der statistischen Auswertung gegen 8,25 mM (zweiseitiger t-Test gegen unabhängige Stichproben).

Inkubationszeit	20 min	
Glucose	8,25 mM	0 mM
Mittelwert	100,00	95,55
Standardabw.	13,51	11,54
Anzahl	6	6
Statistik		ns

10. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uli Müller danken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Vielen Dank für die umfassende fachliche Betreuung und die persönliche Unterstützung in den vergangenen drei Jahren und den anregenden Austausch über dieses komplexe Thema, ohne welchen eine Bearbeitung sich als deutlich schwerer herausgestellt hätte. Danke für die Möglichkeit während meiner Promotionszeit die Erfahrung der Veröffentlichung grundlegender Forschung sammeln zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Bruce Morgan danken für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe Biochemie und vor allem dem wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Jannik Zimmermann für die schnelle Unterstützung und den Austausch bei auftretenden Problemen, wenn unsere Geräte bei wichtigen Messungen mal nicht funktioniert haben.

Ich möchte mich auch bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer und vor allem bei ihrer Mitarbeiterin Dr. Jessica Hoppstädter bedanken, dass sie mir die Nutzung ihrer Labore und des Seahorse *Analyzers* ermöglicht haben, dessen Ergebnisse meine Arbeit deutlich vorangebracht haben.

Vielen Dank an alle Doktoranden der Arbeitsgruppe der Pharmazeutischen Biologie für die Unterstützung beim Umgang mit dem Seahorse *Analyzer*.

Meinem ehemaligen Lehrer Herrn Dr. Markus Henkel möchte ich danken für das Korrektur lesen meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe Zoologie/ Physiologie für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die schöne und lustige Arbeitsatmosphäre, so dass jeder Tag trotz des Testens von sich als komplizierter als gedacht herausstellender neuer Methoden oder ernüchternder Ergebnisse sich halb so schlimm anfühlte. Vielen Dank für das Mitfeiern und die Unterstützung bei kleineren oder größeren Meilensteinen während meiner Promotionszeit.

Vielen Dank an unsere technischen Assistentinnen Iris Fuchs und Marion Schwarz für die Einführung in neue Methoden und die Unterstützung mit euerem großen Erfahrungsschatz, der mir bei der Etablierung vieler neuer Methoden sehr

weitergeholfen hat. Vielen Dank an Dr. Eva Steinmetz für die große Hilfe bei der Entwicklung methodischer Protokolle, der Lösung auftretender Probleme und für die persönliche Unterstützung an herausfordernden Tagen während meiner Promotionszeit. Ein großer Dank an Dr. Janine Mett für die Unterstützung und dem Mitwirken bei der Umsetzung des Projekts „Paper“ in so kurzer Zeit und den wissenschaftlichen Austausch, was ein großer Mehrwert für meine Arbeit war.

Danke an alle, die während meiner Promotionszeit Mitglieder der Arbeitsgruppe waren, die diese Zeit ganz besonders gemacht haben. Ein Dankeschön geht an unsere Master-Studentin Anika Pietzko für die schöne Zusammenarbeit während meines letzten Jahres meiner Promotion und die guten Gespräche sowohl fachlich als auch persönlich.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinem Freund Nils bedanken, dass er trotz der Entfernung unter der Woche mir immer unterstützend zur Seite stand und mir den Rücken gestärkt hat mit liebevollen motivierenden Worten. Danke das du diese Zeit mit mir durchgehalten hast und alle meine Launen ertragen, Meilensteine mit mir gefeiert und immer an mich geglaubt hast, dass ich alles erreichen kann.

Ein herzliches Dankeschön an meine Familie, die mir zu jeder Zeit unterstützend und mit einem offenen Ohr zur Seite standen. Vielen Dank vor allem an meine Eltern, die mir alle meine Pläne während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit ermöglicht haben und mit Rat und Tat mich unterstützt haben.

11. Lebenslauf und akademischer Werdegang

Name: Lys Kronenberger
Geburtsdatum: 17.07.1998
Geburtsort: Frankfurt am Main

Wissenschaftliche Publikationen

03/2024 **Metabolic Profiling of SH-SY5Y and Neuro2A Cells in Relation to Fetal Calf Serum (FCS) Concentration in Culture Media.**
 Autoren: Kronenberger, L.; Mett, J.; Hoppstädter, J.; Müller, U.
Veröffentlicht: Metabolites **2024**, *14*, 188.
<https://doi.org/10.3390/metabo14040188>

Akademischer Bildungsweg

Seit 10/2021 **Promotion**
 AG Zoologie/ Physiologie
 Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
 Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken

10/2021 – 09/2024 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 AG Zoologie/ Physiologie
 Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
 Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken

10/2019 – 08/2021 **Master of Science, Human- und Molekularbiologie**
 Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken

- Abschlussnote: 1,5

10/2017 – 09/2019 **Bachelor of Science, Biologie**
 Universität Bremen, 28359 Bremen

- Abschlussnote: 2,09

10/2016 – 09/2017 **Bachelor of Science, Biowissenschaften**
 Johann-Wolfgang-Goethe Universität,
 60629 Frankfurt am Main

Schulische Bildung

2013 – 2016

Allgemeine Hochschulreife
Claus-von-Stauffenberg-Schule,
Mainzer Str. 16, 63110 Rodgau

- Abschlussnote: 2,4