

Aus der Abteilung für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin
(Leiter Univ. - Prof. Dr. Matthias Heckmann)
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. Holger Lode)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Einfluss von Steroidhormonen auf die Auswirkungen von Sauerstofftoxizität im
Zellkulturmodell unreifer Gliazellen**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Wissenschaften in der Medizin

(Dr. rer. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2018

vorgelegt von:
Stephanie Hübner
geb. am: 28.11.1983
in: Dresden

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Matthias Heckmann

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Seminarraum P01.37

Tag der Disputation: 14.05.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
I. Abkürzungsverzeichnis	6
II. Zusammenfassung	9
1. Einleitung	11
1.1. Apoptose und Nekrose.....	11
1.2. Neurologische Konsequenzen der Frühgeburt	12
1.3. Feto-plazentare Einheit und Frühgeburt	13
1.4. Schädigungsmodelle	16
1.5. Unreife Gliazellen.....	18
1.6. Intrazelluläre Signaltransduktion.....	20
1.7. E2-vermittelte Protektion in Modellen	23
1.8. klinische Vorstudien	26
1.9. Fetalzonensteroidoide und Rezeptorpromiskuität	27
1.10. Hypothese und Fragestellung	30
2. Material und Methoden	32
2.1. Material.....	32
2.2. Methoden	32
2.2.1. Isolation und Kultivierung von PDGFR α^+ -Zellen.....	32
2.2.2. OLN-93 Zellen	34
2.2.3. C6 Zellen	36
2.2.4. Vorbehandlung und Schädigung der Zellen	37
2.2.5. FACS-Analyse.....	39
2.2.6. Vitalitätsassays	41
2.2.7. (Immun-)Fluoreszenzfärbung	43
2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.9. Western Blot	48
2.2.10. Dot Blot (Multiplex ELISA Array)	55

2.2.11. Statistische Auswertung	61
3. Ergebnisse	62
3.1. Charakterisierung der verwendeten Zellen.....	62
3.2. Einfluss von BSO, Zeit und Zelldichte und auf Hyperoxie-induzierten Zelltod.....	64
3.3. Nachweis der Art des Zelltods.....	64
3.4. Effekt von E2 auf Hyperoxie-induzierten Zelltod.....	66
3.5. Effekt von ER-Antagonisten auf E2-vermittelte Protektion.....	68
3.6. Effekt von Fetalzonensteroiden auf Hyperoxie-induzierten Zelltod	70
3.7. Effekt von ER- und AR-Antagonisten auf DHEA-vermittelte Protektion	71
3.8. Auswirkung der Inhibition von Aromatasen auf Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion.....	74
3.9. Einfluss der Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden auf die Protektion.....	76
3.10. Die relativen Rezeptordichte unter Hyperoxie und Steroideinfluss	78
3.11. Aktivierung des PI3K- und MAPK-Signaltransduktionsweges durch Steroidbehandlungen	81
4. Diskussion	89
4.1. Protektion von E2 wird durch zelltypabhängige Rezeptoren vermittelt.....	89
4.2. Fetalzonensteroiden induzieren dosisabhängig Protektion.....	91
4.3. Intrazelluläre Aromatasen verändern die Protektion	92
4.4. Zelltypabhängiges Auftreten von Synergien durch Kombinationsbehandlungen	93
4.5. Auswirkungen von Hyperoxie und Steroidbehandlung auf die Rezeptordichte	95
4.6. Phosphorylierungsstatus von intrazellulären Signal-Molekülen	97
4.7. Stärken und Grenzen	99
4.8. Klinische Relevanz	101
4.9. Schlussfolgerung und Ausblick	102
5. Literaturverzeichnis.....	104
III. Abbildungsverzeichnis	119

IV. Tabellenverzeichnis	120
V. Anhang	121
2.1. Material.....	121
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	121
2.1.2. Kits.....	125
2.1.3. Antikörper.....	125
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	126
2.1.5. Geräte.....	128
2.1.6. Software.....	130
2.1.7. Medium, Puffer und Lösungen	130
V.I. Ergänzende Abbildungen	136

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
16OH-DHEA	5-Androsten-3 β , 16 α -diol-17-on; 16 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron
3 β - und 17 β -HSD	3 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3 β -OH-5-en-Steroide	3 β -Hydroxy-5-en-Steroide
A	Ampere
Adiol	5-Androsten-3 β , 17 β -diol; Androstendiol
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK α	AMP-aktivierte Protein-Kinase α
Androstentetrol	5-Androsten-3 β , 16 α , 17 β , 18-tetrol
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i> , einfache Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
bFGF	<i>fibroblast growth factor-basic</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Albumin, Fraktion V
BSO	D,L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine
C	Kohlenstoff
CDX	Bicalutamide/ Casodex
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CNPase	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochloride
DES	Diethylstilbestrol
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron- Sulfat
DHS	<i>Donor Horse Serum</i> , Pferdeserum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrol
EC ₅₀	<i>median effective concentration</i> , Median der wirksamen Konzentration
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ER	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
ERE	<i>estrogen response elements</i> , Östrogen-responsive Elemente

ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase</i> , extrazellulär signalregulierte Kinase
EtOH	Ethanol
Exe	Exemestane
F-12K Medium	<i>Ham's F-12K (Kaighn's) Medium</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
G1	(±)-1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanon
G36	(±)-(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-8-(1-methylethyl)-3H-cyclopenta[c]quinolin
GalC	Galactocerebrosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
GPER	<i>G protein-coupled estrogen receptor</i> , G Protein-gekoppelter Östrogen-Rezeptor
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3β
h	Stunden
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
Hoechst	Hoechst 33342
HSA	Humanes Serumalbumin
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	ICI 182,780 (Fulvestrant)
IF	Immunfluoreszenz
IL-6	Interleukin 6
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , c-Jun N-terminale Kinase
K _d	Dissoziationskonstante/ Bindungsaffinität
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
m	Meter
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting method</i> , Magnet-aktivierte Zellsortierung
MAPK	Mitogen-aktiviertes Protein-Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
min	Minuten
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
mTORC	mTor-Komplex
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NG2	<i>Neural/Glial Antigen 2</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i> , Ziegen Serum

O₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OGD	<i>glucose-oxygen deprivation</i> , Glucose-Sauerstoff-Deprivation
OL	Oligodendrozyt
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cell</i>
p70S6K	S6 ribosomales Protein-Kinase
PaO₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphaht-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFRα+	<i>Platelet-derived growth factor receptor α-positiv</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin
PRAS40	40kDa Prolinreiches Akt-Substrat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S6RP	S6 ribosomales Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i> , selektive Östrogenrezeptormodulator
SIN-1	3-(4-morpholinyl)-sydnonimine
SI-Präfixe k,m,μ,n,p	Kilo (10^3), Milli (10^{-3}), Mikro (10^{-6}), Nano (10^{-9}), Pico (10^{-12})
SRY	<i>sex-determining region Y</i>
SSP	Staurosporin
SSW	Schwangerschaftswoche
T₃	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,3% Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem
β-ME	β -Mercaptoethanol

II. Zusammenfassung

Die Unreife des Zentralnervensystems (ZNS) bei Neugeborenen, aber besonders bei Frühgeborenen, führt zur Anfälligkeit für Schädigungen des ZNS. Auslöser neurologischer Entwicklungsstörungen bei Frühgeborenen sind daher neben der Unreife selbst vor allem Hyperoxie, Hypoxie-Ischämie und Infektionen. In der Fetalzone der fetalen Nebennierenrinde werden Fetalzonensteroiden (hauptsächlich Dehydroepiandrosteron [DHEA]) gebildet, welche in der Plazenta für die Synthese der verschiedenen Östrogene notwendig sind. Die Frühgeburt geht mit dem Verlust dieser „feto-plazentaren Einheit“ einher und führt damit zu einem drastischen Absinken von Östrogenen und Progesteron im Frühgeborenen um den Faktor 100. Bisher wurde der Tatsache, dass die Fetalzonensteroiden in hohen Konzentrationen bis zum Zeitpunkt der reifen Geburt weiter synthetisiert werden jedoch kaum Beachtung geschenkt. Da klinische Vorstudien zur Substitution von Estradiol (E2) und Progesteron bei Frühgeborenen keine eindeutigen Verbesserungen des neurologischen Outcomes zeigten, stellte sich die Frage, ob E2 dann noch protektiv wirken kann, wenn Fetalzonensteroiden ebenfalls anwesend sind.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde das Schädigungsmodell der Hyperoxie bei drei verschiedenen Typen unreifer Gliazellen verwendet. Dafür wurden zuerst die Rezeptoren bestimmt, die an der E2-vermittelten Protektion bei Hyperoxie-induziertem Zelltod beteiligt sind. Die am häufigsten vorkommenden Vertreter der Fetalzonensteroiden DHEA, 16 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron (16OH-DHEA) und Androstendiol (Adiol) wurden untersucht, ob sie wie E2 ebenfalls protektiv wirken. Am Beispiel von DHEA wurden die an der Protektion beteiligten Rezeptoren untersucht. Da intrazelluläre Aromatasen die Fetalzonensteroiden in potentere Östrogene umwandeln können, wurde das Ausmaß der Protektion nach Inhibition der Aromatasen untersucht. Die Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen wurden dann gegen die Kombination von E2 und Fetalzonensteroid in Bezug auf das Ausmaß der Protektion untersucht. Zusätzlich wurden genomische und nicht-genomische Aspekte untersucht.

Bei OLN-93 Zellen (unreife Oligodendrozyten [OL], Ratte), *Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha* positive (PDGFR α^+) Primärzellen (unreife OL, Maus) und C6 Zellen (unreife Astrozyten, Ratte) vermittelten klassische Östrogenrezeptoren (ER) die Protektion durch E2. In C6 Zellen waren zusätzlich nicht-klassische ER beteiligt. Die Fetalzonensteroiden DHEA, 16OH-DHEA und Adiol induzierten dosisabhängig Protektion bei allen Zelltypen. Der Effekt von DHEA wurde dabei zelltypabhängig über klassische ERs und/oder den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Die Inhibition von Aromatasen führte in C6 Zellen bei

16OH-DHEA zum Verlust der protektiven Eigenschaften. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der Aromatasen in OLN-93 Zellen tendenziell zu einer Steigerung der Protektion aller Fetalzonensteroiden. In den PDGFR α^+ Primärzellen wurden keine Aromatasen bzw. deren Aktivität nachgewiesen. Die Kombinationsbehandlung mit E2 und Fetalzonensteroid führte bei OLN-93 Zellen zu einem synergistischen Effekt gegenüber den Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen. Das steht im Kontrast zu C6 und PDGFR α^+ Zellen, wo die Kombinationsbehandlung keine synergistischen Effekte gegenüber den Einzelbehandlungen aufwies. In C6 und OLN-93 Zellen konnten zudem genomische und nicht-genomische Effekte von E2, sowie genomische Effekte von DHEA nachgewiesen werden.

Während der Schutz vor apoptotischen Zelltod durch E2 in Frühgeborenen-Modellen vielfach beschrieben worden ist, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch die Fetalzonensteroiden in diesen Modellen zu protektiven Effekten führen. Die zelltypspezifische Reaktion auf die Fetalzonensteroiden war dabei von der Wirkstärke der Bindung an die ERs und den AR, aber auch vom Vorkommen intrazellulärer Enzyme abhängig. Bei C6 und PDGFR α^+ Zellen führte die Kombination von E2 und Fetalzonensteroid nicht zu synergistischen Effekten, da die E2- und Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion hauptsächlich über die klassischen ERs wirkte, was wahrscheinlich zu einer Sättigung des am ER erzeugten Mechanismus führt. Das steht im Kontrast zu den OLN-93 Zellen, wo die Kombinationsbehandlung zu Synergien führte. Hier scheint DHEA gegenüber dem AR eine genauso ausgeprägte Wirkstärke zu besitzen wie E2 gegenüber den klassischen ERs, so dass die Protektion durch E2 über klassische ERs und die der Fetalzonensteroiden über den AR ablaufen könnte. Die Ergebnisse zu genomischen und nicht-genomischen Effekten bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die Frühgeburt erzeugt ein einzigartiges hormonelles Milieu, welches so nur beim Menschen und anderen höheren Primaten vorkommt. Die hohen Konzentrationen an Fetalzonensteroiden in Frühgeborenen bis zum Zeitpunkt der reifen Geburt könnten zu einer permanenten Aktivierung von klassischen ERs führen, was sich bereits schützend auf das Gehirn von Frühgeborenen auswirken könnte. Da Fetalzonensteroiden im μM -Bereich im Frühgeborenen akkumulieren, könnte eine Sättigung durch Bindungskonkurrenz am ER bei E2-Substitution stattfinden und so den klinischen Effekt einer Substitution von E2 bei Frühgeborenen abschwächen. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die derzeit verwendeten Frühgeborenen-Modelle eine solide Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze bieten, da sie die großen Mengen an Fetalzonensteroiden nicht berücksichtigen.

1. Einleitung

1.1. Apoptose und Nekrose

Es sind mehrere Formen des Zelltods bekannt, jedoch sind Apoptose und Nekrose die beiden größten Vertreter [1]. Die Nekrose ist ein passiver, aber akuter Vorgang, bei dem es nach sehr schweren Stresssituationen oder hohen Konzentrationen toxischer Agenzien zu schnellem Adenosintriphosphat (ATP)-Verlust und Zusammenbruch der Membranfunktion kommt. Morphologisch ist Nekrose charakterisiert durch ein Anschwellen der Zellen, gefolgt von Ruptur der Zellmembran und Freisetzung der Zellorganellen ins Zwischengewebe [2]. Durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine kommt es zu einer Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe und damit zur Beeinträchtigung der Nachbarzellen [3].

Im Gegensatz dazu ist die Apoptose ein aktiver Prozess, der nach einem konservierten Programm abläuft, weshalb dieser Prozess auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird. Durch den Vorgang der Apoptose wird das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod im Organismus aufrechterhalten. Sie spielt damit eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung und bei der Regulierung der physiologischen Regeneration, z.B. durch Entsorgung alter oder geschädigter Zellen. Die Apoptose wird in drei Phasen unterteilt: Initialphase, „*point of no return*“ und Degradation. Ist der *point of no return* überschritten, kann das Fortschreiten des Zelltodes nicht mehr verhindert werden. Apoptose führt so innerhalb weniger Stunden zum Schrumpfen der Zelle und des Zellkerns, zur Chromatinkondensation, zur DNA-Fragmentierung, zum *Crosslinking* von Proteinen und zur Bildung von Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*), welche mittels Phagozytose durch die Nachbarzellen entfernt werden [4].

Während des apoptotischen Programms bleibt zu Beginn die Integrität der Zellmembran erhalten und es kommt nur zu wenigen Veränderungen an der Zellmembran. So wird beispielsweise Phosphatidylserin (PS) vom Zellinneren nach außen verlagert. Zentrales Ereignis auf molekularer Ebene ist jedoch die Aktivierung von Caspasen (*cysteine aspartate-specific proteases*). Sie liegen in den Zellen als Proenzyme (Procaspasen) vor und werden durch Proteolyse in die aktive Form überführt. Dadurch werden dann kaskadenartig weitere Procaspasen aktiviert, was zum kontrollierten Abbau der zellulärer Strukturen führt [5]. Die Familie der Caspasen lässt sich entsprechend ihrer Funktion in zwei verschiedene Gruppen unterteilen: Initiatorcaspasen (Caspasen-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspasen-3, -6, -7). Während die Initiatorcaspasen direkt in Folge des initialen proapoptotischen Signals aktiviert werden, werden nach Überschreiten des *point of no return* in der Regel Effektorcaspasen aktiviert [6].

1.2. Neurologische Konsequenzen der Frühgeburt

Frühgeburt ist die Hauptursache für Sterblichkeit von Neugeborenen und die zweithäufigste Ursache von Kindersterblichkeit [7]. Frühgeburt bedeutet, dass die Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW) stattfindet. Mit den Möglichkeiten der Intensivmedizin und der damit verbundenen erhöhten Überlebenschancen, steigt jedoch auch das Risiko verschiedener Komplikationen mit lebenslangen Konsequenzen für Gesundheit, Wachstum und der neurologischen Entwicklung [8]. Diese Komplikationen werden durch das unreife Organsystem verursacht, welches noch nicht das Leben in der extrauterinen Umgebung ausreichend unterstützen kann. So sind Gehirn, Lunge, Immunsystem, Haut, Augen und Gastrointestinal-System noch unreif und entsprechend fragil. Die Häufigkeit von akuten Komplikationen bei Neugeborenen und die Mortalitätsrate sinken mit zunehmenden Schwangerschaftsalter [9].

Die Unreife des Zentralnervensystems (ZNS) bei Neugeborenen, aber besonders bei Frühgeborenen, führt zur Anfälligkeit für Schädigungen des ZNS. Im letzten Trimester (24. – 36. SSW) finden wichtige Entwicklungsprozesse im Gehirn des Fetus statt. So werden Synapsen zwischen den Neuronen gebildet und die Oligodendrozyten (OLs) beginnen in die subkortikalen Regionen zu migrieren und dabei zu myelinisierenden OLs zu reifen. Die myelinisierenden OLs sorgen für die elektrische Isolation von Nervenzellen in der weißen Substanz und sind daher für die schnelle Reizweiterleitung (saltatorische Erregungsleitung) von Bedeutung. Dieser wichtige Zeitraum der Gehirnentwicklung wird daher als „*Brain Growth Spurt*“ bezeichnet [10]. Des Weiteren ist die Regulation des zerebralen Blutflusses bei Frühgeborenen aufgrund des unreifen Gefäßsystems eingeschränkt. Diese Faktoren führen dazu, dass die noch unreife weiße Substanz rund um die Ventrikel und die Region der stark vaskularisierten germinalen Matrix besonders empfindlich für Schädigungen sind. Die häufigsten Schädigungen der weißen Substanz (*White Matter Injuries*) sind daher periventrikuläre Leukomalazie (PVL), intraventrikuläre und intraparenchymale Blutungen [11]. Bei intraventrikulären Blutungen kommt es zur Einblutung in die germinale Matrix unterhalb der Seitenventrikel. Schwankungen im Blutdruck, veränderte Osmolaritäten im Blut und erhöhtes Auftreten von freien Sauerstoff-Radikalen sind an der Pathogenese beteiligt. Intraparenchymale Blutungen werden durch germinale Blutungen verursacht, welche den venösen Rückfluss blockieren und so zu einer venösen Ischämie führen. Frühgeborene mit leichten intraventrikulären und intraparenchymalen Blutungen haben ein geringeres Risiko neurologische Entwicklungsstörungen zu erleiden als die Frühgeborenen, die intraventrikuläre Blutungen mit Ventrikeldilatation, post-hämorrhagischen Hydrozephalus oder stärkere

intraparenchymalen Blutungen entwickeln [11]. Ungefähr 11% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von unter 1.500g entwickeln intraventrikuläre Blutungen mit Ventrikeldilatation oder intraparenchymalen Blutungen [9, 11].

Als PVL bezeichnet man eine Schädigung der weißen Substanz, welche aus einer fokalen und einer diffusen Komponente besteht. Die fokale Komponente ist durch eine lokale Nekrose aller Zelltypen mit anschließender Zystenbildung charakterisiert, während die diffuse Komponente durch massive Apoptose von unreifen OLs gekennzeichnet ist [12]. Je unreifer diese OLs sind, desto empfindlicher sind sie gegenüber Schädigungen [13]. Dabei wird der Zelltod durch freie Radikale, Excitotoxizität und Mikroglia-Aktivierung verursacht, aber auch die intrinsische Vulnerabilität der unreifen OLs, zerebrale Ischämien und systemische Infektionen begünstigen die Entstehung einer PVL [12]. Zusätzlich ist O₂, welcher häufig in der Neugeborenen-Intensivmedizin verwendet wird, epidemiologisch mit der PVL assoziiert [14]. Je stärker die Zystenbildung bei einer PVL ist, desto höher ist das Risiko für neurologische Entwicklungsstörungen [15]. Bei einer PVL mit Zystenbildung sowie bei intraparenchymalen Blutungen kommt es zu einer erhöhten Prävalenz motorischer Defizite, welche als Zerebralparesen bezeichnet werden [16]. Ungefähr 25-50% der überlebenden Frühgeborenen weisen später kognitive, Aufmerksamkeits-, Verhaltens- und Sozialisierungsdefizite auf, welche die Lebensqualität stark beeinträchtigen können [11, 17]. Die Anzahl an Frühgeburten steigt in den meisten Ländern an [18] und macht es notwendig effektivere Präventions- sowie Behandlungsstrategien zu entwickeln.

1.3. Feto-plazentare Einheit und Frühgeburt

Die fetale Nebennierenrinde ist ein aktives endokrines Organ und hat eine einzigartige strukturelle und funktionelle Organisation. Ein spezialisiertes Kompartiment der fetalen Nebennierenrinde wird als Fetalzone bezeichnet und kommt so nur beim Menschen und anderen höheren Primaten vor. Die Fetalzone wächst während der Reifung des Fetus bis zum Zeitpunkt der reifen Geburt und entwickelt sich kurz nach der Geburt zügig zurück. Die fetale Nebennierenrinde produziert Steroidhormone, welche die intrauterine Homöostase und Reifung des Fetus regulieren [19, 20].

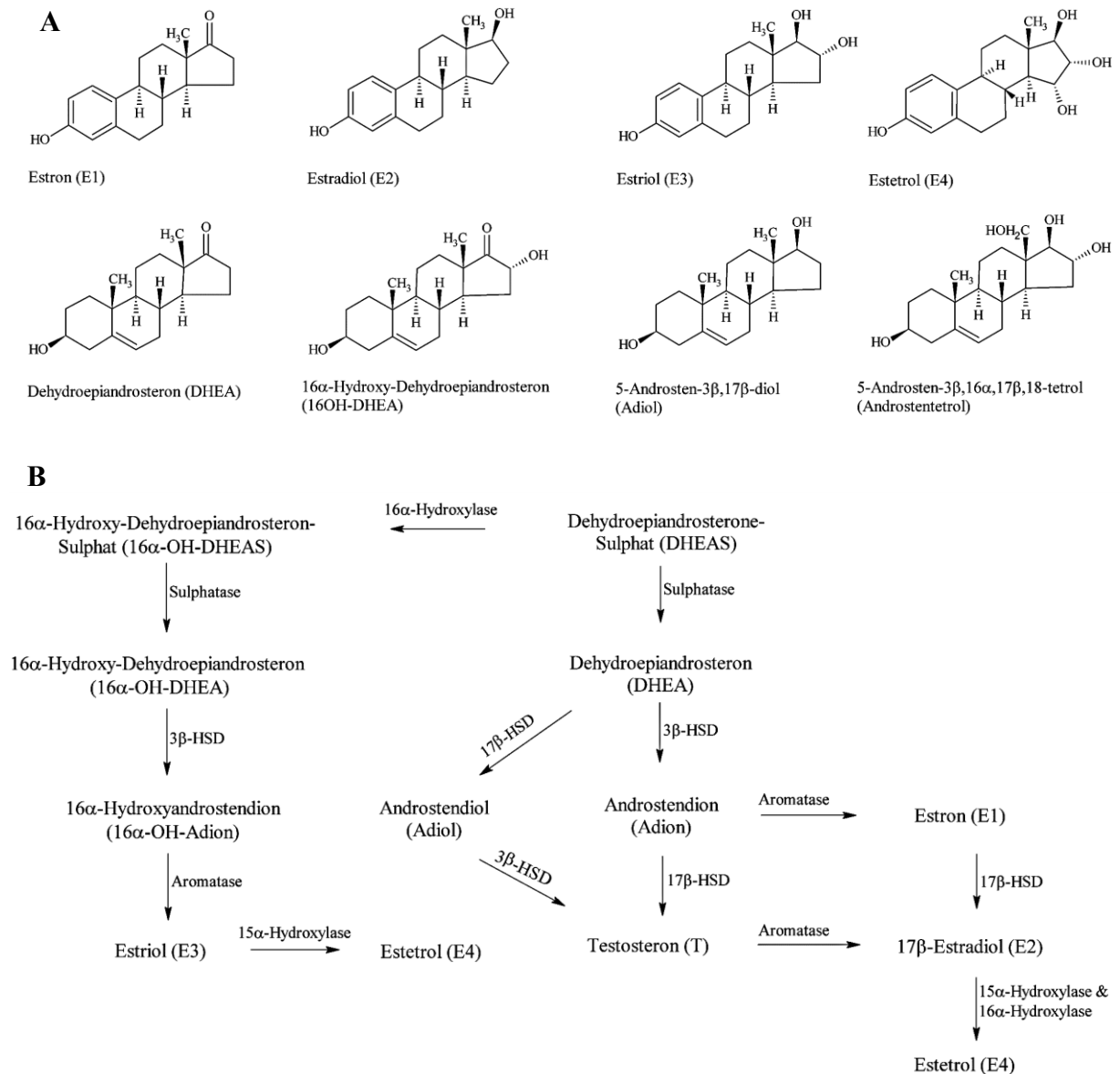
Diczfalusy *et al.* haben herausgefunden, dass diese große Mengen an Steroidhormonen aus der Fetalzone in der Plazenta für die Synthese der verschiedenen Östrogene verwendet werden und entwickelten daraus die Bezeichnung „feto-plazentare Einheit“ [21]. Während der Schwangerschaft werden die Östrogene Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3) und

Estetrol (E4) synthetisiert (Abbildung 1A) [22]. Da der Plazenta das Cytochrom P450-Enzym CYP17 (17 α -Hydroxylase) fehlt, ist die *de novo* Synthese der Östrogene aus Acetat und Cholesterin nicht möglich und damit abhängig von den Steroidhormonen aus der fetalen und mütterlichen Nebennierenrinde [23].

Das häufigste Steroidhormon der Fetalzone ist Dehydroepiandrosteron (DHEA)-Sulfat (DHEAS). Es wird ab der 8. -10. SSW gebildet und steigt bis zur Geburtsreife auf bis zu 200mg DHEAS am Tag an [24, 25]. Ein Teil des fetalen DHEAS wird in der Leber des Fetus zu 16 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron-Sulfat (16OH-DHEAS) hydroxyliert. Beide Substanzen werden in der Plazenta für die Östrogen-Synthese verwendet (Abbildung 1A) [26]. Für die Östrogen-Synthese wird zuerst die Sulfat-Gruppe des DHEAS durch eine Sulfatase entfernt und anschließend wird DHEA durch 3 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3 β - und 17 β -HSD) in Androstendion (Adion) und Testosteron umgewandelt (Abbildung 1B). Im nächsten Schritt werden diese beiden Moleküle durch das Cytochrom P450-Enzym CYP19 (Aromatase) zu E1 und E2 umgewandelt [22, 27]. Das in der fetalen und mütterlichen Nebennierenrinde synthetisierte DHEAS entspricht ungefähr der in der Plazenta synthetisierten Menge an E1 und E2 während der meisten Zeit der Schwangerschaft [28]. Da die Plazenta selbst kein 16-Hydroxylase-Enzym besitzt, wird E3 ausschließlich aus 16OH-DHEAS durch Entfernung der Sulfat-Gruppe und anschließender Aromatisierung gebildet [21]. Da die Versorgung mit 16OH-DHEAS von der mütterlichen Seite limitiert ist, sind rund 90% des synthetisierten E3 fetalen Ursprungs [20]. Die Menge an synthetisierten E3 steigt stetig an und überschreitet die Menge an E1 und E2 am Ende der Schwangerschaft [26]. Auch E4 wird in der Plazenta aus 16 α -hydroxylierten Vorläufern fetalen Ursprungs synthetisiert [29]. Da die Fetalzone durch Apoptose zügig abgebaut wird, verringert sich kurz nach der reifen Geburt die Sekretion der Steroidhormone [30].

Durch die zu frühe Geburt wird die fetoplazentare Einheit zerstört und die Synthese der Östrogene, aber auch von Progesteron in der Plazenta ist nicht mehr möglich. Dies führt zu einem Abfall des Östrogen- und Progesteron-Spiegels im Plasma des Frühgeborenen um den Faktor 100 [31]. DHEAS, der Hauptvorläufer für die Östrogen-Synthese, wird jedoch weiterhin in der Fetalzone der Nebennierenrinde des Frühgeborenen synthetisiert. Das gebildete DHEAS wird dann aber in hydrophilere Metaboliten verwandelt, welche mit dem Urin ausgeschieden werden können. Die Urinausscheidungsrate dieser 3 β -Hydroxy-5-en (3 β -OH-5-en)-Steroide zeigt die Sekretionsrate von DHEAS und spiegelt damit das Maß an Aktivität der Fetalzone wieder [32].

Abbildung 1: Chemische Strukturen und Synthese der Östrogene in der fetoplazentaren Einheit.

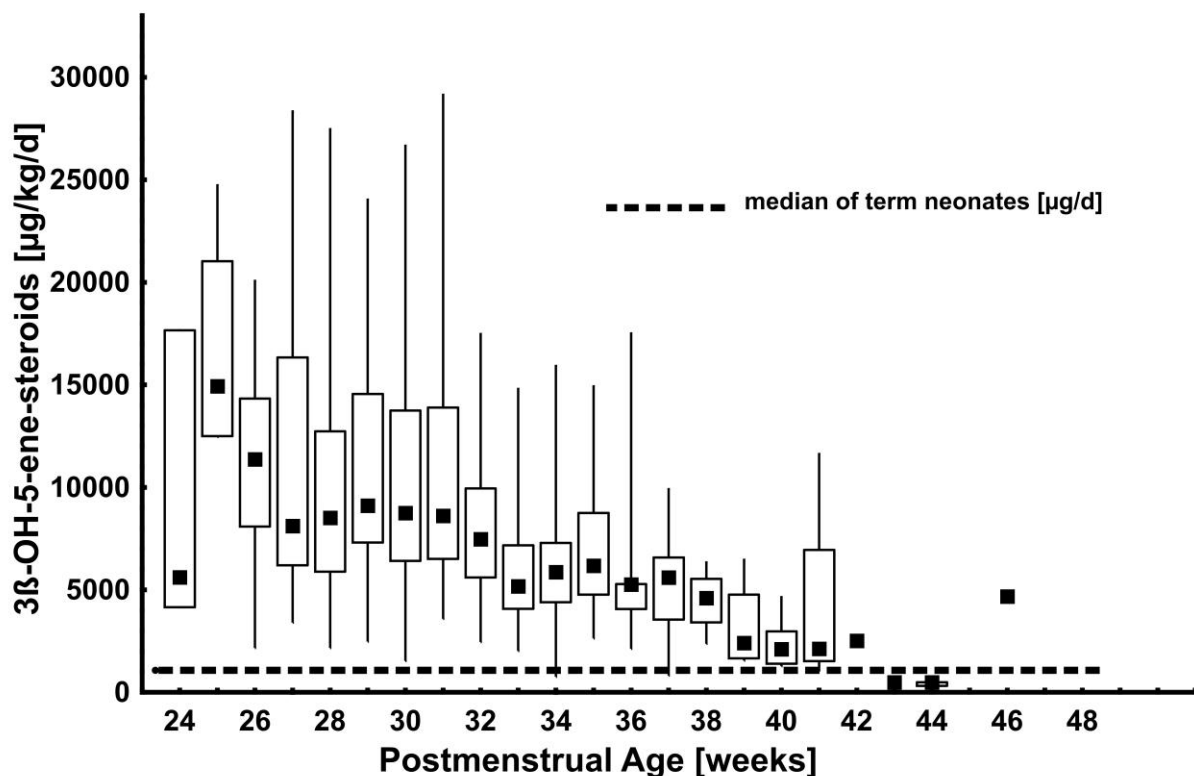


(A) Chemische Strukturen der verschiedenen Östrogene, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und einiger DHEA-Metaboliten. (B) Vereinfachte Darstellung der Östrogensynthese aus DHEA in der fetoplazentaren Einheit. Abkürzungen: 3 β - und 17 β -HSD (3 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase).

Dafür wurden in einer Studie von Heckmann *et al.* die 3 β -OH-5-en-Steroidsulfate mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im Urin von Frühgeborenen bestimmt [33]. Die Gesamtexkretion der untersuchten Metaboliten wurde quantifiziert und zusammengefasst (Abbildung 2). Dies ergab sehr hohe Konzentrationen von 3 β -OH-5-en-Steroidsulfaten, welche kontinuierlich mit zunehmendem postmenstruellem Alter absinken. Erst ab der 40. SSW werden die Exkretionsraten von reifen Neugeborenen erreicht. Demnach persistiert die Urinausscheidung der 3 β -OH-5-ene-Steroide in Frühgeborenen bis zum

Zeitpunkt der reifen Geburt und sinkt dann erst auf das Niveau von reifen Neugeborenen ab [32, 33]. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Fetalzone in reifen Neugeborenen deutlich schneller verkleinert als bei Frühgeborenen [34, 35]. Zusätzlich wurden langanhaltend hohe Plasma-Konzentrationen an DHEAS bei Frühgeborenen gefunden [30, 36]. Diese Beobachtungen zeigen, dass das Verschwinden der Fetalzone mit dem Schwangerschaftsalter und nicht mit der Geburt verbunden ist [32, 37].

Abbildung 2: Urinausscheidungsraten von 3β -OH-5-en-Steroiden in Frühgeborenen



Darstellung der 3β -OH-5-en-Steroidexkretion in μg pro kg Körpergewicht und Tag ist als Median (mit Interquartil-Bereich und Minimum – Maximum) für Frühgeborene mit < 30 SSW als Funktion des postmenstruellen Alters. Die gestrichelte Linie entspricht dem Median der 3β -OH-5-en-Steroidexkretion von reifen Neugeborenen. Aus Heckmann *et al.* “Persistent high activity of the fetal adrenal cortex in preterm infants: is there a clinical significance?”, Walter De Gruyter GmbH Berlin Boston, 2006 [33].

1.4. Schädigungsmodelle

Es existieren verschiedene experimentelle *in vivo* und *in vitro* Modelle des Frühgeborenen, welche zu einer Schädigung von unreifen Zellen bzw. der unreifen weißen Substanz führen. Für *in vivo* Modelle werden neugeborene Ratten und Mäuse zwischen Tag drei und sieben nach Geburt (P3-P7) verwendet. In diesem Zeitraum durchlaufen diese Tiere ihren

speziesspezifischen „*Brain Growth Spurt*“ und stellen so ein gutes Modell für die Unreife des Gehirns bei Frühgeborenen dar [38].

Im Allgemeinen werden die drei Schädigungsmodelle Hypoxie-Ischämie, Hyperoxie und Infektion untersucht. Die Hypoxie-Ischämie wird dabei durch Ligatur der beiden Karotiden induziert, gefolgt von einer Hypoxie [39]. Dieses Modell führt zur Unterversorgung mit Energie und O₂. Dadurch wird unter anderem toxisches Glutamat freigesetzt und es entsteht oxidativer Stress, was zu apoptotischen Zelltod führt [39]. Für die Schädigung durch Hyperoxie werden Tiere 80% O₂ ausgesetzt. Dies führt zu oxidativem Stress, Caspase-Aktivierung, verminderter Expression von Neurotrophinen und zur Inaktivierung von Proteinen, welche für den Signalweg zum Überleben der Zellen wichtig sind [13, 40]. Um eine Infektion zu induzieren wird Lipopolysaccharid (LPS) in das Muttertier während der Schwangerschaft [41] oder in die Nachkommen nach der Geburt injiziert [42]. Dieses Modell führt zu apoptotischen Zelltod durch Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen, sowie durch Inaktivierung von zellschützenden Signaltransduktionswegen [42]. Da Infektionen auch zu Hypoxie-Ischämie und oxidativen Stress führen können, gibt es Modelle zur Untersuchung der Folgen dieser Komorbiditäten [42-44]. So führt Hypoxie-Ischämie mit LPS-induzierter Infektion zu einer massiven Induktion von Apoptose. Während Hyperoxie zum Zelltod sich entwickelnder OLs führt, wird durch Präinkubation mit LPS jedoch das Ausmaß des Zelltods reduziert, aber die Reifung der OLs kommt zum Stillstand [43, 44].

Für die *in vitro* Modelle werden unreife Primärzellen aus neugeborenen Ratten und Mäusen verwendet, sowie Zelllinien unreifer Zellen, um die Vulnerabilität der einzelnen Zellsubtypen (vor allem die der OLs) zu untersuchen. Unreife OLs aus Primärzellen können dabei mit Hilfe der „*Shaking*“-Methode [45] und der magnetischen Zellsortierungsmethode (*magnetic-activated cell sorting method*, MACS) gewonnen werden [46]. Es ist auch möglich unreife OLs durch „*Primen*“ von neuronalen Progenitorzellen zu generieren [47]. Bei allen neuronalen Zellsubtypen sind jedoch nur wenige unreife Zelllinien verfügbar.

Um *in vitro* Hyperoxie zu imitieren, werden die Zellen hohen Sauerstoffpartialdrücken (meistens 80% O₂) ausgesetzt, was zur Entstehung von reaktiver Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) führt. Es konnte gezeigt werden, dass der durch Hyperoxie verursachte oxidative Stress zu Caspase-vermitteltem apoptotischen Zelltod in unreifen OLs führt [13, 48]. Das *in vitro* Modell für die Hypoxie-Ischämie ist das Glucose-Sauerstoff-Deprivationsmodell (*glucose-oxygen deprivation*, OGD), welches zu apoptotischen Zelltod mittels Induktion von Ca²⁺-Einstrom und Caspase-Aktivierung führt [49]. Auch LPS-induzierte Infektionen, allein

oder in Kombination mit Hyperoxie oder Hypoxie-Ischämie, wurden im Zellkulturmodell untersucht, wobei LPS als solches jedoch keinen Einfluss auf OLs hat. Mit LPS stimulierte Mikroglia-Zellen (Co-Kultur-Modell) aber sekretieren Zytokine und Chemokine, welche zum Absterben von unreifen OLs führen [43]. Während es im Co-Kultur-Modell zum Absterben von unreifen OLs kommt, führt dieses Modell bei reifen OLs zum besseren Überleben der Zellen über anti-apoptotische Signalwege [50]. Das OGD-LPS Komorbiditätsmodell führt zu einer verstärkten Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und verstärkt so das Ausmaß an Zelltod [51]. Neben OLs, werden Hyperoxie-, OGD- und LPS-Modell auch verwendet, um die Vulnerabilität von Neuronen, Mikroglia und Astrozyten zu untersuchen [52-54].

Für die vorliegende Arbeit wurde Hyperoxie als Schädigungsmodell verwendet, da es bereits durch die Geburt zu einer relativen Hyperoxie im Frühgeborenen kommt. Während *in utero* der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) weniger als 30 mmHg beträgt [55], steigt der PaO_2 auf 65–80 mmHg im Frühgeborenen nach der Geburt an [56]. Zusätzlich wird O_2 in der neonatalen Intensivmedizin und zur Behandlung von Lungenerkrankungen supplementiert. Gleichzeitig sind die Plasmakonzentrationen von antioxidativen Enzymen und Glutathion in Frühgeborenen signifikant niedriger als in reifen Neugeborenen [57, 58]. So führt im Frühgeborenen die relative Hyperoxie zusammen mit der verringerten antioxidativen Kapazität zu einem drastischen Anstieg von oxidativen Stress auf das noch unreife Gehirn.

1.5. Unreife Gliazellen

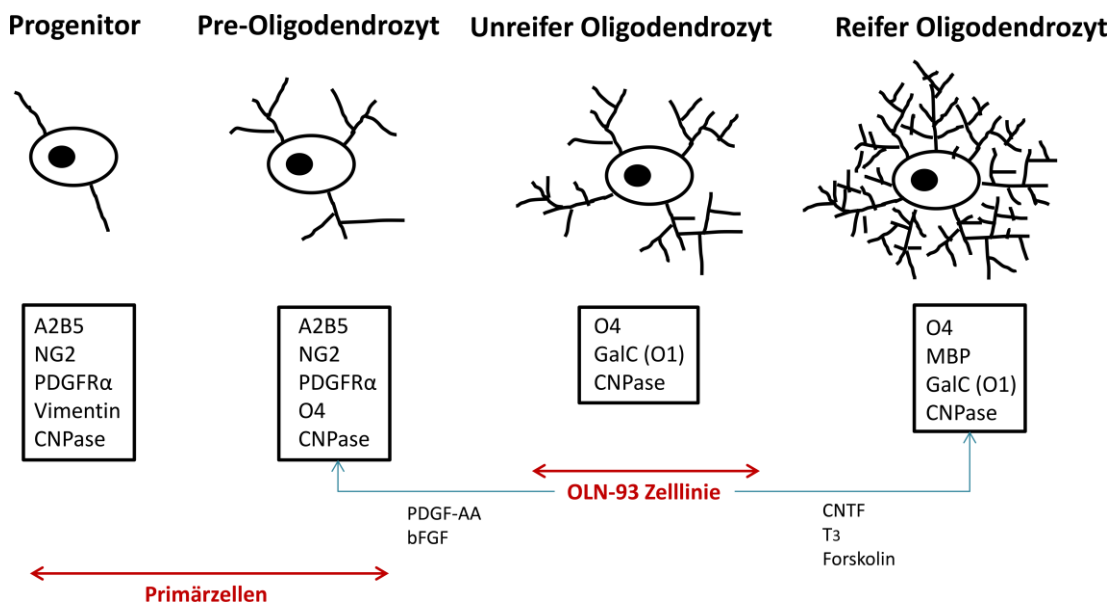
Um die Eigenschaften von spezifischen Zelltypen zu untersuchen, haben sich Zellkultursysteme als ein Mittel der Wahl etabliert. Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene Typen von unreifen Gliazellen verwendet: *Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFR α /CD140a)-positive Primärzellen, die OLN-93- und die C6-Zelllinie.

PDGFR α wird von OL-Vorläufern exprimiert, welche sich zu myelinisierenden OLs differenzieren können [59, 60]. Über die MACS-Methode wurden die PDGFR α^+ -Primärzellen aus neugeborenen Mäusen isoliert. Diese adhären Primärzellen erhalten ihre Eigenschaften bei Kultivierung in Serum-freiem Medium unter Zugabe von PDGF und *Fibroblast Growth Factor-basic* (bFGF). Ihr Reifegrad entspricht denen von Progenitorzellen und pre-OLs (Abbildung 3). In der Literatur werden OLs dieses Reifegrades auch als *Oligodendrocyte Precursor Cells* (OPCs) bezeichnet.

OLN-93-Zellen sind eine adhären Zelllinie unreifer OLs, welche durch spontane Transformation aus primären unreifen Gliazellen der Ratte entstanden ist [61]. Die OLN-93

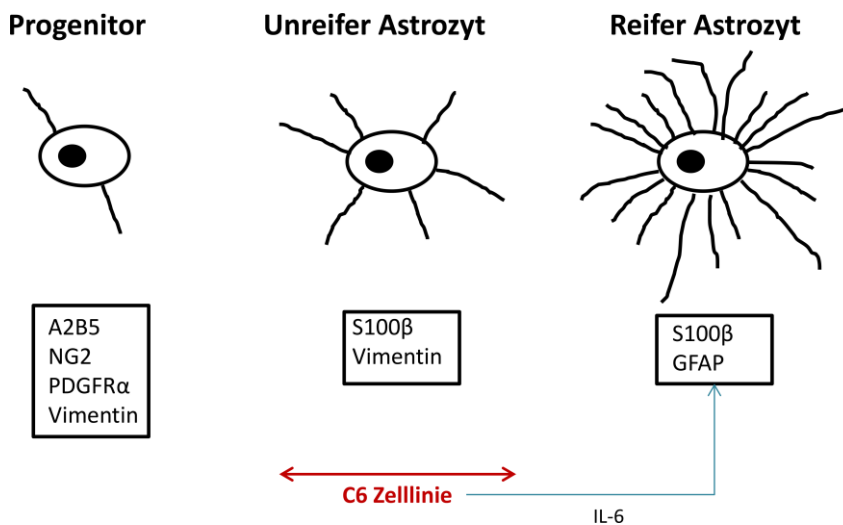
Zellen sind positiv für die Marker O4 und Galactocerebrosidase (GalC), welche Marker für unreife OLs sind. OLN-93 Zellen sind jedoch negativ für *Splice*-Varianten des basisches Myelinprotein (*Myelin Basic Protein*; MBP), welche für reife myelinisierende OLs benötigt werden (Abbildung 3) [48]. Die OLN-93 Zellen exprimieren jedoch auch eine *Splice*-Variante des MBP, welches in unreifen Zellen des ZNS vorkommen kann und dort die Proliferation reguliert [62]. Morphologie und antigene Eigenschaften spiegeln so den Reifegrad im Gehirn von fünf bis zehn Tage alten Tieren wieder. Zudem exprimieren die Zellen keine astroglialen Marker [61]. Durch Zugabe bestimmter Faktoren (Abbildung 3) kann der Reifegrad der Zellen zu pre-OLs bzw. reifen OLs beeinflusst werden [48].

Abbildung 3: Reifegrade von Oligodendrozyten mit entsprechenden Markern



Vereinfachte Darstellung der Reifung von Oligodendrozyten nach Baumann *et al.* [63] und Gerstner *et al.* [13] mit Einordnung des Reifegrades der verwendeten Primärzellen und der OLN-93 Zelllinie. Reife myelinisierende OLs sind nicht dargestellt. Durch Zugabe bestimmter Faktoren (blaue Pfeile) lassen sich OLN-93 Zellen in ihrem Reifegrad beeinflussen. Abkürzungen: *Neural/Glial Antigen 2* (NG2); *Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFR α); *2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase* (CNPase); *Galactocerebrosidase* (GalC); *Myelin Basic Protein* (MBP); *Fibroblast Growth Factor-basic* (bFGF); *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF); 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (T₃).

Die C6-Zellen sind eine adhärenente Zelllinie unreifer Astrozyten, welche durch spontane Transformation nach intrazerebraler Injektion von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff in eine männliche Ratte entstanden ist [64]. Die Zellen sind positiv für den unreifen Marker S100 β und exprimieren nur geringe Mengen des reifen Marker saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Abbildung 4) [64, 65]. Durch Zugabe von bestimmten Faktoren kann der Reifegrad der Zellen zu reiferen Astrozyten beeinflusst werden [53].

Abbildung 4: Reifegrade von Astrozyten mit entsprechenden Markern

Vereinfachte Darstellung der Reifung von Astrozyten nach Holland *et al.* [66] und Krencik *et al.* [67] mit Einordnung des Reifegrades der verwendeten C6 Zelllinie. Durch Zugabe bestimmter Faktoren (blauer Pfeil) lassen sich C6 Zellen in ihrem Reifegrad beeinflussen.. Abkürzungen: *Neural/Glial Antigen 2* (NG2); *Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFR α); *glial fibrillary acidic protein* (GFAP); Interleukin 6 (IL-6).

1.6. Intrazelluläre Signaltransduktion

Die beiden wohl am besten untersuchten intrazellulären Signaltransduktionswege sind der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-(MAPK)- und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signaltransduktionsweg [68]. Beide Signaltransduktionswege werden durch zahlreiche Faktoren wie Nährstoffe, dem zellulären Energieniveau, Hyperoxie, Hypoxie, Wachstumsfaktoren oder Steroidhormonen beeinflusst [68, 69]. Der Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Signaltransduktionsweg wird über den AMP-Spiegel und andere zelluläre Stressfaktoren reguliert. Während eine Aktivierung der MAPK- und PI3K-Signalwege meist mit Zellüberleben assoziiert ist, führt eine Aktivierung des AMPK-Signalwegs zu gesteigertem Zelltod [70, 71]. Alle drei Signaltransduktionswege haben Überschneidungen und beeinflussen sich gegenseitig [68, 70, 72]. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege kann zeitlich begrenzt (transient) oder dauerhaft (permanent) stattfinden. Transiente Signale können bereits wenige Minuten nach Zugabe von Faktoren aktiviert werden und sowohl bereits nach Minuten oder aber erst nach Stunden wieder abklingen [73, 74]. Die im Folgenden näher erläuterten Proteine bzw. in Abbildung 5 dargestellten Signalwege wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Der MAPK-Weg stellt eine zentrale, dreistufige Kaskade in der Verarbeitung extrazellulärer Signale dar und nimmt damit Einfluss auf eine Vielzahl intrazellulärer Abläufe

wie Proteinbiosynthese, Differenzierung und Zellüberleben [68]. Zur Gruppe der MAPK zählen neben der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2) auch die p38-MAPKs und *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) [75]. Die beiden Isoformen ERK1 und ERK2 sind zu 85% homolog und haben ein Molekulargewicht von 44 und 42kDa, weshalb sie auch als „p44/p42“ bezeichnet werden. Zytotoxische Stimuli wie UV-Strahlung, oxidativer Stress oder proinflammatorische Zytokine vermitteln proapoptotische Signale durch Aktivierung von p38 und JNK. Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren aktiviert die ERK1/2 Signalkaskade, welche in der Regel in die Kontrolle von Proliferations- oder Differenzierungsprozessen involviert ist [76]. Im Kontrast dazu stehen *in vitro* Untersuchungen, in denen die Aktivierung von ERK1/2 (z.B. durch Hyperoxie) zur Induktion von Apoptose führte [77, 78]. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt durch Phosphorylierung eines Tyrosin (Tyr)- und eines Threonin (Thr)-Restes.

ERK1/2 reguliert *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Komplexe, welche ein wichtiger Signal-Knotenpunkt für die Proteinbiosynthese sind. Dieser Multimolekülkomplex wird auch als „mTORC1“ bezeichnet (Abbildung 5) [79]. Die Translation wird als Antwort auf veränderte zelluläre Bedingungen über mTORC1 aktiviert [80]. Über diesen Knotenpunkt werden somit Homöostase, Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung reguliert. Aktiviertes ERK1/2 ist in der Lage, mTORC1 inhibierende Molekülkomplexe zu deaktivieren, um so die Funktion von mTORC1 zu aktivieren [81]. Aktiviertes mTORC1 phosphoryliert dann die S6 ribosomales Protein-Kinase (p70S6K), welche wiederum S6 ribosomales Protein (S6RP) aktiviert. Dadurch wird die Translation von mRNA aktiviert [68]. Darüber hinaus gibt es Studien, die eine direkte partielle Aktivierung von p70S6K über ERK1/2 zeigen konnten [82, 83].

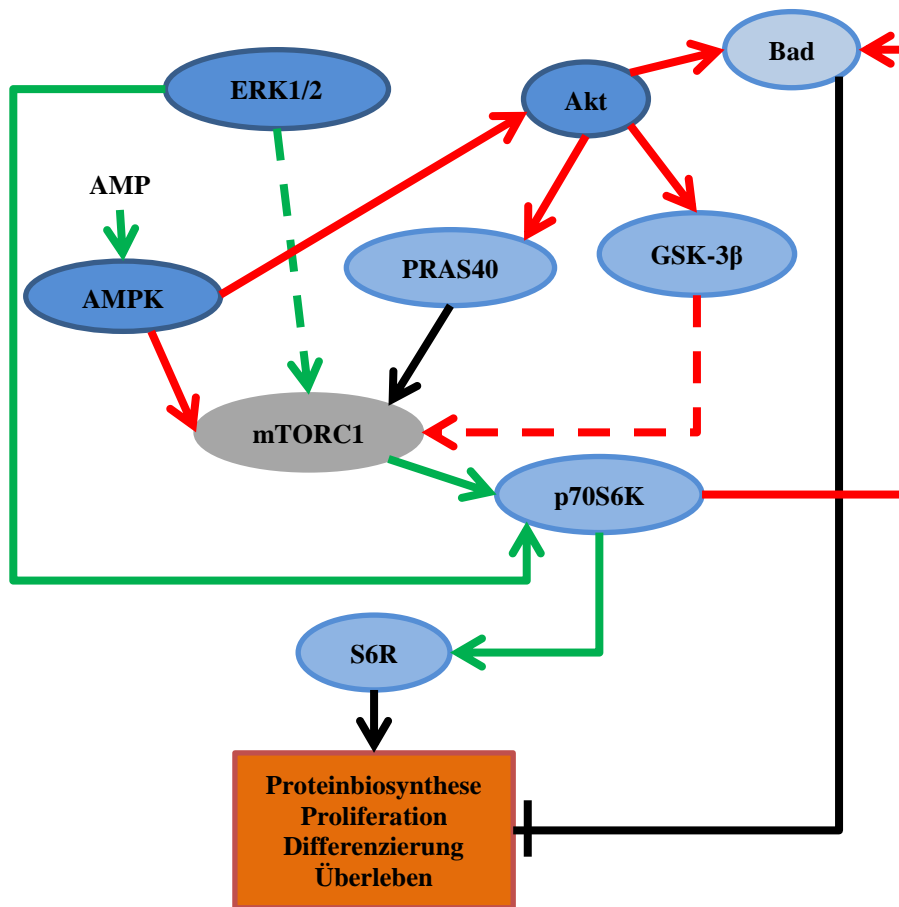
Auch der PI3K-Weg beeinflusst Proteinbiosynthese und Zellüberleben [68]. Die PI3Ks gehören zu einer Familie von konservierten intrazellulären Lipidkinasen, welche die Phosphorylierung von Inositol-Lipiden katalysieren. Die umgesetzten Lipide wirken als *Second Messenger* und rekrutieren reversibel cytoplasmatische Proteine an die Plasmamembran [68]. Akt (auch als „Proteinkinase B“ bezeichnet) gehört zu einer Familie von Kinasen mit drei hochkonservierten Isoformen und wird von diesen rekrutierten Proteinen aktiviert [84]. Die Aktivierung von Akt erfolgt durch Phosphorylierungen eines Thr- und eines Serin (Ser)- Restes.

Über 100 Substrate von Akt wurden bisher identifiziert [85]. Dazu gehören *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (Bad), 40kDa Prolinreiches Akt-Substrat (PRAS40), JNK und Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) (Abbildung 5). In seiner nicht-phosphorylierten Form

ist Bad ein proapoptotisches Protein, da es antiapoptotische Proteine der BCL-2-Familie bindet und damit deaktiviert. Durch Phosphorylierung kann Bad diese Proteine nicht mehr binden und führt damit zu antiapoptotischen Effekten [86]. Zusätzlich kann Bad auch von p70S6K phosphoryliert und damit inaktiviert werden [87]. PRAS40 bindet ein Protein des mTORC1-Komplexes und inhibiert damit seine Funktion. Die Phosphorylierung von PRAS40 kann durch Akt oder durch mTORC1 selbst erfolgen. Dadurch kommt es zur Dissoziation von PRAS40 von diesem Protein und damit zur Aktivierung von mTORC1 [88]. Aktiviertes Akt ist zusätzlich in der Lage, andere mTORC1-inhibierende Molekülkomplexe zu deaktivieren, um so die Funktion von mTORC1 zu aktivieren [68]. GSK-3 β ist eine der beiden Isoformen der GSK-3 und wird in großen Mengen im sich entwickelnden Gehirn exprimiert [89]. GSK-3 β aktiviert in seiner unphosphorylierten Form einen Molekülkomplex, welcher die Funktion von mTORC1 inhibiert. Aktiviertes (phosphoryliertes) GSK-3 β ist nicht mehr in der Lage, diese mTORC1-inhibierende Faktoren zu aktivieren und fördert so die Proteinbiosynthese wieder [68].

AMPK ist ein heterotrimeres Protein, das aus der katalytischen α -, β - und γ -Untereinheit besteht. Die AMPK wird über den AMP- und ATP-Spiegel der Zelle reguliert, wobei die Veränderung zu mehr AMP ein Zeichen für Energiemangel ist. Der durch AMP aktivierte AMPK-Signalweg kann zum einen die Proteinbiosynthese über mTORC1 inhibieren und zum anderen gibt es mehrere Arbeiten, die eine Hemmung von Akt durch AMPK gefunden haben (Abbildung 5) [70, 90]. Dadurch kann keine Adaption an den zellulären Stress über eine veränderte Proteinbiosynthese stattfinden und die Rate an Zelltod steigt.

Abbildung 5: Downstream-Messenger der ERK1/2, Akt und AMPK Signalwege



Vereinfachte Darstellung einzelner Downstream-Messenger der ERK1/2, Akt und AMPK Signaltransduktionswege nach Martelli *et al.* und Gwinn *et al.* [68, 71]. Grüner Pfeil: durch Phosphorylierung wird das Protein/der Proteinkomplex aktiviert; roter Pfeil: durch Phosphorylierung wird das Molekül deaktiviert; schwarzer Pfeil: Aktivierung; schwarze Linie mit Querbalken: Inhibition; durchgezogene Linien: direkte Wirkung auf das Molekül; gestrichelte Linie: Wirkung über Zwischenschritte auf das Molekül. Abkürzungen: *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2); *mechanistic Target of Rapamycin-Complex 1* (mTORC1); S6 ribosomales Protein-Kinase (p70S6K); S6 ribosomales Protein (S6RP); *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (Bad), 40kDa Prolinreiches Akt-Substrat (PRAS40); Glykogensynthase-Kinase 3β (GSK-3β); Adenosinmonophosphat (AMP); AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK).

1.7. E2-vermittelte Protektion in Modellen

Die durch Hypoxie-Ischämie oder Hyperoxie induzierte Apoptose kann durch Aktivierung des MAPK- und des PI3K- Signaltransduktionsweg verhindert werden [13, 40]. E2 ist in der Lage diese intrazellulären Signaltransduktionswege zu aktivieren und damit Zellen so direkt vor Apoptose zu schützen [91, 92]. Verschiedene Modelle haben gezeigt, dass E2 unreife OLs wirkungsvoll vor Zelltod schützt und auch im Tiermodell vor einer Schädigung der weißen

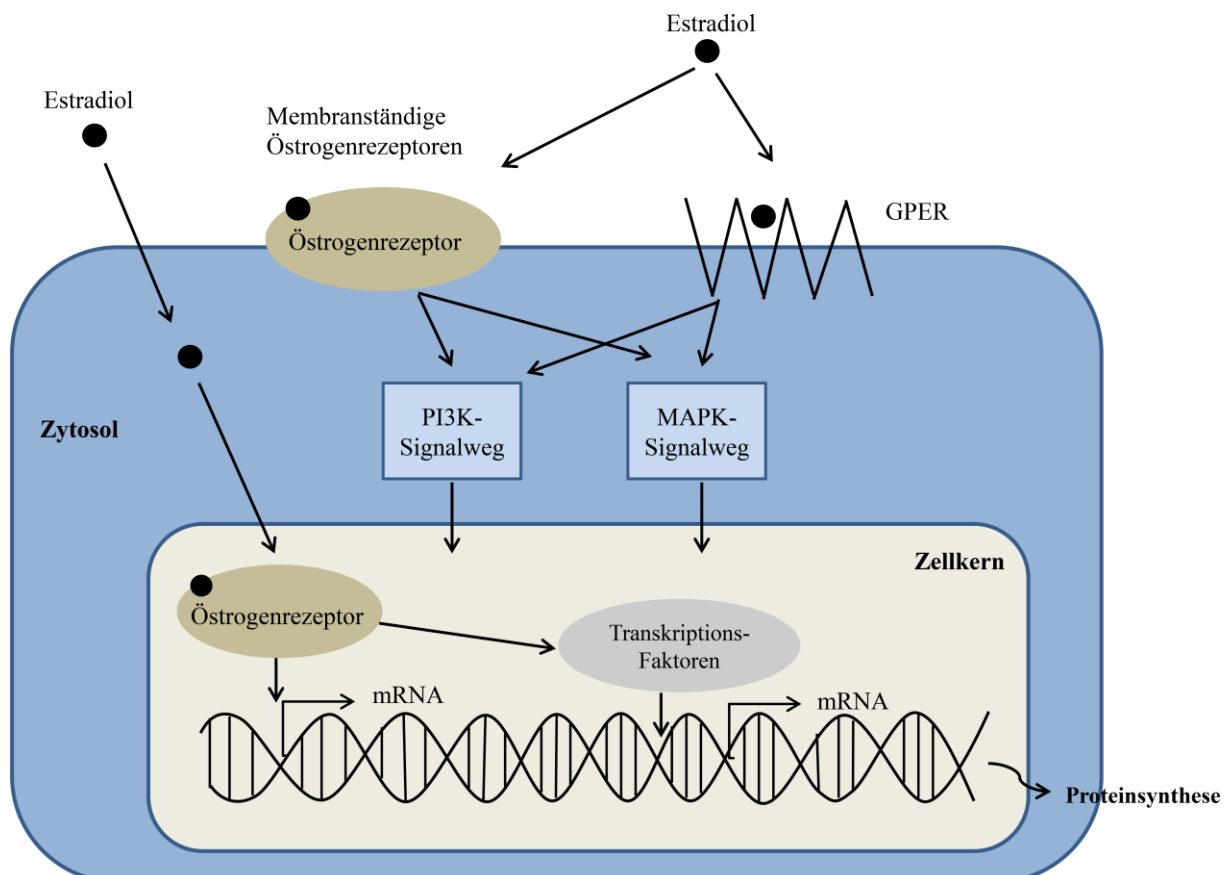
Substanz bei Hypoxie-Ischämie oder Hyperoxie schützt [91-93]. Der protektive Effekt von E2 konnte ebenfalls für unreife Neurone [94, 95] und Astrozyten [96, 97] gezeigt werden.

E2 ist bereits länger dafür bekannt, dass es beim Schlaganfall von Erwachsenen neuroprotektiv wirkt [98, 99]. Es gibt jedoch deutlich weniger experimentelle Arbeiten zur Neuroprotektion durch E2 im Frühgeborenen-Modell. Während der Entwicklung führen Östrogene zur Etablierung von Geschlechterunterschieden, aber auch zu trophischen und neuroprotektiven Effekten. In Abhängigkeit von der Hirnregion sind Östrogene in der Lage Apoptose zu verhindern oder zu fördern und die Neubildung von Synapsen zu fördern oder zu inhibieren. Zudem ist das sich entwickelnde Gehirn in der Lage Östrogene selbst zu synthetisieren und in Abhängigkeit zur Region [100-102] und dem Geschlecht [103-105] verschiedene Mengen an Östrogenrezeptor (*estrogen receptor*; ER)- α und ER- β zu exprimieren. Ein nicht-klassischer Typ von ERs, der G Protein-gekoppelte Östrogen-Rezeptor (*G protein-coupled estrogen receptor*; GPER) wird im adulten Hirn exprimiert und seine Rolle ist noch immer nicht abschließend geklärt [106]. In Nagetieren wird der GPER in unreifen OLs und Neuronen exprimiert und unterstützt den Prozess der Reifung [102, 107].

Die Menge an funktionalen Rezeptoren, die von einer Zelle exprimiert werden, ist für deren Antwortverhalten auf die Hormone (Liganden) entscheidend. Die Expression der Steroidhormonrezeptoren kann sich mit dem Entwicklungsstadium, dem physiologischen und auch dem pathologischen Status verändern [108]. Die Steroidhormonrezeptoren sind in der Lage durch die Menge an Liganden reguliert zu werden (Autoregulation), sie können sich aber auch gegenseitig beeinflussen (*Cross-Regulation*) [108]. Bei der Autoregulation gibt es zwei Möglichkeiten: die Autoregulation kann positiv (Autoinduktion) sein, was zu einer verstärkten Biosynthese des Rezeptors und damit zu einem verstärkten Antwortverhalten der Zelle gegenüber dem entsprechenden Hormon führt. Die Autoregulation kann aber auch negativ (Autorepression) sein, was zu einer Herunterregulierung des Rezeptors führt und damit zu einer verringerten Antwort der Zelle auf das entsprechende Hormon [108]. Dabei sind für ERs und den AR sowohl Autoinduktion als auch Autorepression in Abhängigkeit des Gewebes beschrieben. Bei der *Cross-Regulation* wird durch die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor ein anderer Rezeptor moduliert. So ist beispielsweise E2 in der Lage, über *Cross-Regulation* die Expression des Progesteron-Rezeptors zu induzieren [109]. Dieser Mechanismus kann zur Induktion oder Repression des Rezeptors führen und dient einem koordinierten Antwortverhalten auf hormonelle Veränderungen [108]. Die Auswirkungen der Hyperoxie bzw. der Steroidhormone auf die Rezeptordichte wurden bisher kaum untersucht.

Allgemein kann die Wirkung von E2 in genomische und nicht-genomische Effekte unterschieden werden. Genomische Effekte bedeuten, dass durch E2 die Genexpression direkt oder indirekt über Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Unter nicht-genomischen Effekten versteht man unter anderem die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen wie im Kapitel 1.6 erläutert. Mechanistisch kann der protektive Effekt von E2 dabei durch die klassischen ERs ER- α und ER- β und den nicht-klassischen ER GPER über genomische und nicht-genomische Signalwege vermittelt werden. ER- α und - β sind in der Lage, genomische und nicht-genomische Effekte zu initiieren, während am GPER nur nicht-genomische Effekte initiiert werden (Abbildung 6) [95, 97, 110, 111]. Jedoch sollten genomische und nicht-genomische Effekte nicht getrennt betrachtet werden, da nicht-genomische Effekte nachfolgend die Genexpression verändern, um den initiierten Prozess zu unterstützen [106, 111-113]. Unabhängig von diesen beiden Mechanismen gibt es Vermutungen, dass E2 wegen seiner chemischen Struktur auch als Radikalfänger agieren könnte und es in hohen Konzentrationen (μM -Bereich) zu rezeptorunabhängigen protektiven Effekten kommen könnte [114].

Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung genomischer und nicht-genomischer Effekte von E2



Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Typen von Östrogenrezeptoren (*estrogen receptor*; ER) und deren Einfluss auf intrazelluläre Abläufe. 17 β -Estradiol (E2) kann mit den klassischen ERs ER- α und ER- β interagieren, welche sowohl auf der Zellmembran als auch intrazellulär vorkommen können. Im Zellkern kann diese Interaktion von E2 mit dem Rezeptor die Transkription direkt oder indirekt über Transkriptionsfaktoren beeinflussen (genomische Effekte). E2 ist aber auch in der Lage intrazelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren wie den Mitogen-aktiviertes Protein-Kinase (MAPK) und den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg. Diese nicht-genomische Wege können sowohl über ER- α und ER- β initiiert werden als auch über den *G protein-coupled estrogen receptor* (G Protein-gekoppelter Östrogen-Rezeptor; GPER). Beide nicht-genomische Wege sind in der Lage durch Aktivierung weitere Kinasen zu aktivieren, welche die Transkription beeinflussen.

1.8. klinische Vorstudien

Wie zuvor beschrieben, führt die Frühgeburt zu einem Absinken des Östrogen- und Progesteron-Spiegel um den Faktor 100 [31]. Daraus resultiert ein Abschneiden von der Versorgung mit diesen Hormonen bis zu einem Zeitraum von 16 Wochen bei den meisten Frühgeborenen. Daher entwickelte sich die Idee, diese Hormone zu substituieren, um die intrauterine Situation zu imitieren. Dadurch sollte zum einen die reguläre Entwicklung des Kindes verbessert werden, zum anderen aber auch das Gehirn geschützt sein für den Fall, dass es zu neurologischen Komplikationen kommt [115].

Da die Behandlung mit E2 und Progesteron nicht nur in experimentellen Modellen, sondern auch in klinischen Studien bei Erwachsenen protektive Effekte zeigte, wurde die Substitution der beiden Hormone bei Frühgeborenen in einer präklinischen Studie getestet [116]. Dafür wurden 30 weibliche Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 29 SSW und einem Geburtsgewicht unter 1.000g randomisiert, um E2 und Progesteron so zu substituieren, dass beide Steroide intrauterine Konzentrationen erreichen. Bei Entlassung wurde kein Effekt dieser Behandlung auf das Überleben oder die Vulnerabilität für Hirnblutungen festgestellt. Eine Nachfolgeuntersuchung der Kinder im Alter von 15 Monaten zeigte das gleiche Maß an Verzögerung bei der mentalen Entwicklung in beiden Gruppen und eine normale psychomotorische Entwicklung in der Behandlungsgruppe [117]. Der Unterschied zur verzögerten psychomotorischen Entwicklung in der unbehandelten Gruppe war jedoch nicht signifikant.

In einer zweiten randomisierten, Placebo-kontrollierten und Doppelblinden Studie wurden 83 Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 29 SSW und einem Geburtsgewicht unter 1.000g mit E2 und Progesteron substituiert [118]. Bei Entlassung wurde kein Effekt dieser Behandlung auf das Überleben oder die Vulnerabilität für Hirnblutungen festgestellt. Eine Nachfolgeuntersuchung der Kinder im Alter von 5 Jahren zeigte keinen Unterschied

zwischen Behandlung und Placebo-Gruppe bei motorischen Fähigkeiten und beim Vorhandensein von Paresen und Spastiken [119]. Es gab jedoch einen signifikanten zeitlichen Zusammenhang in der Behandlungsgruppe. Jeder Tag Behandlung reduzierte signifikant das Risiko für Zerebralparesen und Spastiken.

Auch in höheren Primaten wurde der Effekt einer postnatalen Behandlung mit E2 untersucht. Wie der Mensch, so entwickeln auch andere höhere Primaten eine Fetalzone im adrenalen Kortex des Fetus [19]. Frühgeborene Paviane (~26.-28. SSW-Äquivalent) wurden mit E2 substituiert und der Effekt auf die Gehirnentwicklung untersucht [120]. Keines der Tiere bekam eine Hirnblutung oder Ischämie, aber auch neuropathologisch gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

1.9. Fetalzonensteroide und Rezeptorpromiskuität

Die Interaktion von Hormonen mit Rezeptoren oder Enzymen ist oft nicht so spezifisch wie früher angenommen wurde (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Steroidrezeptoren interagieren initial hochaffin mit nur mit einem Teil des Liganden und sind dadurch in der Lage mit einem Spektrum an verwandten Molekülen zu interagieren [121]. Diese sogenannte "Promiskuität" ist bei den klassischen ERs bereits länger bekannt. ERs können durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden. Dazu gehören die endogenen Östrogene E1, E2, E3 und E4, aber auch Xenoöstrogene, Phytoöstrogene und das synthetische nicht-steroidale Östrogen Diethylstilbestrol (DES) [122, 123]. Eine Aktivierung der ERs wird jedoch auch durch DHEA und andere Metaboliten von DHEA hervorgerufen. Für die Effekte von DHEA und DHEAS gibt es viele Studien, da beide mit Tumorwachstum und Alterungsprozessen im Erwachsenen assoziiert sind und zudem beide nicht nur im adrenalen Kortex gebildet werden, sondern auch von den Zellen des Gehirns selbst synthetisiert werden können. Daher werden DHEA bzw. DHEAS auch als Neurosteroide bezeichnet und sind für regulatorische Prozesse im Gehirn wichtig [124, 125]. Es konnte gezeigt werden, dass DHEA, DHEAS und deren Metaboliten Androstenediol (Adiol), Adione, 7 α -hydroxy-DHEA, 7-oxo-DHEA und 16OH-DHEA sind in der Lage, ER- α und/oder ER- β zu aktivieren [126-128].

Messungen der Steroidspiegel in arteriellen und venösem Nabelschnurblut bei Frühgeborenen, ergab für DHEA, 16OH-DHEA und Adiol Konzentrationen im μ M-Bereich [129]. Wie zuvor erwähnt, wurden durch Heckmann *et al.* Messungen von 3 β -OH-5-en-Steroidsulfaten mittels GC-MS durchgeführt und die Exkretion dieser Fetalzonensteroid-Abbauprodukte quantifiziert [33]. Hier sind 16OH-DHEA, 16 α ,18-OH-DHEA und 5-

Androsten-3 β ,16 α ,17 β ,18-tetrol (Androstentetrol, Abbildung 1A) die am häufigsten vorkommenden Metaboliten in den ersten Lebenstagen. Alle drei Metaboliten haben eine 16 α -Hydroxylierung (in der Leber) durchlaufen und zwei der drei Metaboliten wurden an C18 hydroxyliert. Bei der C18-Hydroxylierung wird vermutet, dass dadurch die Möglichkeit der Dimerisierung und Cyclisierung des Steroidmoleküls erhöht wird, was zum Maskieren der für die Rezeptorbindung wichtigen funktionellen Gruppe führen würde bzw. eine für andere Rezeptoren anziehende neue funktionelle Gruppe darstellen könnte [130]. In den ersten zwei Wochen nach der Geburt steigt die Gesamtexkretion der 3 β -OH-5-en-Steroidsulfate von 1,097mg/kg/d auf 9,018mg/kg/d und die Exkretionsrate von Androstentetrol steigt auf 53% aller Metaboliten. Das spricht für eine gesteigerte Aktivität der 16 α -Hydroxylase, der 17 β -HSD und von C18-Hydroxylierungen, welche auf das permanent neu synthetisierte DHEA einwirken. Diese multiplen Hydroxylierungen erhöhen die Wasserlöslichkeit der Fetalzonensteroiden und erleichtern so deren Ausscheidung über den Urin. Die Vermutung liegt nahe, dass Androstentetrol durch C16- und C18-Hydroxylierung aus Adiol bzw. durch 17 β -HSD, C16- und C18-Hydroxylierung aus DHEA entsteht (chemische Strukturen siehe Abbildung 1A). Damit könnten DHEA, 16OH-DHEA und Adiol ähnlich in Vorkommen und Bedeutung im Kreislauf von Frühgeborenen sein wie unter normalen intrauterinen Bedingungen.

In einer umfangreichen Studie von Miller *et al.* wurden Zellen mit humanem ER- α und - β exprimierenden Vektoren transfiziert, um separat Effekte von DHEA und seinen Metaboliten auf die transkriptionale Aktivität von ER- α und - β zu untersuchen [126]. Dafür wurde die Aktivität der sogenannten *estrogen response elements* (EREs) gemessen. Wird der ER durch einen Liganden aktiviert, bindet der ER an diese spezifische DNA-Sequenz, welche als ERE bezeichnet wird und aktiviert so die Genexpression. Über ein ERE-Reporter-Plasmid konnte dann die Aktivierung der beiden Rezeptoren durch die Steroide gemessen werden. DHEA, DHEAS und Adiol erhöhten dabei signifikant die ERE-Aktivität über den ER- α . DHEA, Adiol und 16OH-DHEA erhöhten signifikant die ERE-Aktivität über den ER- β . Bei Dosis-Antwort-Experimenten war Adiol der stärkste Agonist am ER- α , aber auch am ER- β führte Adiol bei hohen Konzentrationen zur Erhöhung der ERE-Aktivität. Durch Zugabe von Aromatase-Inhibitoren zu DHEA oder Adiol wurde die ERE-Aktivität beim ER- β signifikant inhibiert. Das Ergebnis spiegelt die zelltypspezifische Aktivität von Aromatasen wieder, welche in der Lage sind diese Steroide in aktive(re) Östrogene umzusetzen (Abbildung 1B). Interessanterweise wurde durch die Zugabe von E2 zu DHEA, DHEAS und Adiol keine

synergistischen¹ Effekte auf die ERE-Aktivität bei ER- α oder ER- β festgestellt. Durch *in vitro* Kompetitionsassays zur Ligandenbindung konnte gezeigt werden, dass DHEA und seine Metaboliten mit E2 um die Bindung an ER- α und - β konkurrieren. Dabei band Adiol an ER- α mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von $\sim 0.1\mu M$, DHEA mit $IC_{50} > 500\mu M$ und DHEAS mit $IC_{50} 100\text{--}500\mu M$. Adiol band an ER- β mit $IC_{50} \sim 50nM$ und DHEA mit $IC_{50} 500\mu M$.

Wie im Fall von E2, sind neben der Aktivierung der Transkription, DHEA und DHEAS auch dafür bekannt nicht-genomische Effekte über die MAPK und PI3K Signaltransduktionswege zu vermitteln [131, 132]. Bei diesen Arbeiten wurde jedoch nicht untersucht, ob DHEA durch intrazelluläre Aromatasen zu Molekülen mit einem höheren östrogenen Potential umgewandelt wurde.

Eine weitere offene Frage wirft die Rolle des GPER auf. Bei diesem Rezeptor gibt es noch nicht so viele Untersuchungen wie an den beiden klassischen ER. So sind bisher erst wenige physiologisch relevante Agonisten und Antagonisten beschrieben worden. Bisher ist bekannt, dass 17 α -Estradiol, E1, Progesteron, Cortisol und Testosteron nicht in der Lage sind an den GPER zu binden [133]. Der DHEA-Metabolit 7 β -Hydroxy-Epiandrosteron besitzt anti-östrogene Eigenschaften bei Brustkrebszelllinien, da er GPER und ER- α inhibiert, jedoch ER- β aktiviert [134]. Auch E3 ist ein GPER-Antagonist da es in der Lage ist, die durch GPER initiierten Prozesse wie die Aktivierung des MAPK Signalweges und die Hochregulierung von Zielgenen zu inhibieren [135]. In einer Untersuchung, in der das Pertussis-Toxin zum Inhibieren aller G Protein-gekoppelten Rezeptoren verwendet wurde, führte dies zu einer Reduktion der durch DHEA induzierten Transkription [136]. Jedoch wurde auch hier nicht die Möglichkeit der Umwandlung in Östrogene durch Aromatasen überprüft.

Da DHEA und Adiol aber auch zur Gruppe der Androgene gehören und in noch potentere Androgene wie Testosteron umgewandelt werden können (Abbildung 1B), sind sie ebenfalls in der Lage Androgenrezeptoren (AR) zu aktivieren. Genau wie bei den durch ERs initiierten Prozessen kann es je nach Gewebe durch Aktivierung des AR zu pro- oder anti-apoptischen Effekten kommen. So induzieren DHEA, Adiol und Adion in einigen Zelllinien die Transkription, was mit AR-Antagonisten wieder blockiert werden konnte [126, 137]. Im Fall von DHEA war dieser Effekt auf die Transkription nicht abhängig von der Umwandlung in potentere Androgene (3 β - und 17 β -HSD-Aktivität). Bei Adiol und Adion wurde dies nicht genauer untersucht. Auf die Rezeptoraffinitäten der humanen Rezeptoren bezogen, werden

¹ Synergistisch, zusammenwirkend. Synergismus beschreibt eine addierende (additive) Wirkung von mehreren Substanzen, bei denen die Wirkung der Summe der Einzelwirkungen entspricht.

die Effekte von DHEA jedoch vorrangig zuerst am ER- β initiiert, da die Bindungsaffinität (K_d) für ER- β $\sim 0.5\mu\text{M}$, für ER- α $\sim 1,1\mu\text{M}$ und für AR $\sim 1.2\mu\text{M}$ ist [138]. Darüber hinaus ist Adiol potenter bei der Aktivierung beider ERs im Vergleich zu DHEA [126].

1.10. Hypothese und Fragestellung

Durch zahlreiche Studien ist E2 bekannt für seine neuroprotektiven Eigenschaften. Die Frühgeburt erzeugt jedoch ein einzigartiges hormonelles Milieu, welches so nur beim Menschen und anderen höheren Primaten vorkommt. Aufgrund der zuvor beschriebenen Arbeiten ist bekannt, dass die Fetalzonensteroiden DHEA, 16OH-DHEA und Adiol, welche im μM -Bereich in Frühgeborenen zirkulieren, in der Lage sind die Transkription über Aktivierung von ER- α und - β zu initiieren. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass trotz fehlender Versorgung mit Östrogenen durch die Plazenta, die beiden klassischen ERs bei Frühgeborenen durch Fetalzonensteroiden dauerhaft aktiviert sein könnten. Intrazelluläre Aromatasen können DHEA und seine Metaboliten in potentere Östrogene umwandeln, welche dann genomische und nicht-genomische Effekte an den beiden klassischen ERs und dem nicht-klassischen ER GPER induzieren könnten. Da die Expression der Aromatasen mit dem Gestationsalter steigt [139], kommt es wahrscheinlich zu keiner kompletten Abwesenheit von Östrogenen im Frühgeborenen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Zugabe von E2 zu den Fetalzonensteroiden DHEA und Adiol keine synergistischen Effekte auf die Aktivität der Transkription verursacht. Im Fall von DHEA und Adiol kommt es sogar zur Konkurrenz mit E2 um an die ERs zu binden. Bei Adiol sind die dafür notwendigen Konzentrationen bei Frühgeborenen physiologisch relevant, so dass Adiol in der Lage sein könnte substituiertes E2 in Frühgeborenem vom ER zu verdrängen. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass die klinischen Vorstudien zur E2- und Progesteron-Substitution bei Frühgeborenen keine signifikanten Verbesserungen gefunden haben, weil es zu keinen (zusätzlichen) neuroprotektiven Effekten kommt, wenn E2 in dieses einzigartige hormonelle Milieu eines Frühgeborenen supplementiert wird.

Die zentrale Frage für die vorliegende Arbeit war daher: Kann E2 im Hyperoxie-Zellkulturmodell unreifer Gliazellen dann noch protektiv wirken, wenn Fetalzonensteroiden ebenfalls auf die Zellen einwirken?

Als Modelle wurden PDGFR α^+ -Primärzellen, C6 und OLN-93 Zellen verwendet, um zellspezifische Aspekte genauer zu untersuchen, welche das Outcome beeinflussen könnten.

Auf dem Weg zu dieser Antwort ergeben sich weitere Fragen, da beispielsweise der Mechanismus der E2-Protektion in den Frühgeborenen-Modellen kaum bzw. nur teilweise untersucht worden ist. Deshalb sollen folgende Unterfragen über die zugrunde liegenden intrazellulären Mechanismen beantwortet werden:

- 1) Führt Hyperoxie in den untersuchten Zellen zur Induktion von Apoptose?
- 2) Wirkt E2 in den untersuchten Zellen protektiv bei Hyperoxie-induziertem Zelltod?
- 3) Über welche Rezeptoren wirkt E2 protektiv bzw. sind nicht-Rezeptor-vermittelte Mechanismen möglich?
- 4) Wirken unter den Bedingungen, unter denen E2 protektiv wirkt, die Fetalzonensteroid DHEA, 16OH-DHEA und Adiol ebenfalls protektiv?
- 5) Über welche Rezeptoren wirkt DHEA als Vertreter der Fetalzonensteroid protektiv?
- 6) Wird die Protektion der Fetalzonensteroid durch intrazelluläre Umsetzung mittels Aromatasen zu potenteren Östrogenen begünstigt?
- 7) Gibt es synergistische Effekte durch die Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden gegenüber den Einzelbehandlungen?
- 8) Wird die Rezeptordichte der ERs oder des AR durch Hyperoxie bzw. durch die Behandlung mit E2 oder DHEA verändert?
- 9) Sind nicht-genomische Effekte in Form von aktiviertem PI3K- und MAPK-Signaltransduktionswegen an der Protektion durch E2 oder DHEA beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle verwendeten Materialien wie Chemikalien, Kits, Antikörper, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software, sowie die Rezepte der verwendeten Medien, Puffer und sonstigen Lösungen befinden sich im Anhang (Abschnitt V, ab Seite 121).

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation und Kultivierung von PDGFR α ⁺-Zellen

PDGFR α (auch als CD140a bezeichnet) wird von OL-Vorläufern exprimiert, welche zu myelinisierenden OLs differenzieren können [59, 60]. Die PDGFR α ⁺-Primärzellen wurden aus drei bis fünf Tage alten CD-1 Mäusen isoliert. Die Tiere stammten aus der Zucht der Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere der Universitätsmedizin Greifswald. Die Haltung der Tiere, sowie der Umgang mit ihnen entsprachen den gültigen gesetzlichen Bestimmungen. Es wurden Tiere beider Geschlechter verwendet ohne Berücksichtigung des Geschlechtes beim Poolen.

A) Vereinzlung der Zellen

Nach Dekapitation der Tiere wurden die Gehirne herauspräpariert, gepoolt ($n \geq 4$ je Ansatz) und mittels Skalpell (Fine Science Tools) zerkleinert. Daran schloss sich eine enzymatische und mechanische Zersetzung des Gewebes zur Vereinzlung der Zellen nach dem manuellen Protokoll des *Neural Tissue Dissociation Kit (P)* mit Hilfe des *MACSMix Tube Rotator* (beide Miltenyi Biotec). Dafür wurde das zerkleinerte Gewebe für 2min bei 300g herunterzentrifugiert (Megafuge 40R, Thermo Fisher) und anschließend mit der ersten Enzymmischung des Kits versetzt. Ab der Zugabe der Enzymmischung erfolgten alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen (HERA Safe, Heraeus). Die Inkubation erfolgte für 15min bei 37°C (CB150, Binder) unter Rotation mit Hilfe des *MACSMix*. Nach der Zugabe der zweiten Enzymmischung wurde das Gewebe mit in der Flamme (C2016GLS, CampingGaz) gezogenen Glaspasteurpipetten (John Poulten) zerkleinert. Nach weiteren 10min bei 37°C unter Rotation wurde das Gewebe mit Hilfe von zwei Glaspasteurpipetten mit absteigender Öffnungsgröße weiter vereinzelt. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen über einen 70 μ m-Filter (BD Bioscience) gegeben und die Enzymreaktion mit Calcium- und Magnesiumhaltiger *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS; Life Technologies) abgestoppt.

B) Zellsortierung

Mit Hilfe der magnetischen Zellsortierungsmethode (MACS) wurden dann die PDGFR α^+ -Zellen aus der Einzelzellsuspension isoliert. Dafür wurden die Zellen nach Protokoll des *CD140a (PDGFR α) MicroBead Kit* (Miltenyi Biotec) unter sterilen Bedingungen mit dem magnetischen Antikörper inkubiert und anschließend mit Säulen zur positiven Selektion (*LS* oder *MS column*; Miltenyi Biotec) im Magnetfeld (*MACS Separator*; Miltenyi Biotec) von unmarkierten Zellen getrennt. Zuerst wurde dafür die Anzahl der lebenden Zellen unter dem Mikroskop (Wilovert S, Hund Wetzlar) in einer Neubauerzählkammer (Laboroptik) mittels Trypanblau-Ausschlussmethode (0,4% Trypanblau 1:1 in DPBS verdünnt, Sigma-Aldrich) bestimmt [140]. Nach der Zentrifugation für 10min bei 300g wurde die Zellsuspension so resuspendiert, dass die Zellzahl bei 10^7 Zellen pro 80 μ l Puffer lag. Pro 10^7 Zellen wurden dann 10 μ l *FcR Block* hinzugegeben und die Suspension bei 4°C (profi line, Liebherr) für 10min inkubiert. Der *FcR Block* blockiert unspezifische Bindungsstellen an Fc-Rezeptoren exprimierenden Zellen und erhöht so die Reinheit der zu isolierenden Zellen. Pro 10^7 Zellen wurden anschließend 10 μ l PDGFR α *MicroBead*-Lösung hinzugegeben und die Suspension bei 4°C für weitere 15min inkubiert. Ungebundene *Beads* wurden dann durch Zugabe von 1-2ml Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10min bei 300g zentrifugiert und zu einer Konzentration von 10^7 Zellen pro 500 μ l Puffer wieder resuspendiert. Je nach Ausbeute wurden MS oder LS Säulen im Magnetfeld des *MACS Separator* angebracht und durch Waschen mit Puffer vorbereitet. Nach dem Durchlaufen der Zellsuspension blieben die PDGFR α^+ -Zellen mit den magnetischen *Beads* im Magnetfeld der Säule hängen, während die ungebundenen Zellen durchliefen. Die Säule wurde drei Mal mit Puffer gewaschen und anschließend aus dem Magnetfeld entfernt. Die PDGFR α^+ -Zellen wurden dann mit 5ml Zellkulturmedium eluiert, gezählt und in Kultur genommen.

C) Kultivierung

Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus *MACS NeuroMedium*, ergänzt mit 2% *MACS NeuroBrew* (beide Miltenyi Biotec), 0,5mM GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) (beide Life Technologies), 10ng/ml bFGF und 10ng/ml PDGF (beide PeproTech). Dieses Medium wurde ebenfalls für experimentelle Ansätze verwendet. Kultivierung und Experimente wurden in 96well-Platten (cell+-Oberfläche, Sarstedt) durchgeführt, welche zuvor mit 0,05% poly-D,L-Ornithin (in ddH₂O, Sigma-Aldrich) beschichtet wurden. Für die Beschichtung wurden 40 μ l poly-Ornithin-Lösung pro *well* hinzugegeben und für 3h bei RT inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit ddH₂O und Trocknen konnten die Platten

verwendet werden. Pro Ansatz wurden die Zellen je nach Ausbeute und Experiment auf die *wells* aufgeteilt. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit Befeuchtung bei 37°C und 5% CO₂ (CB150, Binder) kultiviert. Über Nacht bildeten die Zellen ihre Fortsätze nach und hafteten fest am Boden, weshalb bereits am nächsten Tag mit dem Experiment begonnen werden könnte.

2.2.2. OLN-93 Zellen

Die OLN-93-Zellen sind eine adhärenente Zelllinie unreifer OLs, welche durch spontane Transformation aus primären unreifen Gliazellen der Ratte entstanden ist [61]. Durch Zugabe bestimmter Faktoren kann der Reifegrad der Zellen beeinflusst werden [48]. Das Geschlecht dieser Zelllinie wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Diese Zelllinie wurde von Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg (Universität Oldenburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

A) Auftauen und Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie bereits zuvor von Gerstner *et al.* [48] beschrieben in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit 3,7g/l NaHCO₃, 25mM HEPES, 4,5g/l D-Glucose, 4,4 g/l NaCl (Biochrom), ergänzt mit 10% Hitze-inaktivierten fetalen Kälberserum (FCS, Biochrom), 0,01% humanes Serumalbumin (HSA, aus 20%, Grifols) und 1% Penicillin-Streptomycin. Zum Auftauen wurden die Zellen unter ständigen Schwenken in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend zügig zu vorgewärmtem Medium getropft. Nach dem Zentrifugieren für 7min bei 300g wurde das Zellpellet mit vorgewärmtem Medium resuspendiert und zu einer Zellkulturflasche mit 18ml voräquilibrierten Medium gegeben. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit Befeuchtung bei 37°C und 5% CO₂ (entspricht 21% O₂, Normoxie) kultiviert. Zur Kultivierung wurden T75-Flaschen (cell+, Sarstedt) verwendet, wobei das Medium alle 2-3 Tage zur Hälfte erneuert wurde. Die Kultur wurde alle 5 bis 7 Tage passagiert. Die Zellen wurden nur bis Passage 10 nach Auftauen verwendet.

B) Passage und Aussäen von Experimenten

Die Passage erfolgte bei ca. 80% Konfluenz². Nach dem Waschen des Zellrasens mit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS, PAN Biotech) wurden die Zellen mit 0,025% Trypsin (aus 2,5% verdünnt in DPBS, Biochrom) vom Boden gelöst. Die Enzymreaktion wurde mit Medium abgestoppt und die Zellen bei 300g für 7min zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurde ein Teil der Zellsuspension in frische Zellkulturflaschen gegeben und der Rest zum Ansetzen von Experimenten verwendet. Für die Experimente wurden die Zellen dann zellzahlspezifisch in Standardkulturmedium in 6-, 24- oder 96well-Platten (cell+, Sarstedt) ausgesät. Nach dem Aussäen der Zellen folgte eine 48h andauernde Erholungsphase bevor mit dem Experiment begonnen wurde.

C) Einfrieren

Regelmäßig wurden Zellen aus niedrigen Passagen zum Erhalt der Zelllinie eingefroren. Dafür wurden die Zellen in reinem FCS anstatt Medium nach dem Passagieren resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension so mit FCS verdünnt, dass 10^6 Zellen pro 900µl FCS enthalten waren. Diese Zellsuspension wurde in vorbereitete Cryoröhrchen (Carl Roth) gegeben und anschließend mit 100µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) auf 1.000µl aufgefüllt. Da DMSO zytotoxisch ist, mussten die Zellen zügig in mit Isopropanol (Carl Roth) befüllten und vorgekühlten Cryoboxen (Cryo 1°C Freezing Container, Thermo Fisher) zu -80°C (HeraFreeze, Heraeus) transferiert werden. Nach 48h wurden die Zellen entweder zur Kurzzeitlagerung (bis 6 Monate) bei -80°C oder zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (ARPEGE, Air Liquide) umgelagert.

D) Charakterisierung

Um die morphologischen und antigenen Eigenschaften der OLN-93 Zellen zu erhalten wurden sie wie zuvor beschrieben kultiviert und ausgesät, für die Durchführung der Experimente wurde jedoch ein vereinfachteres Medium gewählt. Dieses bestand aus DMEM (Life Technologies), ergänzt mit 10% Hitze-inaktivierten FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 100µM D,L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO, Sigma-Aldrich) (experimentelles Medium). Das BSO wurde zum Medium zugesetzt, um die zelluläre Abwehr gegen oxidativen Stress herabzusetzen. Es inhibiert die γ -Glutamylcystein-Synthetase, welche eine wichtige Rolle in der Glutathionsynthese spielt [141]. Auf diese Weise reduziert BSO die

² Bedeckungsgrad des Flaschenbodens mit Zellen

antioxidative Kapazität der Zellen und imitiert so die Situation des O₂-Stress in Frühgeborenen.

Um den Reifegrad der OLN-93 Zellen zu überprüfen wurden die Zellen wie zuvor beschrieben zu unreiferen bzw. reiferen Zellen induziert [48]. Um einen unreiferen Phänotypen mit bipolarer Morphologie zu induzieren, wurden die Zellen 6 Tage mit 10ng/ml PDGF und 10ng/ml bFGF behandelt (Tabelle 1). Um einen reiferen Phänotypen mit stark-verzweigten Fortsätzen zu induzieren, wurden die Zellen 6 Tage mit 10ng/ml CNTF, 5µM Forskolin and 15nM T₃ behandelt. Alle 2 Tage wurde das Medium mit den entsprechenden Faktoren erneuert. Die Auswertung erfolgte zum einen mittels Fluoreszenzmikroskopie des Strukturproteins β-Aktin sowie mittels Western Blot Analyse des Enzyms CNPase, welches während der Reifung von OLs immer stärker exprimiert wird.

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen für OLN-93 Zellen.

Substanz	Abkürzung	verwendete finale Konzentration	Verkäufer	Lösungsmittel
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin	T ₃	15nM	Sigma-Aldrich	DPBS + 0,2% HSA
D,L-Buthionine-(S,R)-sulfoximin	BSO	250µM	Sigma-Aldrich	ddH ₂ O
Forskolin	-	5µM	Sigma-Aldrich	DMSO
<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	PDGF	10ng/ml	PeptoTech	1x TBS + 0,1% BSA
<i>Recombinant Rat Ciliary Neurotrophic Factor</i>	CNTF	10ng/ml	PeptoTech	1x TBS + 0,1% BSA
<i>Human Fibroblast Growth Factor-Basic</i>	bFGF	10ng/ml	PeptoTech	1x TBS + 0,1% BSA

2.2.3. C6 Zellen

Die C6-Zellen sind eine adhärenente Zelllinie unreifer Astrozyten, welche durch spontane Transformation nach intrazerebraler Injektion von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff in eine männliche Ratte entstanden ist [64]. Die Zelllinie wurde über LGC Standards bei der *American Type Culture Collection* (ATCC) erworben.

A) Handling der Zellen

Als Standardkulturmedium für diese Zellen wurde das von ATCC angegebene Medium verwendet. Es bestand aus F-12K Medium (Life Technologies), ergänzt mit 15% Hitze-inaktivierten Pferdeserum (Biochrom), 2,5% Hitze-inaktivierten FCS und 1% Penicillin-Streptomycin. Die C6 Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll aufgetaut wie die OLN-93 Zellen. Auftauen, Einfrieren, Zellkulturbedingungen, und Ansetzen der Experimente erfolgten bis auf weniger Ausnahmen wie bei den OLN-93 Zellen. So wurden die C6 Zellen zum Einfrieren in Kulturmedium aufgenommen und so verdünnt, dass 10^6 Zellen in 950 μ l Medium und 50 μ l DMSO eingefroren wurden. Außerdem wurden die C6 Zellen erst bei 90% Konfluenz passagiert.

B) Charakterisierung

Um die morphologischen und antigenen Eigenschaften der C6 Zellen zu erhalten, wurden diese ebenfalls in ihrem Standardkulturmedium kultiviert und ausgesät, für die Durchführung der Experimente wurde jedoch wieder ein vereinfachteres Medium gewählt. Dieses bestand aus DMEM, ergänzt mit 10% Hitze-inaktivierten FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (experimentelles Medium).

Um den Reifegrad der C6 Zellen zu überprüfen wurden die Zellen wie zuvor beschrieben zu reiferen GFAP-positiven Astrozyten ($S100\beta^+GFAP^+$) induziert [65]. Dafür wurden die Zellen 48h mit 100ng/ml IL-6 behandelt (Tabelle 2). Die Auswertung erfolgte zum einen mittels Fluoreszenzmikroskopie des Strukturproteins β -Aktin sowie mittels Western Blot Analyse von GFAP.

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen für C6 Zellen.

Substanz	Abkürzung	verwendete finale Konzentration	Verkäufer	Lösungsmittel
<i>Recombinant Rat Interleukin 6</i>	IL-6	100ng/ml	PeptoTech	1x TBS + 0,1% BSA

2.2.4. Vorbehandlung und Schädigung der Zellen

Nach der entsprechenden Erholungsphase der Zellen konnte mit dem Experiment begonnen werden. Dafür wurden die zu testenden Substanzlösungen vorab im experimentellen Medium verdünnt. Da die Substanzen in zytotoxischen DMSO gelöst wurden, sind alle Lösungen als

Stocklösungen angesetzt worden, welche 1:1.000 verdünnt angewendet werden mussten (Tabelle 3). Jede Kontrollbedingung wurde dann 1:1.000 (1µl/ml) mit DMSO versetzt, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen.

Tabelle 3: Verwendete Steroidhormone, Agonisten, Antagonisten und Inhibitoren mit Konzentrationen.

Substanz	Abkürzung	Funktion	verwendete finale Konzentration(en)	Verkäufer
17β-Estradiol	E2	ER-α/ER-β-Agonist	1pM bis 10µM in 10 ¹ -Schritten	Sigma-Aldrich
Dehydroepiandrosteron	DHEA	-	1pM bis 100µM in 10 ¹ -Schritten	Sigma-Aldrich
5-Androsten-3β, 16α-diol-17-on	16OH-DHEA	-	1pM bis 10µM in 10 ¹ -Schritten	Steraloids
5-Androsten-3β, 17β-diol	Adiol	-	1pM bis 10µM in 10 ¹ -Schritten	Steraloids
ICI 182,780	ICI	ER-α/ER-β-Antagonist, GPER-Agonist	1µM	Sigma-Aldrich
G1	G1	GPER-Agonist	100nM	Tocris
G36	G36	GPER-Antagonist	1µM	Tocris
Bicalutamide (Casodex)	CDX	Androgenrezeptor-Antagonist	10µM	Sigma-Aldrich
Exemestane	Exe	Aromatase-inhibitor	100nM	Sigma-Aldrich

Die PDGFRα⁺-Primärzellen wurden 12h lang mit dem entsprechenden Medium inkubiert und dann wie bei Gerstner *et al.* [92] zuvor beschrieben für 12h in einem Inkubator mit Befeuchtung bei 37°C, 5% CO₂ und 80% O₂ (CB53, Binder) dem O₂-Stress (Hyperoxie) ausgesetzt.

Bei OLN-93 und C6 Zellen betrug die Präinkubationszeit 2h, gefolgt von einer Erneuerung des Mediums. Die Zellen wurden der Hyperoxie bzw. Normoxie (Standardkulturbedingungen, 21% O₂) für die in den Ergebnissen angegebene Zeit ausgesetzt.

2.2.5. FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie oder auch *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Analyse ist eine schnelle Methode einzelne Zellen anhand von Größe, Granularität (Komplexität) und Fluoreszenzeigenschaften zu unterscheiden. Dafür werden die Zellen als Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung nacheinander aufgereiht an einem gebündelten Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge vorbeigeleitet. Dabei wird zum einen die Lichtstreuung als auch das emittierte Fluoreszenzlicht (z.B. Antikörper-gekoppelte Fluorophore) detektiert. Dadurch kann das Auftreten bestimmter fluoreszenzmarkierter Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Moleküle quantifiziert werden. Die entstandene Lichtstreuung korreliert dabei mit der Größe der Zelle und ihrer Granularität. Da Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur in ihrem vorgesehenen Kanal bzw. Detektor ein Signal verursachen, sondern auch in anderen Kanälen zu einem Signal führen, ist eine Kompensation notwendig. Entstandene falsch-positiven Signale durch diese Streuung, werden durch die Kompensation rechnerisch korrigiert. Die FACS-Methode wurde verwendet um die Reinheit der PDGFR α ⁺-Primärzellen zu bestimmen, sowie zum Nachweis von apoptotischen und toten Zellen in den Zelllinien.

A) Reinheit der PDGFR α ⁺-Primärzellen

Die Analyse wurde bei den PDGFR α ⁺-Primärzellen durchgeführt, um als Qualitätskontrolle nach der Isolation die Reinheit und Vitalität der eluierten Zellpopulation zu bestimmen. Da die PDGFR α -Bindungsstellen im Eluat bereits von *MicroBead*-Antikörpern besetzt worden sind, mussten PDGFR α ⁺ Zellen über die Bindung an die entsprechende Isotypkontrolle (Maus anti-Ratte IgG2a-Allophycocyanin [APC]; [Klon RG7/1.30, Miltenyi Biotec]) sichtbar gemacht werden. In den restlichen Proben wurde ein Fluoreszenzgekoppelter Maus anti-CD140a (PDGFR α) -APC Antikörper (Klon APA5, Miltenyi Biotec) zur Färbung des Rezeptors verwendet. Es erfolgte keine Zugabe von *FcR Block* für die FACS-Färbung, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen, da die Zellen bereits während der Isolation mit *FcR Block* behandelt wurden. Zur Identifizierung toter Zellen wurde Propidiumiodid (PI; 0,5mg/ml in DPBS; Sigma-Aldrich) verwendet.

Für die FACS-Färbung wurden Zellen vor der Separation, sowie vom Eluat und Durchfluss entnommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je Probe dann vier FACS-Röhrchen (Falcon, Corning) mit jeweils 10⁶ Zellen für die FACS-Färbung entnommen. Die FACS-Färbung erfolgte nach Herstellerangaben und war für beide Antikörper identisch. Dafür wurden die Zellen für 10min bei 300g zentrifugiert und anschließend in 45 μ l FACS-

Puffer resuspendiert. Es wurden dann 5µl Antikörper- bzw. 5µl PI-Lösung in die entsprechenden Röhrchen hinzugegeben und für 10min bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 1-2ml Puffer pro Röhrchen und anschließender Zentrifugation für 10min bei 300g wurden die ungebundenen Antikörper gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

Mit dem Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) wurden ungefärbte Zellen dann nach Volumen und im Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) nach der Granularität aufgetrennt (Software: FACSDIVA; Gerät: BD LSR II; beide BD Bioscience). Dabei wurden FSC und SSC so eingestellt werden, dass die Hauptpopulation mittig im angezeigten Diagramm der beiden Parameter lag. Zur Kompensation wurden Kompensations-*Beads* (*CompBeads*, BD Bioscience) mit einem geeigneten PE- (für PI) bzw. Alexa Fluor 647 (für APC-Antikörper) -gekoppelten Antikörper verwendet. Nach der Kompensation wurden die Proben mit 100.000 *events* je Probe aufgenommen.

Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo. Zuerst wurde die Hauptpopulation definiert. Innerhalb dieser Population wurde ein *single cell gating* im FSC und SSC vorgenommen, um zusammenhängende Zellen (Doubletten) auszuschließen, welche aus gefärbten und ungefärbten Zellen bestehen können und damit ein verändertes Signalprofil aufweisen. Innerhalb dieser Population wurde dann die Färbung ausgewertet. Anhand ungefärbter Zellen wurde der Bereich der für die Färbung negativen Zellen definiert. Diese Einteilung wurde dann auf die Einzelfärbungen kopiert und überprüft, ob die *gatings* immer noch beide Populationen (positiv/negativ) richtig voneinander trennen. Durch Zugabe von einem oder mehreren Antikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen kann es zum Verschieben der Population kommen, was ggf. nachkorrigiert werden muss. Die *gatings* der Einzelfärbungen wurde dann auf die Probe mit den Doppelfärbungen kopiert und die Definitionen der Bereiche überprüft. Das Ergebnis wurde als prozentualer Anteil an positiv gefärbten Zellen zur untersuchten Population angegeben.

B) Nachweis von aktivierter Caspase 3/7

Die FACS-Analyse wurde ebenfalls bei OLN-93 und C6 Zellen angewendet, um die Menge an apoptotischen und toten Zellen durch die verschiedenen Behandlungen nach 48h Normoxie bzw. Hyperoxie zu untersuchen. Dafür wurde mit dem *CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit* (Life Technologies) gearbeitet. Die Methode beruht darauf, dass ein nicht-fluoreszierender Farbstoff zu den Zellen gegeben wird, welcher bei Bindung an die DNA zu fluoreszieren beginnt. Gleichzeitig wird zu den Zellen jedoch ein Inhibitor

dazugegeben, welcher diese Anbindung an die DNA und damit die Fluoreszenz verhindert. Der Inhibitor ist das aus vier Aminosäuren bestehende Peptid DEVD. Durch die Aktivierung von Caspase-3 bzw. -7 wird DEVD gespalten und der hinzugegebene Farbstoff bindet an die DNA und beginnt zu fluoreszieren. Zusätzlich wurde Sytox als Marker für tote Zellen hinzugegeben.

Einige *wells* wurden mit 0,5µM Staurosporin (SSP) (in DMSO, Sigma-Aldrich) als positiv-Kontrolle für Apoptose 24h vor Ablauf des Experiments behandelt. Nach Ablauf der 48h Normoxie oder Hyperoxie wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One) vom Boden gelöst und in 50ml-Röhrchen (Falcon, Corning) überführt. Anschließend wurden die *wells* mit DPBS gewaschen und dann ebenfalls mit in das Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 10min bei 300g zentrifugiert und das Pellet anschließend in DPBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 10^6 Zellen auf vier FACS-Röhrchen per Ansatz gegeben. Das Volumen in den FACS-Röhrchen wurde dann mit DPBS auf 1ml aufgefüllt. In die entsprechenden Röhrchen wurde dann 1µl *CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent* hinzugegeben und die Röhrchen anschließend für 25min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl *SYTOX AADvanced dead cell stain solution* in die entsprechenden Röhrchen gegeben und weitere 5min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zügig am FACS gemessen. Zur Kompensation wurden Staurosporin-behandelte sowie DMSO-behandelte Zellen aus normoxischen Bedingungen verwendet. Die Durchführung der Messung und die anschließende Auswertung fanden wie oben bereits beschrieben statt.

2.2.6. Vitalitätsassays

A) LDH-Assay

Für die PDGFR α^+ -Primärzellen und die OLN-93 Zellen wurde ein Lactatdehydrogenase(LDH)-Zytotoxizitätsassays verwendet (*LDH-Cytotoxicity Assay Kit II*, Abcam). LDH ist ein intrazellulär vorkommendes Enzym welches frei wird, wenn eine Zelle so geschädigt wird, dass die Zellmembran nicht mehr intakt ist (Apoptose, Nekrose). Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass LDH aus dem Überstand das hinzugegebene Lactat oxidiert und dadurch NADH gebildet wird. Das NADH reagiert dann mit dem dazugegebenen roten wasserlöslichen Tetrazoliumsalz und bildet einen gelben Farbstoff, welcher mit einem Plattenlesegerät gemessen werden kann.

Der Assay wurde bei PDGFR α^+ -Primärzellen nach 12h Hyperoxie durchgeführt, während bei den OLN-93 Zellen der Assay nach 48h durchgeführt wurde. Für die LDH-Messung wurden am Ende des Experimentes die Platten gemischt um LDH gleichmäßig im Überstand zu verteilen. Anschließend wurden die Platten für 10min bei 600g zentrifugiert. Bei OLN-93 Zellen wurden 20 μ l Überstand und bei PDGFR α^+ -Primärzellen 30 μ l Überstand in frische *wells* einer 96well-Platten transferiert. Dazu wurden dann 100 μ l *LDH Reaction Mix* hinzugegeben und die Platten für 15-30min inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei OD_{450nm} und einer Referenzwellenlänge von OD_{650nm} gemessen (Software: *Ascent*, Gerät: Multiscan Ex, beide Thermo Fisher). Zur Auswertung wurde der OD_{650nm} vom OD_{450nm} abgezogen. Jede Versuchsbedingung wurde als Triplikate untersucht und zu N=1 gemittelt. Die erhaltenen Werte wurden in prozentualer Abweichung zur Kontrollbedingung unter Hyperoxie bzw. Normoxie angegeben (DMSO = 100% Zelltod bzw. 1).

B) MTT-Assay

Um die Viabilität der C6 Zellen unter den verschiedenen Behandlungen zu messen, wurde ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay verwendet (*CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega). MTT ist ein gelbes Tetrazol, welches durch metabolisch aktive (lebende) Zellen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Mit organischen Lösungsmitteln kann das Formazan in Lösung gebracht werden und die entstandene Farblösung kann dann in einem Plattenlesegerät gemessen werden.

Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Viabilität der Zellen, wurde der Assay nach 24h, 48h und 60 bzw. 72h durchgeführt, während die restlichen Experimente nach 48h gemessen wurden. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurde 4h vor Ende des Experimentes 15 μ l MTT je *well* hinzugegeben. Am Ende des Experimentes wurden dann 100 μ l *Solubilization Solution/Stop Mix* je *well* hinzugegeben. Da die entstandene Farbe mehrere Tage stabil ist, wurde das Formazan nach Zugabe der Stopplösung über Nacht lichtgeschützt auf einem Schüttler (64724, Thermo Fisher) in einer Feuchthaltekammer gelöst und die Platte am folgenden Tag gemessen. Die Platten wurden bei OD_{595nm} und einer Referenzwellenlänge von OD_{650nm} gemessen. Zur Auswertung wurde der OD_{650nm} vom OD_{595nm} abgezogen. Auch hier wurde jede Versuchsbedingung als Triplikate gemessen und zu N=1 gemittelt. Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes wurden die erhaltenen Werte in prozentualer Abweichung zur Kontrollbedingung angegeben (DMSO = 100% Viabilität). Für die Darstellung aller anderen Ergebnisse wurde dieser Assay an die Darstellung des LDH-

Assays angepasst, um durch Vereinheitlichung die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Mit der Formel: % Zelltod = 100 - (% Viabilität - 100) wurden die Ergebnisse umgerechnet und geben so die prozentuale Abweichung zur Kontrollbedingung unter Hyperoxie (DMSO = 100% Zelltod) an.

2.2.7. (Immun-)Fluoreszenzfärbung

Die Fluoreszenz bzw. Immunfluoreszenzfärbung (IF) dient der Detektion von Zellbestandteilen, welche im Durchlicht eines Mikroskops nicht sichtbar wären. Bei der IF werden Zellen mit (gegen das gewünschte Epitop gerichteten) Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert bzw. zuerst mit einem Primärantikörper und dann einen gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper.

Bei der Fluoreszenzfärbung dagegen wird die Färbung durch die Eigenschaften des dazugegebenen Stoffes erzeugt. So sind Hoechst und PI beispielsweise Interkalatoren, welche nur durch die Anbindung in die DNA-Doppelhelix fluoreszieren. Hierbei dringt Hoechst durch seine kleine Struktur in alle intakten Zellen ein, wohingegen PI ein sperriges Molekül ist, welches nur in (tote) Zellen mit defekter Zellmembran eindringen kann. So lässt sich anhand beider Farbstoffe eine einfache lebend/tot-Bestimmung durchführen. Ebenfalls keine Immunfluoreszenz ist die Verwendung von Fluoreszenzgekoppelten Annexin V zum Nachweis von Apoptose. Phosphatidylserin (PS) befindet sich bei vitalen Zellen auf der intrazellulären Seite der Zellmembran. Wird jedoch Apoptose induziert, wird relativ früh in diesem Prozess PS auf die äußere Zellmembran umgelagert. Dieses extrazelluläre PS kann dann durch die stabile Anbindung von PS an (Fluoreszenzgekoppeltes) Annexin V nachgewiesen werden.

Fluoreszenz und IF wurden verwendet um apoptotische und tote Zellen unter den verschiedenen Behandlungen zu untersuchen und zum Nachweis von zelltypspezifischen Markern.

A) Apoptose-Färbung

Bei PDGFR α^+ -, OLN-93 und C6 Zellen wurden Färbungen für die Detektion von lebenden, apoptotischen und toten Zellen zur beispielhaften Darstellung von Schädigung bzw. Protektion in 96well-Platten durchgeführt. Bei PDGFR α^+ -Primärzellen wurde die Färbung nach 12h Hyperoxie durchgeführt, während OLN-93 und C6 Zellen nach 48h untersucht wurden. Dafür musste das Medium komplett abgenommen und pro well 40 μ l Annexin V-

bindig buffer (Biolegend) mit 1µl Annexin V-APC (Biolegend), 1µl PI und 0,04µl Hoechst 33342 (1mg/ml in DMSO, Sigma-Aldrich) hinzugefügt werden. Nach 20min Inkubation bei 37°C konnte die Färbung am Fluoreszenzmikroskop (Software: LAS AF, Gerät: DMI 4000b, beide Leica) betrachtet werden. Da es sich bei der Kamera am Mikroskop um eine schwarzweiß-Kamera handelte, konnte das Fluoreszenzsignal in verschiedenen Farben dargestellt werden. Zur besseren Unterscheidung von PI und Annexin V-APC, wurde dem APC-Signal statt dem eigentlichen violett, die Farbe Grün zugeordnet. Je Färbung wurden einige repräsentative Bilder aufgenommen.

B) Zelltypspezifische Marker

Für die IF wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL; 0,1% in ddH₂O; Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen in Standardkulturmedium ausgesät. Für die Beschichtung wurden runde Deckgläschen in 24well-Platten gelegt und mit PLL überschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die *wells* zweimal mit ddH₂O und danach zweimal mit HBSS gewaschen. Der letzte Waschschritt verblieb in den *wells* bis zur Verwendung.

Die Zellen wurden nach der Passage in den Platten ausgesät und für mindestens 48h inkubiert bis ein dichter Zellrasen entstanden war. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA; 4% in PBS, Sigma-Aldrich) fixiert. Dafür wurden die *wells* zuvor mit DPBS gewaschen und anschließend mit kaltem PFA für 10min bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und im letzten Waschschritt bei 4°C bis zur Färbung gelagert.

Für die IF wurde als erstes für 2h eine *Blocking* Lösung auf die Zellen gegeben, welche unspezifische Bindungsstellen besetzen sollte. Diese *Blocking* Lösung bestand aus 5% *Normal Goat Serum* (NGS, Jackson ImmunoResearch) in 1x PBS mit 0,3% Triton (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Zellen mit Primärantikörper-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper-Lösung bestand dabei aus 3% NGS in 1x PBS mit 0,3% Triton und dem entsprechenden Primärantikörper (Tabelle 4). Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für 10min mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 2h mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung bestand ebenfalls aus 3% NGS in 1x PBS mit 0,3% Triton und einem entsprechenden Sekundärantikörper. Danach wurden die Zellen viermal mit 1x PBS für 10min gewaschen und mit Eindeckmedium egedeckt, welches 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (Dapi) (Vector Laboratories) enthält. Dapi färbt wie Hoechst die Zellkerne an durch Interkalation mit der

DNA. Je Färbung wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop einige repräsentative Bilder aufgenommen.

Tabelle 4: Details zu verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern für die Immunfluoreszenz.

Name	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
Primärantikörper			
Mouse Anti-Oligodendrocyte Marker O4, (Klon O4)	R&D Systems	MAB1326	1: 200
Rabbit Anti-S100β (Klon EP1576Y)	Abcam	ab52642	1: 50
Rabbit Anti-β-Actin	Sigma-Aldrich	A6022	1: 100
Sekundärantikörper			
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 Konjugat	Life Technologies	A-11029	1: 400
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594 Konjugat	Life Technologies	A-11012	1: 400

2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz PCR) ist eine Methode um DNA zu vervielfältigen. Dabei binden kurze definierte DNA-Fragmente (*Primer*) an ihre entsprechend komplementären Sequenzen an der DNA und können durch die Polymerase abgelesen und vervielfältigt werden. Damit kann das Vorhandensein eines bestimmten Genes bzw. Genvariante ermittelt werden. Diese Methode wurde verwendet, um das Geschlecht der OLN-93 Zellen zu bestimmen. Dies erfolgte über den Nachweis des für männliche Ratten spezifische *rat sex-determining region Y (SRY)* Gen. Für die PCR wurde zusätzlich DNA aus C6 Zellen und aus adultem männlichen Ratten als positiv-Kontrollen verwendet, sowie aus adulten weiblichen Ratten als negativ-Kontrolle.

A) DNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Zuerst musste dafür genomische DNA aus den Zelllinien bzw. aus dem Gewebe adulter Tiere isoliert werden. Für die Isolation wurde das QIAamp DNA Isolationskit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Für die Isolation von DNA aus OLN-93 und C6 Zellen

wurde das Medium entfernt und DPBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden entfernt, in ein 50ml-Röhrchen überführt und für 10min bei 300g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml DPBS resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf) überführt und erneut für 5min bei 300g zentrifugiert (1-15PK, Sigma). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 200µl DPBS resuspendiert. Anschließend wurden 20µl QIAGEN Protease und 200µl Puffer AL hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen (RS-VA10, Phoenix Instrument) wurde die Lösung für 10min bei 56°C auf einem Thermo-Mixer inkubiert (PocketBloc, Biozym). Dann wurden 200µl reiner EtOH (Th. Geier) hinzugegeben und das Gefäß erneut gevortext. Diese Mischung wurde auf eine Säule gegeben, welche die DNA bindet. Die Säule wurde für 1min bei 6.000g zentrifugiert und anschließend mit 500µl Puffer AW1 gewaschen. Nach Zentrifugieren für 1min bei 6.000g wurden 500µl Puffer AW2 auf die Säule gegeben. Nach 3min zentrifugieren bei 20.000g wurde erneut für 1min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, um Flüssigkeiten komplett zu entfernen. Mit 100µl Puffer AE und Zentrifugation für 1min bei 6.000g wurde die DNA eluiert. Die Lagerung der gewonnen DNA erfolgte bei -20°C (profi line, Liebherr).

Für die Gewinnung von DNA aus adulten Ratten wurde etwas Gewebe entnommen und mit einem Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und 180µl Puffer ATL hinzugefügt. Anschließend wurden 20µl Proteinase K hinzugegeben und das Gefäß gevortext. Über Nacht wurde dann das Gewebe auf dem Thermo-Mixer bei 56°C zersetzt. Am nächsten Tag wurden 200µl Puffer AL hinzugegeben, gevortext und für 10min bei 70°C auf einem Thermo-Mixer inkubiert. Anschließend wurden 200µl reiner EtOH hinzugegeben und wie beim Protokoll zuvor für DNA-Isolation aus Zellen ab dem Schritt der EtOH-Zugabe fortgeföhren.

Um die Konzentration der isolierten DNA zu bestimmen, wurde ein Spektralphotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher) mit einer eingesetzten Mikro-Messzelle für UV/VIS-Analyse (TrayCell, Hellma Analytics) verwendet. Der Eluierungspuffer AE wurde als Leerwert verwendet und anschließend die Absorption der Proben bei 260nm gemessen worüber sich die Konzentration berechnen in ließ.

B) Komponenten und Durchführung der PCR

Für den Nachweis von SRY wurden Primer nach Publikation von Ise *et al.* [142] mit der folgenden Sequenz verwendet: *forward Primer* 5'-CAGAGATCAGCAAGCATCTGG-3' und *reverse Primer* 5'-TCTGGTTCTTGAGGACTGG-3' (Eurofins). Die *Primer* wurden mit 1x TE-Puffer (pH 8) (aus 100x TE-Puffer, Merck Millipore) so gelöst, dass die Konzentration

2µM betrug. Zur Amplifizierung wurde eine *DreamTaq* DNA-Polymerase (Thermo Fisher) verwendet. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung untersucht und angesetzt wie in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Komponenten und Mengen für 20µl PCR-Reaktionsansatz.

Komponente	Menge	Finale Konzentration	Firma
DNA	500ng	25ng/µl	-
10x Puffer	2µl	1x	Thermo Fisher
dNTPs	0,4µl	200nM	Thermo Fisher
Primer <i>for</i>	0,1µl	100nM	Eurofins
Primer <i>rev</i>	0,1µl	100nM	Eurofins
Polymerase	0,1µl	0,5U	Thermo Fisher
DEPC-ddH ₂ O	auf 20µl auffüllen	-	Thermo Fisher

Aus 10x Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), *Primern* und Polymerase wurde ein Master-Mix für alle Proben hergestellt. Zuerst wurde das DEPC-ddH₂O in den 8-*Tube*-Streifen vorgelegt, dann kam der Master-Mix hinein und zum Schluss wurde die DNA hinzugegeben. Ein Ansatz enthielt keine DNA und wurde mit DEPC-ddH₂O auf 20µl aufgefüllt. Diese Probe diente als Leerprobe, um die Reagenzien auf Verunreinigungen zu testen. Mit Hilfe eines Vortex-Mixer für Eppendorf-Gefäße (MixMate, Eppendorf) wurde die Ansätze gemischt und mit einem Real-Time PCR-System (StepOne Plus, Applied Biosystems) anschließend amplifiziert. Der Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte der PCR ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Ablauf der PCR-Reaktionsschritte.

Phase	Temperatur	Dauer	
Initiation	95°C	3min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	30sec	
Primer-Anbindung/ <i>Annealing</i>	57°C	30sec	
DNA-Synthese/ <i>Elongation</i>	72°C	1min	
Finale Phase	72°C	7min	

C) Auswertung

Die Auswertung der PCR erfolgte über Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Dafür wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung wurden 2g Agarose (Biozym) in 100ml 1x TAE-Puffer (aus 10x TAE-Puffer, Carl Roth) durch Erhitzen in der Mikrowelle (HF 600, Siemens) gelöst. In einem 60°C Wasserbad (1023, GFL) wurde die Lösung für 15min langsam abgekühlt. Dann wurden 5µl *RedSafe* (Intro Biotechnology) hinzugegeben, die Lösung gemischt und das Gel in den Gießstand (40-0708, Peqlab) gegossen. *RedSafe* kann wie Hoechst und PI in die DNA interkalieren. Nach dem Einsetzen des Kammes, härtete das Gel für ca. 20min aus. Anschließend wurde die Gelelektrophorese-Kammer mit 1x TAE-Puffer befüllt bis das Gel gut bedeckt war. Dann wurde der Kamm entfernt und die Proben für den Lauf vorbereitet. Dazu wurden 8µl PCR-Produkt mit 2µl Probenpuffer (TE/G-Puffer, Carl Roth) gemischt und 8µl des Gemisches in die Tasche gegeben. Für den Marker wurden 4µl DNA-Leiter (*O'Gene Ruler*, Thermo Fisher) mit 4µl DEPC-ddH₂O und 2µl Probenpuffer gemischt und 8µl des Gemisches in die Tasche gegeben. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde an ein Netzteil (EV202, Consort) angeschlossen und auf 120V gestellt. Nach ~20min bei 120V konnte das Gel ausgewertet werden. Durch Anregung des im Gel enthaltenen *RedSafe* mit UV-Licht entsteht Fluoreszenz dort, wo DNA vorhanden ist. Dieses Signal konnte mit einem Dokumentationssystem für Gele und Membranen (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories) detektiert werden. In den Proben, in denen SRY amplifiziert werden konnte, war eine einzelne DNA-Bande (~400bp groß) sichtbar und diente somit als Nachweis für männliche DNA.

2.2.9. Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinen auf eine Träger-Membran, auf welcher anschließend spezifische Proteine nachgewiesen werden können. Dem voraus geht die Gelelektrophorese, welche die isolierten Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Gewicht auftrennt. Der Nachweis der Proteine auf der Membran verläuft nach demselben Prinzip wie bei der IF mit Primär- und Sekundärantikörpern, nur das hier Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper verwendet werden. Durch die Zugabe von Dioxetanen (Substrat) auf die Membran, oxidiert die Peroxidase dieses Substrat und Lumineszenz entsteht. Diese Lumineszenz kann als Signal detektiert und anschließend quantifiziert werden. Zur Quantifizierung wird in jeder Probe eine Referenz detektiert, welche durch die Behandlung nicht beeinflusst wird wie z.B. das Strukturprotein β -Aktin oder das Enzym

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Glycolyse. Durch diese relative Quantifizierung zur Proteing Gesamtmenge einer Probe können spezifische Proteine zwischen verschiedenen Behandlungen (oder Zeitpunkten) miteinander verglichen werden.

A) Generierung der Proteinproben

Je nach Experiment mussten die Proben verschieden aufgearbeitet werden. Zum Nachweis von Rezeptoren und Reifemarkern mussten die Proteine so isoliert werden, dass diese vorrangig lipophilen (Membran-)Proteine erhalten blieben. Bei der Untersuchung des Phosphorylierungsstatus war es wichtig die Phosphorylierungen zu erhalten. Bei diesen Proteinen handelte es sich um hydrophile Proteine aus dem Zytosol.

Die Proteine für Rezeptoren und Reifemarker wurden mit TRIzol (Life Technologies) isoliert. Diese Proben wurden nach einem Experiment-Zeitraum von 48h gewonnen. Dafür wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die *wells* mit DPBS gewaschen und die Waschlösung ebenfalls zum Röhrchen hinzugefügt. Nach Zentrifugation die 300g für 10min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit 1ml TRIzol gelöst bis eine homogene Lösung entstand. Die Lösung wurde in 2ml Eppendorf-Gefäße transferiert und bis zu 2 Wochen bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für die Proteinisolation wurden die Proben bei RT aufgetaut und 200µl Chlorform (Merck Millipore) je Probe hinzugegeben. Die Proben wurden für 15sec gevortext und anschließend für 3min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 15min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurde die Lösung in mehrere Phasen aufgeteilt. Die obere wässrige Phase enthielt RNA, während die untere rote Phenol-Chloroform-Phase und die weißliche Interphase Proteine und DNA enthielten. Daher wurde nach der Zentrifugation die obere Phase abgenommen und zur verbleibenden Lösung 300µl reiner EtOH gegeben, um die genomische DNA zu präzipitieren. Nach dem Invertieren wurden die Proben für 3min auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation für 2min bei 12.000g und 4°C wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde anschließend auf zwei frische 2ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Durch Zugabe von 750µl Isopropanol wurden dann darin die Proteine ausgefällt. Nach dem Invertieren der Proben und 10min Inkubation bei RT, wurden die Proteine anschließend für 5min bei 12.000g und 4°C pelletiert. Das Proteinpellet wurde dann mit 1,5ml 0,3M Guanidinium-Hydrochlorid (in 95% EtOH, Sigma-Aldrich, Protein-Waschpuffer) gewaschen. Dafür kamen die Proben im Waschpuffer für 20min auf den Schüttler. Danach wurden die Proteine für 2min bei 12.000g und 4°C erneut herunterzentrifugiert. Dieser Waschschrift mit

dem Waschpuffer wurde anschließend noch dreimal wiederholt. Daran schlossen sich zwei Waschschrte mit reinem EtOH. Im letzten Waschschrte mit EtOH wurden die Proteine bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteine der benötigten Proben wurden dann zeitnah vor dem Western Blot in Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer bestand aus 8M Harnstoff (Merck Millipore), 2M Thioharnstoff (Merck Millipore), 4% CHAPS (Carl Roth), 40mM Tris (Carl Roth) und 65mM DTT (Merck Millipore). Lysierte Proteine sind ca. 6 Monate bei -20°C stabil. Durch Zentrifugation für 2min bei 12.000g und 4°C wurde das Pellet herunterzentrifugiert. Der EtOH wurde abgenommen und das Pellet wurde im geöffneten Gefäß getrocknet. Das Pellet wurde dann mit 200-500 μl Lysispuffer versetzt und bei 850rpm für 3h in einem Vortex-Mixer für Eppendorf-Gefäße geschüttelt. Je nachdem wie gut das Pellet dann resuspendiert war, kam es wieder auf den Mixer oder wurde bei -20°C weggefroren.

Zur Isolation der zytosolischen Proteine für die Phosphorylierungsuntersuchung wurde *M-PER Mammalian Proteine Extraction Reagent* (Thermo Fisher) verwendet. Bei diesem Experiment wurden die Zeitpunkte 0h, 6h, 12h, 24h und 48h untersucht. Um den Phosphorylierungsstatus zu erhalten bzw. um die Proteine vor Abbau zu schützen, wurden dieser Reagenz zusätzlich Inhibitoren für Proteasen und Phosphatasen hinzugesetzt. Dafür wurden 10ml Reagenz mit 100 μl *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail* (Thermo Fisher) versetzt. Für die Isolation wurde ebenfalls der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die *wells* mit DPBS gewaschen und die Waschlösung ebenfalls zum Röhrchen hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 300g für 10min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 500 μl der Reagenz resuspendiert. Nach dem Transfer in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß wurde die Probe für 10min auf einem Orbital-Mischer (Edmund Bühler) lysiert. Die Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

B) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Die Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595nm und ist damit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Für die Konzentrationsbestimmung ist eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen von BSA notwendig.

Für die Bradford-Lösung wurden 20ml Rotiquant (Carl Roth) mit 80ml ddH₂O gemischt und filtriert. Für die Standardkurve wurde eine 1mg/ml BSA-Stammlösung in Lysepuffer hergestellt (BSA von MP Biomedicals). Nach dem Auftauen der Proben auf Eis, wurden die Standards und Proben angesetzt wie in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Pipettierschema für Standardkurve und Probenmessung beim Bradford Assay.

Standardkurve				
	BSA Stammlösung (1mg/ml)	Lysepuffer	ddH ₂ O	Bradford Lösung
S1	2 µl	28 µl	70 µl	1,9 ml
S2	4 µl	26 µl	70 µl	1,9 ml
S3	6 µl	24 µl	70 µl	1,9 ml
S4	8 µl	22 µl	70 µl	1,9 ml
S5	10 µl	20 µl	70 µl	1,9 ml
S6	15 µl	15 µl	70 µl	1,9 ml
S7	20 µl	10 µl	70 µl	1,9 ml
S8	30 µl	-	70 µl	1,9 ml
Leerwert	-	30 µl	70 µl	1,9 ml
Für die Proben (abhängig von der erwarteten Proteinkonzentration)				
	Unbekannte Probe	Lysepuffer	ddH ₂ O	Bradford Lösung
hohe Konz	2 µl	28 µl	70 µl	1,9 ml
niedrige Konz	5 µl	25 µl	70 µl	1,9 ml

Für die Bradford-Methode wurde zuerst ddH₂O in 2ml Eppendorf-Gefäße vorgelegt, dann der Lysepuffer hinzugegeben und anschließend die entsprechende Menge BSA-Stammlösung bzw. Probe hinzugegeben. Bei den Proben wurden entweder 2µl bei erwarteter hoher Proteinkonzentration oder 5µl Proteinlösung bei erwarteter niedriger Proteinkonzentration eingesetzt. Im letzten Schritt wurden 1,9ml Bradford-Lösung dazugeben, der Deckel geschlossen und die Lösung gemischt. Nach 5min Inkubation mussten innerhalb von 1h alle Proben gemessen werden. Dazu wurde zuerst der Leerwert gemessen und die Absorption bei 595nm darauf genullt. Dann wurden die Lösungen für den Standard nacheinander in Einmalküvetten (Carl Roth) gefüllt und die Absorption mit einem Spektralphotometer bei 595nm gemessen. Danach wurde wieder auf den Leerwert genullt und die zu bestimmenden

Proben nacheinander gemessen. Pro Standardkurve wurden bis zu 18 Proben gemessen. Für jede weitere Messung wurde eine neue Standardkurve hergestellt und gemessen.

Mit den bekannten Konzentrationen aus der Standardkurve konnten so die Konzentrationen der zu bestimmenden Proben berechnet werden (Probe S1 entspricht 1µg/ml, Probe S2 2µg/ml usw.). Mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes (Excel, Microsoft) wurde daraus ein Diagramm (Konzentration gegen Absorption) erstellt und die Datenpunkte mit einer Trendlinie (lineare Regressionsgerade) versehen. Die erhaltene Geradengleichung wurde nach x umgestellt und für y die entsprechende Absorption der unbekannt Probe eingefügt. Die erhaltenen Werte mussten noch auf das eingesetzte Volumen der Probe und das Gesamtvolumen in der Küvette bezogen werden.

C) Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 12%ige Acrylamidgele selbst hergestellt. Dazu wurden Glasplatten für 1,5mm dicke Minigele in den Gießständen fixiert (alles von Bio-Rad Laboratories). Zum Gießen des Trenngels (unterer Teil des Gels, hoher Acrylanteil) wurden folgende Komponenten luftblasenfrei gemischt: ddH₂O, Tris-Puffer, SDS-Lösung (in ddH₂O, Serva), Rotiphorese 30 Acrylamidlösung (Carl Roth), APS-Lösung (in ddH₂O, Merck Millipore) und TEMED (Carl Roth). Das Gel wurde zügig gegossen und musste ca. 45min auspolymerisieren. Zum Gießen des Sammelgels (oberer Teil des Gels, niedriger Acrylanteil) wurden die gleichen Komponenten wie zuvor luftblasenfrei gemischt, wobei die Menge an Rotiphorese 30 Acrylamidlösung entsprechend niedriger war. Das Gel wurde zügig gegossen und musste ca. 20min auspolymerisieren.

Die Proteinproben, der Marker (*SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder*, Thermo Fisher) und der 5x Probenpuffer wurden auf Eis aufgetaut. Der 5x Probenpuffer wurde selbst hergestellt und bestand aus Sammelgelpuffer mit Glycerin (Sigma-Aldrich), SDS-Lösung, β-ME (Sigma-Aldrich) und BPB-Lösung (Carl Roth). Die Gele wurden in einer Gelelektrophorese-Kammer (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories) fixiert und die Kammer mit Laufpuffer (1x Puffer aus Rotiphorese 10x SDS Page, Carl Roth) gefüllt. Pro Tasche wurden 20µg Protein bei 25µl Gesamtvolumen eingesetzt. Dafür wurde eine entsprechende Menge Lysispuffer vorgelegt, dann die Proteinlösung hinzugegeben und zum Schluss die Probe mit 5µl 5x Probenpuffer gemischt. Als Positiv-Kontrollen für die Antikörper wurden Lysate vom adulten Rattenhirn, sowie Zelllysate von MCF-7 und NIH/3T3 Zellen (alle Santa Cruz Biotechnology) verwendet. Ohne Zugabe weiterer Reagenzien wurden 20µl Lysat der Kontrollen pro Tasche verwendet. Nach Beladen des Gels

wurden die Proteine für 20min bei 90V (PowerPac1000, Bio-Rad Laboratories) am unteren Ende des Sammelgels konzentriert. Anschließend lief das Gel für ca. 1h bei 120V bis die Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

D) Transfer auf Membran

Für den Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde das Tank-Blot-Verfahren verwendet. Der Transferpuffer wurde selbst hergestellt und bestand aus folgenden Komponenten: Tris, Glycin (Merck Millipore), SDS und Methanol (Mallinckrodt Baker). Das Gel wurde aus den Glasplatten genommen und das obere Sammelgel wurde entfernt. Das Gel, Whatman-Papier (GE Healthcare) und Schwämme (Bio-Rad Laboratories) wurden mit Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran (Bio-Rad Laboratories) wurde zur Orientierung vorsichtig an einer Ecke eingeschnitten und in Methanol äquilibriert. In einer Tank-Blot-Kassette wurde der Blot zusammengesetzt. Auf die schwarze Seite (Kathode) der Kassette wurden dafür ein Schwamm und zwei Stück Whatman-Papier gelegt. Darauf kam das Gel und wurde glatt gestrichen. Auf das Gel wurde dann die PVDF-Membran gelegt, welche ebenfalls wieder luftblasenfrei geglättet wurde. Darauf kamen wieder zwei Stücke Whatman-Papier und ein Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank (Mini Trans-Blot Module, Bio-Rad Laboratories) gestellt. Der Transfer lief für 2h bei 50mA auf Eis.

E) Immunodetektion

Nach dem Lauf wurde der Blot auseinander gebaut und der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran überprüft. Da der Marker einen speziellen roten Farbstoff enthielt, konnte anhand der roten Farbe auf der PVDF-Membran der erfolgreichen Transfer auch ohne Ponceau-Färbung ablesen werden. Die Membranen wurden auf Nylonnetzen (Flow Mesh) liegend in 50ml-Röhrchen transferiert und mit 1x TBS (selbst hergestellt aus Tris und NaCl, Carl Roth) gewaschen. Die Membranen wurden anschließend für 2h bei RT auf einem Rollinkubator (RM5.40, Karl Hecht) mit *Blocking* Lösung inkubiert. Die *Blocking* Lösung bestand aus 5 % Magermilchpulver (Carl Roth) und 0,15% Tween 20 (Sigma-Aldrich) in 1x TBS. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit 1x TBS + 0,3% Tween (TBST) gewaschen. Die meisten Antikörper wurden mit 5% NGS in TBST angesetzt. Nur die Antikörper von Cell Signaling wurden nach Herstellerangaben in 1x TBS mit 5% BSA und 0,1% Tween 20 angesetzt. Die Referenzantikörper gegen GAPDH bzw. β -Aktin wurde gleichzeitig mit dem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein verwendet, da keine

Wechselwirkungen auftraten und so die Anzahl des *Reprobing* der Membranen verringert werden konnte. In Tabelle 8 sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit der entsprechenden Konzentration angegeben. Die Primärantikörper-Lösung wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert.

Tabelle 8: Details zu verwendeten Antikörpern für den Western Blot.

Antikörper	Hersteller, Katalognummer	Verdünnung
Rabbit Anti-Estrogen receptor-α (HC-20)	Santa Cruz Biotechnology, sc-543	1:200
Rabbit Anti-Estrogen receptor-β	Affinity BioReagent, PA1-311	1:1.000
Rabbit Anti-GPER/GPR30	Abcam, ab39742	1:250
Mouse Anti-Androgen receptor (Klon AR441)	Abcam, ab9474	1:200
Mouse Anti-CNPase (Klon 11-5B)	Abcam, ab6319	1:1.000
Rabbit Anti-GFAP (Klon G-A-5)	Sigma-Aldrich, G3893	1:1.000
Rabbit Anti-CYP19 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology, sc-30086	1:200
Rabbit Anti-Phospho Akt (Ser473)	Cell Signaling, 9271 S	1:1.000
Rabbit Anti-Akt	Cell Signaling, 9272 S	1:1.000
Rabbit Anti-phospho-p44/42 MAP-Kinase XP® mAb (Klon D13.14.4E)	Cell Signaling, 4370 S	1:2.000
Rabbit Anti-p44/42 MAP-Kinase (ERK1/2)	Cell Signaling, 9102 S	1:1.000
Rabbit Anti-β-Actin	Sigma-Aldrich, A6022	1:5.000
Rabbit Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich, G9545	1:5.000
Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 115-036-146	1:5.000
Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 111-036-003	1:5.000

Am nächsten Tag wurden die Membranen 5x für 3min mit TBST auf einem Rollinkubator gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit der Sekundärantikörper-Lösung für 1h

bei RT auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung bestand aus 1% NGS in TBST mit den entsprechenden Antikörpern. Danach wurden die Membranen wieder 5x für 3min mit TBST auf einem Rollinkubator gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit 1x TBS gewaschen, um Tween 20 zu entfernen. Zum Entwickeln der Membranen wurde *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher) verwendet. Dafür wurden Lösung 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und die Membran anschließend für mindestens 1min darin im Dunkeln entwickelt. In einem Dokumentationssystem für Gele und Membranen wurde anschließend das Chemilumineszenz-Signal der entsprechenden Protein-Banden detektiert. Da die rekombinanten Proteine der Leiter IgG-Bindungsstellen besitzen, binden Primär- und Sekundärantikörper unspezifisch an diese Proteine. Dadurch wurden neben den spezifischen Protein-Banden auch die Banden des Markers sichtbar.

Da das Wiederverwenden der Membranen (*Reprobing*) möglich ist, wurden die Membranen in vielen Fällen einmal „gestrippt“. *Stripping* bedeutet, dass die Antikörper auf der Membran durch Behandlung mit Säure protoniert werden und so von den spezifischen Proteinen gelöst werden. Der verwendete *Stripping*-Puffer besaß einen pH-Wert von 2,2 und enthielt Glyzin, SDS und Tween 20. Die Membran wurde zweimal 10min auf einem Schüttler mit dem *Stripping*-Puffer inkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschschrte mit 1x TBS für 10min und zwei Waschschrte mit TBST für 5min. Anschließend konnte mit den Schritten ab dem *Blocking* eine neue Färbung begonnen werden.

F) Auswertung

Die aufgenommenen Chemilumineszenz-Bilder wurden mittels Densitometrie ausgewertet. Mit der Software *Image Lab* (Bio-Rad Laboratories) wurden die verschiedenen Probenspuren und die entsprechenden Proteinbanden darin definiert. Für jede Bande wurde so ein Wert für dessen Intensität generiert. Durch Auswählen einer der Banden als Referenz (β -Aktin oder GAPDH), berechnete die Software daraus das Verhältnis der anderen Banden zu der gewählten Referenz. Durch diese relative Quantifizierung zur Referenz können verschiedene Behandlungen bzw. Zeitpunkte semi-quantitativ miteinander verglichen werden (Ratio). Dafür wurden nur Daten von derselben Membran verwendet.

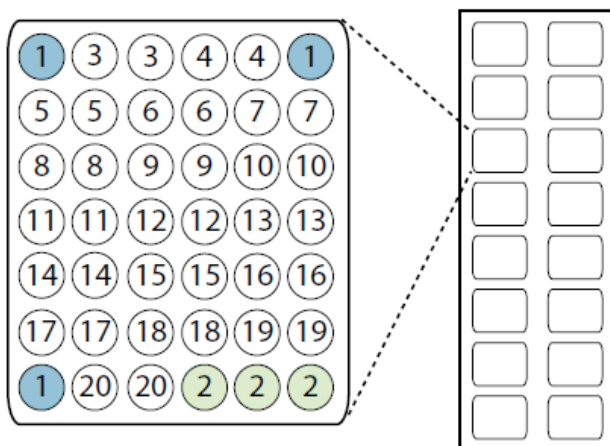
2.2.10. Dot Blot (Multiplex ELISA Array)

Der Dot Blot ist eine Methode zum semi-quantitativen Nachweis von Proteinen basierend auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Bei einem Sandwich-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent*

Assay) wird der Primärantikörper an eine feste Oberfläche gebunden. Dann wird die Probe hinzugegeben und die entsprechenden Moleküle werden spezifisch vom Primärantikörper gebunden. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der ein anderes Epitop als der erste Primärantikörper erkennt und an dessen Ende ein Reporterenzym gebunden ist. Je nach Reporterenzym wird das entsprechende Substrat hinzugegeben und das Molekül kann durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Bei einem Dot Blot handelt es sich um einen Multiplex ELISA Array, da mehrere Antikörper auf einer Oberfläche fixiert sind und so der Nachweis mehrerer Moleküle in einer Probe gleichzeitig stattfinden kann. Diese Methode wurde verwendet, um verschiedene Moleküle der MAPK-, PI3K- und AMPK-Signaltransduktionswege zu untersuchen.

Beim verwendeten *PathScan Intracellular Signaling Array* (Cell Signaling) waren die Antikörper auf mit Nitrozellulose beschichteten Objektträgern fixiert. Ein Objektträger besaß 16 *wells* und in jedem *well* waren 18 verschiedenen Antikörper als Duplikate auf die Membran aufgebracht. Abbildung 7 zeigt den Aufbau der Objektträger und Tabelle 9 beschreibt die Zielmoleküle, welche durch die aufgetragenen Antikörper detektiert werden können. Da dieser Array auf humane Proben ausgelegt ist, sind nicht alle Antikörper für die Detektion dieser Proteine aus der Spezies Ratte kreuzreaktiv. Auf Nachfrage beim Hersteller wurde Spezies-Kreuzreaktivität für alle in Tabelle 9 grau hinterlegten Signalmoleküle bestätigt (11 von 18). Nur diese wurden später bei der Auswertung betrachtet. Das Signal wurde mittels Meerrettich-Peroxidase (*horse reddish peroxidase*, HRP) in Form von Chemilumineszenz detektiert.

Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Objektträgers beim Dot Blot.



Schematischer Aufbau der Objektträger für die PathScan-Analyse. Auf jedem Objektträger befinden sich 16 *wells* mit jeweils 18 verschiedenen Antikörpern als Duplikate aufgetragen. Quelle: Datenblatt des Kits von <https://media.cellsignal.com/pdf/7323.pdf>.

Tabelle 9: Details zu den im Dot Blot detektierbaren Zielmolekülen.

Zielmoleküle	Abkürzung	Phosphorylierungsort	Modifikation
1 Positiv-Kontrolle	-	-	-
2 Negativ-Kontrolle	-	-	-
3 <i>extracellular-signal regulated kinase</i>	ERK1/2	Thr202/Tyr204	Phosphorylierung
4 <i>signal transducers and activators of transcription 1</i>	Stat1	Tyr701	Phosphorylierung
5 <i>signal transducers and activators of transcription 3</i>	Stat3	Tyr705	Phosphorylierung
6 <i>protein kinase B</i>	Akt	Thr308	Phosphorylierung
7 <i>protein kinase B</i>	Akt	Ser473	Phosphorylierung
8 <i>AMP-activated protein kinase α</i>	AMPK α	Thr172	Phosphorylierung
9 <i>S6 ribosomal protein</i>	S6RP	Ser235/236	Phosphorylierung
10 <i>mammalian target of rapamycin</i>	mTOR	Ser2448	Phosphorylierung
11 <i>heat shock protein 27</i>	HSP27	Ser78	Phosphorylierung
12 <i>Bad</i>	Bad	Ser112	Phosphorylierung
13 <i>p70 S6 kinase</i>	p70S6K	Thr389	Phosphorylierung
14 <i>proline-rich Akt substrate 40kDa</i>	PRAS40	Thr246	Phosphorylierung
15 <i>tumor suppressor p53</i>	p53	Ser15	Phosphorylierung
16 <i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>	p38	Thr180/Tyr182	Phosphorylierung
17 <i>stress-activated kinases/ c-Jun N-terminal kinases</i>	SAPK/JNK	Thr183/Tyr185	Phosphorylierung
18 <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>	PARP	Asp214	Spaltung
19 <i>Caspase-3</i>	Caspase-3	Asp175	Spaltung
20 <i>glycogen synthase kinase-3β</i>	GSK-3 β	Ser9	Phosphorylierung

Nur die grau hinterlegten Zielmoleküle konnten mit dem Array detektiert werden, da bei diesen Spezies-Kreuzreaktivität zur Ratte bestand.

A) Generierung der Proteinproben

Zur Isolation der Proteine für die Phosphorylierungsuntersuchung wurde der 1x *Cell Lysis Buffer* aus dem Kit verwendet. Um transiente und permanente Effekte der Hormonbehandlungen zu untersuchen, welche sich auch mit den Ergebnissen aus den

Western Blots vergleichen lassen, wurde 6h und 24h als Untersuchungszeitpunkte gewählt. Um den Phosphorylierungsstatus zu erhalten bzw. um die Proteine vor Abbau zu schützen, wurden der Puffer mit *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail* versetzt. Für die Isolation wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Zellsuspension in 50ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die *wells* mit DPBS gewaschen und die Waschlösung ebenfalls zum Röhrchen hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 300g für 10min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 500µl in 1x *Cell Lysis Buffer* resuspendiert. Nach dem Transfer in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß wurde die Probe für 10min auf einem Orbital-Mischer lysiert. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert. Die Konzentration der einzelnen Proben wurde mit der Bradford-Methode bestimmt.

B) Durchführung Dot Blot

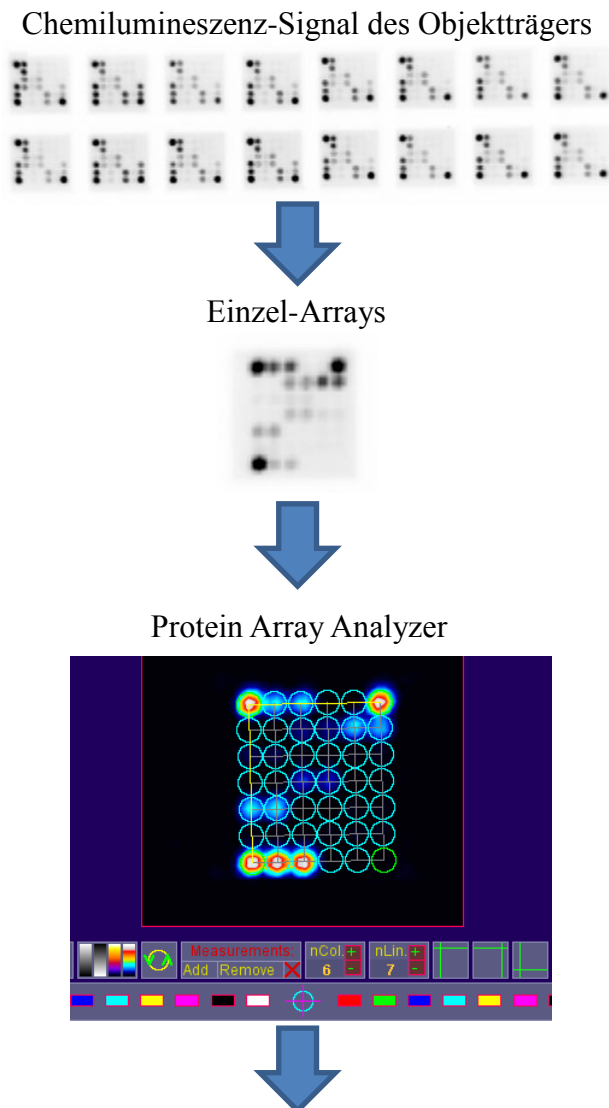
Die Objektträger und der *Blocking* Puffer wurden zuerst auf RT gebracht und die Proben auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde nach Herstellerangaben 1x *Array Wash Buffer*, 1x *Detection Antibody Cocktail* und 1x *HRP-linked Streptavidin* hergestellt. Die Proteinproben wurden so mit *Array Diluent Buffer* verdünnt, dass in 75µl Proteinlösung 75µg Protein (1µg/µl) enthalten waren. Nach dem Zusammenbau des Blots, wurden 100µl *Blocking* Puffer in jedes *well* gegeben und für 15min bei RT auf einem Orbital-Mischer inkubiert. Die *Blocking Lösung* wurde anschließend verworfen und die Proteinlösung in die *wells* hinzugegeben. Die Proteinproben wurden dabei so aufgetragen, dass sich die verschiedenen Experimente mit ihrer jeweiligen Kontrolle (DMSO) auf einem Objektträger befanden.

Die Objektträger wurden für 2h bei RT auf einem Orbital-Mischer inkubiert. Anschließend wurden die Proteinlösungen verworfen und die *wells* 4x 5min mit 100µl 1x *Array Wash Buffer* auf einem Orbital-Mischer gewaschen. Je *well* wurden dann 75 µl 1x *Detection Antibody Cocktail* hinzugegeben und für 1h bei RT auf einem Orbital-Mischer inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und wie zuvor 4x 5min mit 1x *Array Wash Buffer* gewaschen. Danach wurden je *well* 75µl 1x *HRP-linked Streptavidin* hinzugegeben und für 30min bei RT auf einem Orbital-Mischer hinzugegeben. Anschließend wurde wieder wie zuvor mit 1x *Array Wash Buffer* gewaschen. Dann wurde der Blot auseinandgebaut und nur der Objektträger als Ganzes weiterbearbeitet. Nach kurzem Waschen in 1x *Array Wash Buffer* wurde der Objektträger mit einer Mischung aus *LumiGLO* und Peroxidase-Substrat kurz entwickelt. Das Chemilumineszenz-Signal der einzelnen Spots auf dem Objektträger wurde in ein Detektionssystem für Gele und Membranen gemessen.

C) Auswertung

Zur Auswertung der einzelnen Experimente wurde das Chemilumineszenz-Bild eines Objektträgers mit der Software *Image Lab* geöffnet. Das Bild wurde durch Zoomen vergrößert und diese Bildausschnitte dann im tiff-Format gespeichert. In der Software *PowerPoint* (Microsoft) wurden die Bildausschnitte dann so ausgeschnitten und gespeichert, dass ein Array pro Bild enthalten war. Die Einzelbilder wurden wieder im tiff-Format abgespeichert. Zur weiteren Auswertung wurde die Software *ImageJ* (*National Institute of Health*) mit dem Makro *Protein Array Analyzer* verwendet. Durch Ausführung des Makros wurde als erstes der Hintergrund subtrahiert und ein Dialog zur Definition eines Rasters geöffnet [143]. Über die positiv-Kontrollen an drei der äußeren Ränder des Arrays wurde ein Raster definiert und anschließend über den gesamten Array gelegt. Aus der Intensität der Signale in den einzelnen Flächen des Rasters wurden durch die Software entsprechende Daten generiert. Der Workflow für die Auswertung der Arrays ist in Abbildung 8 dargestellt.

Für die weitere Auswertung der Arrays konnten die positiv- und negativ-Kontrollen nicht verwendet werden, weil sie laut Herstellerangaben nicht als Referenz geeignet waren. Um die Ergebnisse zwischen zwei Proben eines Experimentes zu vergleichen, wurden daher die Daten normalisiert. Dafür wurde die mittlere Intensität für beide zu vergleichende Arrays bestimmt und durch Skalierung so prozessiert, dass die mittlere Intensität für beide gleich wurde. Diese Berechnung ist eine sehr einfache Form der Normalisierung und erfolgt auf der Annahme, dass es durch die Behandlung gegenüber der Kontrolle zu keinen Veränderungen kommt. Durch die Angleichung der Daten auf die gleiche mittlere Intensität wird so die Wahrscheinlichkeit für Unterschiede zwischen zwei Proben geringer und damit auch die Wahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiede durch zufällige Unterschiede kleiner. Die so erhaltenen Werte aus den Duplikaten eines Zielmoleküls wurden gemittelt und das Ergebnis dann als Verhältnis gegenüber (dem gemittelten Ergebnis aus) der jeweiligen Kontrolle angegeben. In den Ergebnissen sind nur die Ergebnisse dargestellt, bei denen die Antikörper für Ratte Spezies-kreuzreaktiv und deren Chemilumineszenz-Signal nach 1min Entwicklungszeit auf dem Array sichtbar wurde.

Abbildung 8: Workflow für die Array-Auswertung.

Lin./Col.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
L1	122485	65344	62256	1496	3073	121592
L2	4674	1558	28578	29583	65290	55947
L3	2411	2392	4137	4077	513	1063
L4	631	487	15187	13525	4788	3068
L5	25895	25010	349	234	764	722
L6	4580	2092	632	456	775	643
L7	132171	17805	17039	215	243	219

Vereinfachte Darstellung für die Auswertung des Chemilumineszenz-Signals bei der PathScan-Analyse. Das Chemilumineszenz-Bild eines Objektträgers wurde mit der Software Image Lab und PowerPoint zu Einzelbildern prozessiert. Zur Auswertung wurde die Software ImageJ mit dem Makro Protein Array Analyzer verwendet. Durch Ausführung des Makros wurde als erstes der Hintergrund subtrahiert und ein Dialog zur Definition eines Rasters geöffnet. Über die positiv-Kontrollen an drei der äußeren Ränder des Arrays wurde ein Raster definiert und anschließend über den gesamten Array gelegt. Aus der Intensität der Signale in den einzelnen Flächen des Rasters wurden durch die Software entsprechende Daten generiert.

2.2.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Prism (GraphPad). Die in den Diagrammen angegebenen Werte bestehen aus Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwerts (eng. *standard error of mean*, SEM). Sie sind das Resultat von mindestens vier unabhängigen Experimenten, durchgeführt an unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. bei Zelllinien auch bei unterschiedlichen Passagen. Wenn Mehrfachbestimmungen (Duplikate, Triplikate) durchgeführt wurden, dann wurde das Ergebnis zu N=1 gemittelt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde die einfache Varianzanalyse ANOVA (*one-way analysis of variance*) angewendet. Der multiple Vergleichstest *Tukey's post-hoc* Test ermöglichte die Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen. Außerdem wurde der *Student's t*-Test zur Signifikanzprüfung zweier Proben verwendet. Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ beurteilt. Der Maß der Signifikanz wurde in den Diagrammen wie folgt angegeben: *p $< 0,05$; **p $< 0,01$; ***p $< 0,001$.

3. Ergebnisse

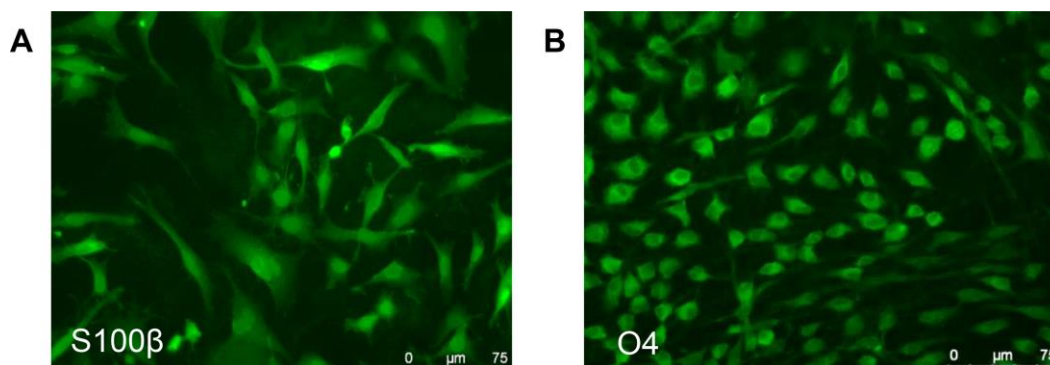
3.1. Charakterisierung der verwendeten Zellen

Die Reinheit der isolierten PDGFR α^+ Primärzellen wurde mittels FACS-Analyse untersucht und betrug 92.22 ± 2.34 % (Mittelwert \pm Standardabweichung). Vor der Isolation befanden sich $5,59 \pm 1,32$ % PDGFR α^+ Zellen in den gesamten Zellen.

Bei den C6 Zellen wurde der Marker S100 β für unreife Astrozyten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 9A). Um den unreifen Charakter der Zellen zu verdeutlichen, wurden die Zellen mit IL-6 behandelt, um die Zellen in reife Astrozyten zu differenzieren. Die Immunfluoreszenzfärbung von β -Aktin zeigte keine morphologischen Veränderungen der Zellen, jedoch zeigte die Western Blot Analyse, dass die Menge an exprimierten GFAP deutlich anstieg (im Mittel 2,95fach höher im Vergleich zu undifferenzierten Zellen; Ergänzende Abbildung 1A-C im Anhang ab Seite 136).

Bei den OLN-93 Zellen wurde der Marker O4 für unreife OLs mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 9B). Um die Eigenschaften weiter zu verifizieren, wurden die Zellen durch Behandlung mit PDGF und bFGF in pre-OLs induziert und durch Behandlung mit CNTF, T₃ und Forskolin in reife OLs induziert. Nach den jeweiligen Behandlungen wurden die OLN-93 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung von β -Aktin auf morphologischen Veränderungen untersucht, sowie eine Western Blot Analyse des Reifemarker CNPase durchgeführt. Die Behandlung mit PDGF und bFGF führte zu einem unreiferen Phänotyp der Zellen mit bipolarer Morphologie, was mit einer niedrigeren Menge an exprimierter CNPase einherging (im Mittel das 0,68fache im Vergleich zu naiven Zellen, Ergänzende Abbildung 2A und C). Die Behandlung mit CNTF, T₃ und Forskolin führte zu einem reiferen Phänotyp mit stark verästelten Prozessen, was mit einer erhöhten Expression von CNPase einherging (im Mittel das 1,67fache im Vergleich zu naiven Zellen, Ergänzende Abbildung 2B-C).

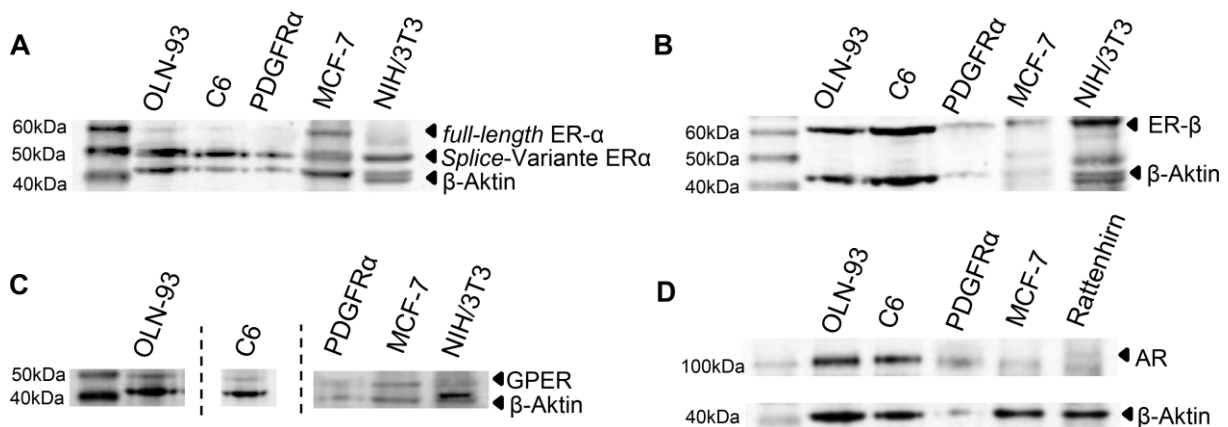
Abbildung 9: Nachweis zelltypspezifischer Marker



(A) Mittels Immunfluoreszenz wurde in C6 Zellen S100 β angefärbt, ein Marker für unreife Astrozyten. (B) In OLN-93 Zellen wurde O4 gefärbt, ein Marker für unreife Oligodendrozyten. Der Maßstabsbalken entspricht 75 μ m.

Die Western Blot Analyse der drei Zelltypen zeigte, dass alle die Rezeptoren ER- α , ER- β , GPER und AR exprimieren (Abbildung 10A-D). Bei allen Zelltypen ist die Bande des 66kDa "full-length" ER- α nur sehr schwach, es gibt jedoch eine deutliche Bande bei einer 50kDa Splice-Variante des ER- α . Auch bei den positiv-Kontrollen (MCF-7 und NIH/3T3 Zellen) sind zelltypspezifische *Splice*-Varianten des Rezeptors sichtbar.

Abbildung 10: Rezeptorausstattung der untersuchten Zelltypen



Die Western Blot Analyse von (A) Östrogenrezeptor- α (*estrogen receptor*[ER]- α), (B) ER- β , (C) G Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor (G protein-coupled ER [GPER]), und (D) Androgenrezeptor (AR) Expression in PDGFR α ⁺ Primärzellen, C6, und OLN-93 Zellen. MCF-7, NIH/3T3 Zelllysate und adultes Rattenhirnlysate wurden für positiv-Kontrollen verwendet.

Bei den OLN-93 Zellen wurde zuvor noch nicht das Geschlecht beschrieben. Die Untersuchung mittels PCR ergab keine Amplifikation des für männliche Ratten spezifischen SRY-Gens, weshalb es sich bei den OLN-93 um weibliche Zellen handelt (Ergänzende Abbildung 3). Von den C6 Zellen war bereits bekannt, dass es sich um männliche Zellen handelt. Dementsprechend wurde bei der Untersuchung der Zellen mittels PCR eine Amplifikation des SRY-Gens nachgewiesen. Bei den PDGFR α ⁺ Primärzellen handelte es sich um eine Mischkultur aus männlichen und weiblichen Zellen, da die Gehirne der Tiere ohne Rücksicht auf das Geschlecht gepoolt wurden.

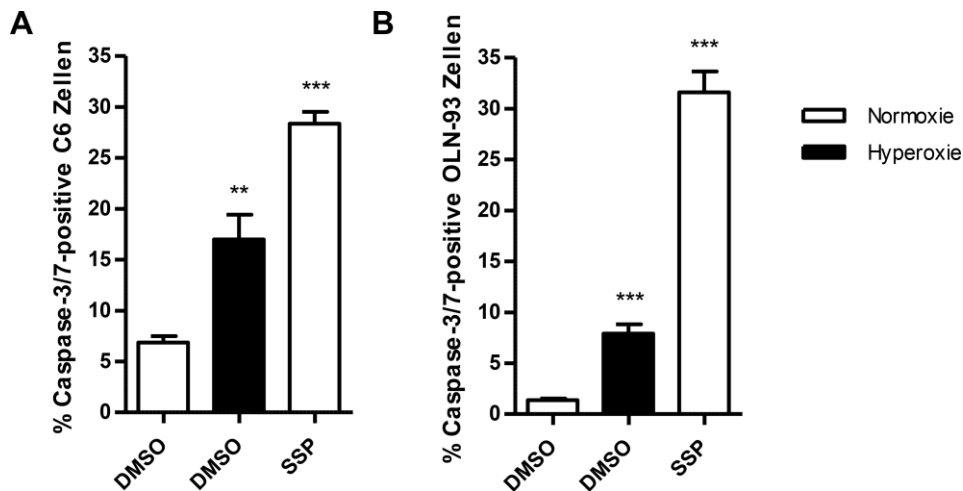
3.2. Einfluss von BSO, Zeit und Zelldichte und auf Hyperoxie-induzierten Zelltod

Da im Gegensatz zu früheren Publikationen [48, 92] Hyperoxie (80% O₂) allein in den OLN-93 Zellen nicht mehr zu einer ausreichenden Induktion von Zelltod geführt hatte, wurde Buthionin-sulfoximin (BSO) verwendet, um die intrazelluläre Glutathionsynthese zu hemmen. BSO reduzierte so die antioxidative Kapazität der Zellen und imitiert so die Situation in Frühgeborenen. Die Auswirkungen von BSO wurden mittels FACS-Analyse des Zelltod-Markers Sytox untersucht. Bei einer Konzentration von 100µM BSO im Medium konnte eine signifikante Schädigung der Zellen unter Hyperoxie erreicht werden, während sich BSO unter Normoxie (21% O₂) nicht auf das Überleben der OLN-93 Zellen auswirkte (Ergänzende Abbildung 4). Deshalb wurde BSO für die im Folgenden dargestellten Experimente ohne weitere Kennzeichnung zum experimentellen Medium der OLN-93 Zellen gegeben.

Um den Einfluss von Zeit und Zelldichte auf die Schädigung der Zellen zu untersuchen, wurde die Viabilität der C6 und OLN-93 Zellen unter Hyperoxie bei verschiedenen Zelldichten zu verschiedenen Zeitpunkten mittels MTT-Assay untersucht. In beiden Zelllinien führte die Hyperoxie nach 48h bei einer Zelldichte von 40.000 Zellen/0,35cm² zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität (0,35cm² entspricht der Fläche eines *well* der verwendeten 96*well*-Platten; Ergänzende Abbildung 5A-D). Deshalb wurde eine Dauer von 48h Hyperoxie bei 40.000 Zellen/*well* für die folgenden Experimente mit C6 und OLN-93 Zellen gewählt.

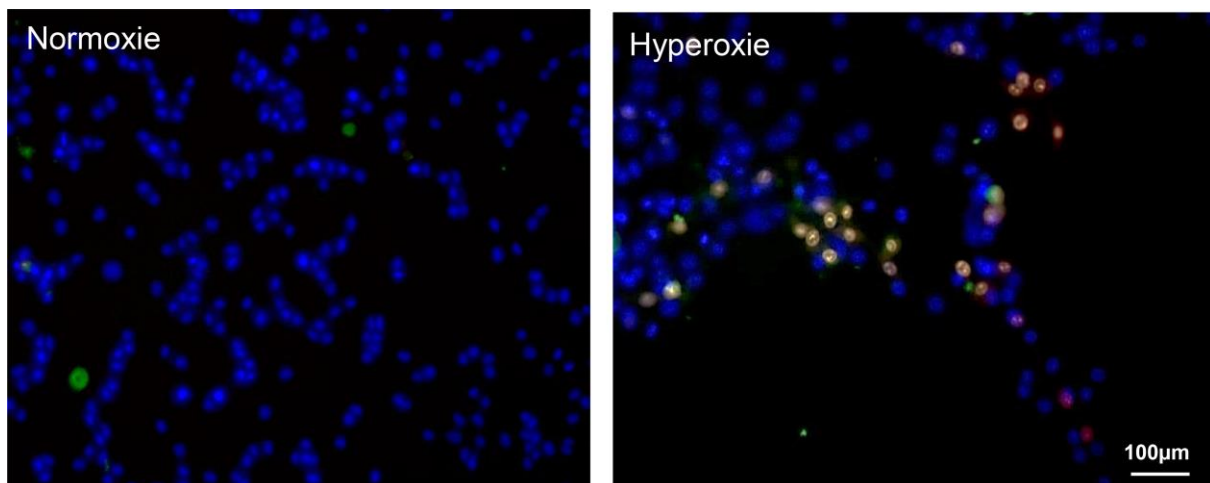
3.3. Nachweis der Art des Zelltods

Die Art des Zelltods wurde mittels FACS-Analyse des Apoptose-Markers (aktivierte) Caspase-3/7 bestimmt. Als positiv-Kontrolle für Apoptose wurde Staurosporin verwendet. Sowohl bei den mit Staurosporin behandelten Zellen als auch bei den Hyperoxie-geschädigten Zellen beider Zelllinien kam es zu einem signifikanten Anstieg an aktivierter Caspase-3/7-positiven Zellen gegenüber den Zellen unter Normoxie (Abbildung 11A-B). Folglich wird durch Hyperoxie Apoptose in C6 und OLN-93 Zellen induziert.

Abbildung 11: Induktion von Apoptose durch Hyperoxie und Staurosporin

FACS-Analyse der Caspase-3/7-Aktivierung in (A) C6 und (B) OLN-93 Zellen unter Normoxie, nach 48h Hyperoxie und nach Behandlung mit 0,5µM Staurosporin (SSP). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (weißer Balken mit DMSO) sind dargestellt als ** $p < 0.001$ und *** $p < 0.0001$. Weiße Balken repräsentieren Normoxie und schwarze Balken Hyperoxie.

Der Apoptose-induzierende Effekt der Hyperoxie konnte ebenfalls bei Fluoreszenz-Färbungen mit Hilfe des Apoptose-Marker Annexin V und dem Zelltod-Marker PI nachgewiesen werden. Unter Hyperoxie wurden im Vergleich zur Normoxie deutlich mehr Zellen durch beide Marker angefärbt (Abbildung 12).

Abbildung 12: Repräsentatives Beispiel für OLN-93 Zellen bei Normoxie bzw. Hyperoxie.

Repräsentatives Beispiel für die Fluoreszenz-Färbung von OLN-93 Zellen unter Normoxie (links) und Hyperoxie (rechts). Hoechst (blau) markiert alle intakten Zellen, wohingegen Propidiumiodid (rot) tote Zellen färbt. Phosphatidylserin (PS) wird während dem Prozess der Apoptose auf die äußere Zellmembran umgelagert. Dieses extrazelluläre PS kann dann durch die Anbindung von PS an fluoreszenzgekoppeltes Annexin V (grün) nachgewiesen werden. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

3.4. Effekt von E2 auf Hyperoxie-induzierten Zelltod

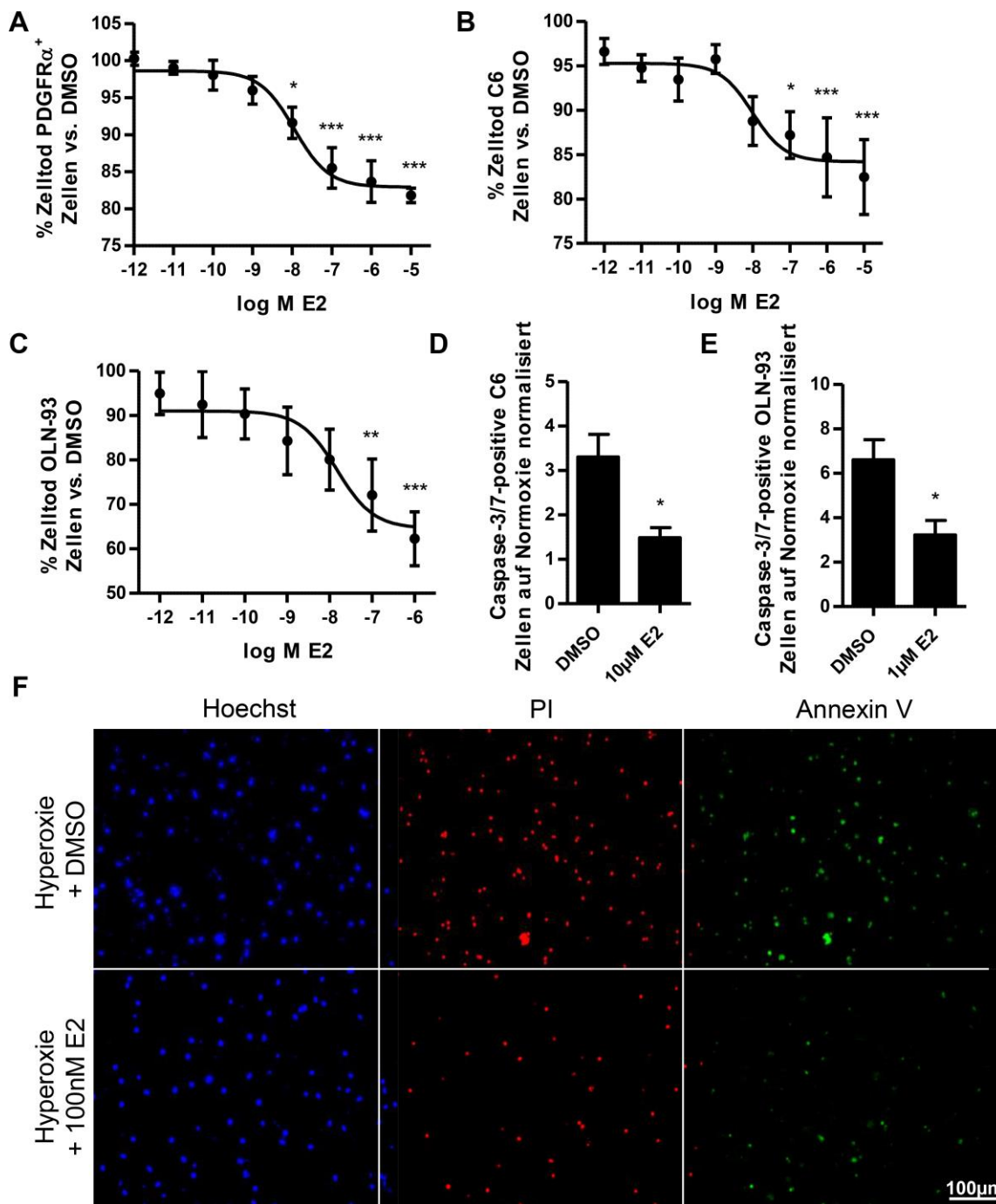
Um zu untersuchen, ob E2 vor Hyperoxie-vermittelter Apoptose schützt, wurden PDGFR α^+ Primärzellen wie zuvor für primäre pre-OLs beschrieben für 12h mit verschiedenen Konzentrationen E2 bzw. DMSO präinkubiert und anschließend für 12h mit Hyperoxie geschädigt [92]. Die Messung des Zelltods im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen ergab einen signifikanten dosisabhängigen protektiven Effekt von E2 in PDGFR α^+ Primärzellen. Der Median der wirksamen Konzentration (*median effective concentration*; EC₅₀) betrug $1,14 \times 10^{-8}$ M (Abbildung 13A).

C6 und OLN-93 Zellen wurden für 2h mit verschiedenen Konzentrationen E2 bzw. DMSO präinkubiert und anschließend für 48h mittels Hyperoxie geschädigt. Die Messung des Zelltods im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen ergab bei beiden Zelltypen einen signifikanten dosisabhängigen protektiven Effekt mit einem EC₅₀ von $5,34 \times 10^{-8}$ M in C6 Zellen und einem EC₅₀ von $1,48 \times 10^{-8}$ M in OLN-93 Zellen (Abbildung 13B-C).

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurden C6 und OLN-93 Zellen unter den gleichen experimentellen Bedingungen zusätzlich mittels FACS-Analyse von aktivierter Caspase-3/7 untersucht. Die Präinkubation mit E2 führte zu einer signifikanten Reduktion aktivierter Caspase-3/7-positiver Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten C6 und OLN-93 Zellen (Abbildung 13D-E).

PDGFR α^+ Primärzellen wurden mit E2 bzw. DMSO vorbehandelt und nach Hyperoxie-Behandlung mit Hoechst, Annexin V und PI gefärbt. Bei E2-behandelten Zellen befanden sich deutlich weniger Annexin V-positive apoptotische und PI-positive tote Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (Abbildung 13F). Zusätzlich führte die Behandlung mit E2 im Gegensatz zu DMSO zu einer reiferen Morphologie der Zellen mit stark verästelten Prozessen, was für eine Induktion der Differenzierung durch E2 spricht. Zusammenfassend schützte die Vorbehandlung mit E2 dosisabhängig signifikant in allen drei untersuchten Zelltypen vor Hyperoxie-vermittelter Apoptose.

Abbildung 13: E2 schützt dosisabhängig vor Hyperoxie-induzierten Zelltod



Untersuchung der E2-vermittelten Protektion. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. (A) PDGFR α^+ Primärzellen wurden für 12h mit verschiedenen Konzentrationen von E2 oder DMSO vorbehandelt, gefolgt von 12h Hyperoxie. Anschließend wurde die Zelltodrate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Nach 2h Vorbehandlung mit E2 oder DMSO und 48h Hyperoxie, wurde die Zelltodrate von (B) C6 und (C) OLN-93 Zellen mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (DMSO) sind dargestellt als * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, und *** $p < 0.0001$. Mittels FACS-Analyse wurde die Caspase-3/7-Aktivierung von E2- und DMSO-vorbehandelten (D) C6 und (E) OLN-93 Zellen nach 48h Hyperoxie untersucht. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (DMSO) sind dargestellt als * $p < 0.05$. Schwarze Balken repräsentieren Hyperoxie. (F) PDGFR α^+ Primärzellen wurden 12h mit 100nM E2 oder DMSO vorbehandelt und dann für 12h der Hyperoxie ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst, Propidiumiodid

(PI) und Annexin V versetzt, um vitale, tote und apoptotische Zellen anzufärben. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

3.5. Effekt von ER-Antagonisten auf E2-vermittelte Protektion

Um die an der E2-vermittelten Protektion beteiligten Rezeptoren in den verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, wurden folgende Agonisten und Antagonisten verwendet: der ER- α - β -Antagonist und GPER-Agonist ICI, der GPER-Agonist G1 und GPER-Antagonist G36. Die verschiedenen Zelltypen wurden wie zuvor beschrieben mit DMSO, E2, Agonisten und Antagonisten präinkubiert und dann mit Hyperoxie geschädigt. Anschließend wurde das Maß an Zelltod mittels Vitalitätsassays gemessen.

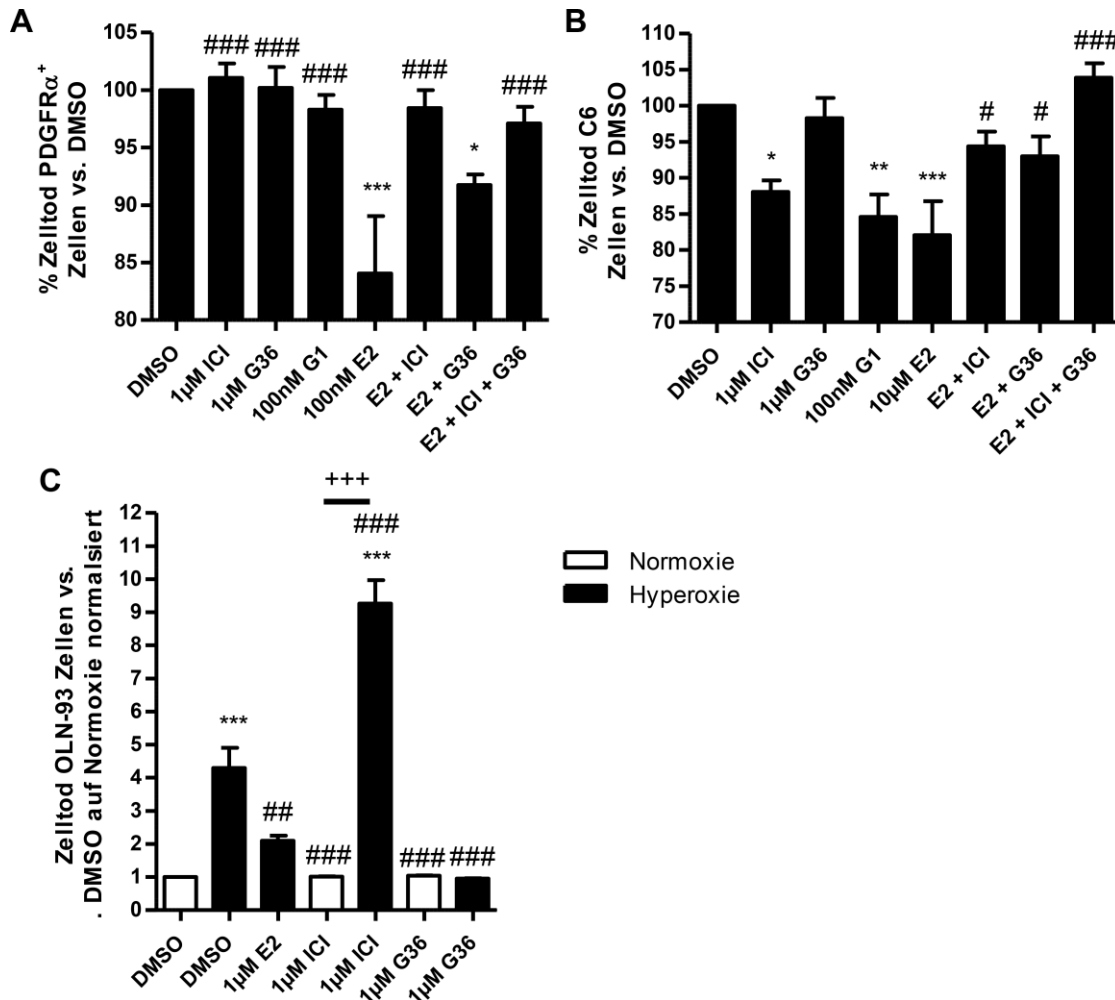
Keines der verwendeten Agonisten oder Antagonisten veränderte das Überleben der PDGFR α ⁺ Primärzellen. Wenn die Zellen jedoch gleichzeitig mit E2 und ICI behandelt worden sind, wurde der protektive Effekt von E2 signifikant blockiert (Abbildung 14A). Die zeitgleiche Behandlung mit E2 und G36 konnte die signifikante Protektion durch E2 nicht inhibieren. Die Zugabe von ICI und G36 zu E2 führte zu einem Anstieg des Zelltods auf das Maß von DMSO-behandelten Zellen. Daher scheint es keinen rezeptorunabhängigen Mechanismus zu geben und folglich wird in PDGFR α ⁺ Primärzellen der protektive Effekt von E2 nur über klassische ERs (ER- α /- β) vermittelt.

In C6 Zellen führte bereits die Einzelbehandlung mit ICI und G1 zu signifikanter Protektion (Abbildung 14B). Wenn die Zellen zeitgleich mit E2 und ICI bzw. E2 und G36 behandelt worden sind, wurde die Protektion signifikant inhibiert. Die Zugabe von ICI und G36 zu E2 führte zu einem Anstieg des Zelltods auf das Maß von DMSO-behandelten Zellen. Daher scheint es keinen rezeptorunabhängigen Mechanismus zu geben und folglich wird in C6 Zellen der protektive Effekt von E2 über klassische ERs und den nicht-klassischen ER GPER vermittelt.

In den OLN-93 Zellen führte unter Hyperoxie die Einzelbehandlung mit ICI zu massiven Zelltod, während die Einzelbehandlung mit G36 signifikant vor Zelltod schützte (Abbildung 14C). Im Gegensatz dazu hatten beide Einzelbehandlungen unter Normoxie keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Die Induktion des Zelltods durch ICI könnte auf einer Abhängigkeit der Zelllinie für *Survival Signaling* (Überlebenssignalwege) durch klassische ERs weisen, wie es häufig in Tumorzellen vorkommt [144]. Aufgrund dieser starken Reaktion der Zellen auf die Antagonisten war es nicht möglich Rückschlüsse aus der Behandlung mit E2 und ICI bzw. E2 und G36 zu ziehen (Daten nicht gezeigt). Daraus ergibt

sich jedoch, dass nur die klassischen ERs das Potential für die Vermittlung der Protektion haben, wobei sich rezeptorunabhängige Mechanismen nicht ausschließen lassen.

Abbildung 14: Klassische und nicht-klassische ERs sind an der E2-vermittelten Protektion beteiligt



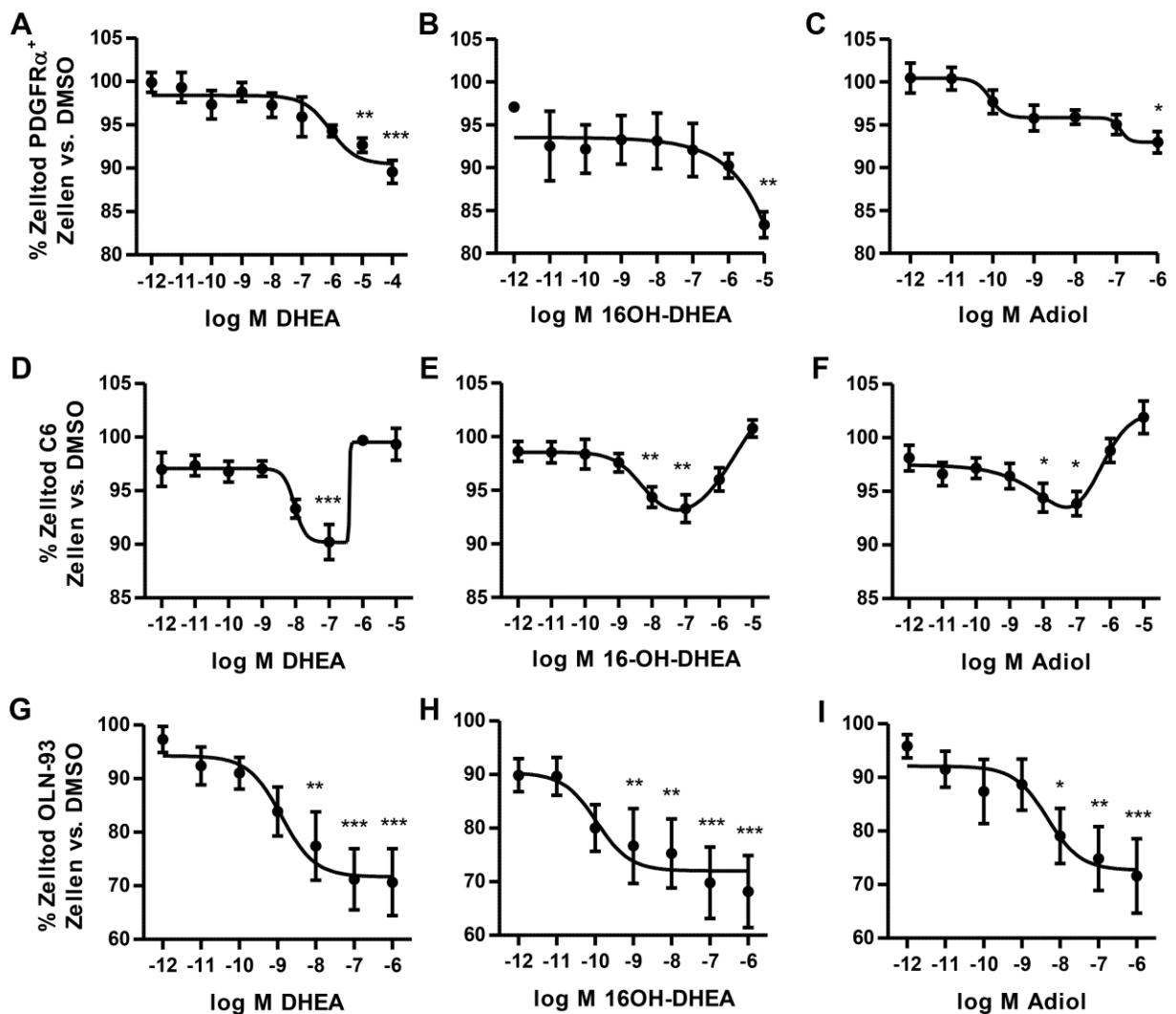
Untersuchung der an der E2-vermittelten Protektion beteiligten Rezeptoren mit Hilfe von ER- α / β -Antagonist und GPER-Agonist ICI 182,780 (ICI), sowie der GPER-Agonist G1, und GPER-Antagonist G36. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Nach der zuvor beschriebenen Behandlung und Schädigung von (A) PDGFR α ⁺ Primärzellen und (B) C6 Zellen, wurde die Zelltodrate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * p<0.05, ** p<0.001, und *** p<0.0001; signifikante Unterschiede zu E2-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als # p<0.05, ## p<0.001, und ### p<0.0001. (C) Die OLN-93 Zellen wurden wie zuvor beschrieben vorbehandelt und geschädigt. Das Ergebnis der Vitalitätsassays wurde auf die Normoxie normalisiert. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als * p<0.05, ** p<0.001, und *** p<0.0001; signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als # p<0.05, ## p<0.001, und ### p<0.0001. Signifikante Unterschiede bei einer Behandlung zwischen Normoxie und Hyperoxie sind dargestellt als +++ p<0.0001. Weiße Balken repräsentieren Normoxie und schwarze Balken Hyperoxie.

3.6. Effekt von Fetalzonensteroiden auf Hyperoxie-induzierten Zelltod

Um zu untersuchen, ob die Fetalzonensteroiden DHEA, 16OH-DHEA und Adiol ebenfalls vor Hyperoxie-vermitteltem Zelltod schützen, wurden sie unter den gleichen Bedingungen wie E2 in PDGFR α^+ Primärzellen, OLN-93 und C6 Zellen angewendet. Anschließend wurde das Maß an Zelltod mittels Vitalitätsassays gemessen.

Sowohl die Behandlung mit DHEA als auch mit 16OH-DHEA und Adiol führten in PDGFR α^+ Primärzellen, OLN-93 und C6 Zellen zu dosisabhängiger signifikanter Protektion (Abbildung 15A-I). Während der Kurvenverlauf der Dosis-Antwort-Kurven für PDGFR α^+ Primärzellen und OLN-93 Zellen sigmoidal verlief, zeigte sich bei den C6 Zellen ein U-förmiger Verlauf. In Tabelle 10 sind die EC₅₀ für die einzelnen Fetalzonensteroiden in den untersuchten Zelltypen aufgelistet.

Abbildung 15: Dosisabhängige Protektion durch Fetalzonensteroiden



(A–C) PDGFR α^+ Primärzellen, (D–F) C6 Zellen und (G–I) OLN-93 Zellen wurden wie für E2 zuvor beschrieben vorbehandelt und anschließend mit Hyperoxie geschädigt. Dafür wurden die Zellen mit

den Fetalzonensteroiden DHEA, 16OH-DHEA und Adiol präinkubiert und nach der Schädigung mit Vitalitätsassays untersucht. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, und *** $p < 0.0001$.

Tabelle 10: Median der wirksamen Konzentration (EC_{50}) der Dosis-Antwort-Kurven.

Steroid	PDGFR α^+	C6	OLN-93
E2	1.14×10^{-8} M	5.34×10^{-8} M	1.48×10^{-8} M]
DHEA	8.58×10^{-7} M	9.35×10^{-9} M*	1.27×10^{-9} M
16OH-DHEA	3.24×10^{-6} M	4.33×10^{-9} M*	1.1×10^{-10} M
Adiol	1.23×10^{-10} M	1.28×10^{-7} M*	4.64×10^{-9} M

* Erster EC_{50} -Wert der U-förmigen Dosis-Antwort-Kurve.

Um dieses Ergebnis am Beispiel von DHEA zu validieren, wurden C6 und OLN-93 Zellen unter den gleichen experimentellen Bedingungen zusätzlich mittels FACS-Analyse von aktivierter Caspase-3/7 untersucht. Die Präinkubation mit DHEA führte zu einer signifikanten Reduktion aktivierter Caspase-3/7-positiver Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten C6 und OLN-93 Zellen (Ergänzende Abbildung 6A-B).

PDGFR α^+ Zellen wurden mit DHEA bzw. DMSO vorbehandelt und nach Hyperoxie-Behandlung mit Hoechst, Annexin V und PI gefärbt. Bei DHEA-behandelten Zellen befanden sich deutlich weniger Annexin V-positiv apoptotische und PI-positiv tote Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (Ergänzende Abbildung 6C).

Zusammenfassend schützt die Vorbehandlung mit allen untersuchten Fetalzonensteroiden dosisabhängig signifikant in allen drei untersuchten Zelltypen vor Hyperoxie-vermittelter Apoptose.

3.7. Effekt von ER- und AR-Antagonisten auf DHEA-vermittelte Protektion

Im nächsten Schritt wurden am Beispiel von DHEA die Rezeptoren untersucht, welche an der Fetalzonensteroid-vermittelten Protektion beteiligt sind. Es wurden folgende Agonisten und Antagonisten verwendet: der ER- α -/ β -Antagonist und GPER-Agonist ICI, GPER-Antagonist G36 und der AR-Antagonist CDX. Die verschiedenen Zelltypen wurden wie zuvor beschrieben mit DMSO, DHEA, Agonisten und Antagonisten präinkubiert und dann mit

Hyperoxie geschädigt. Anschließend wurde das Maß an Zelltod mittels Vitalitätsassays gemessen.

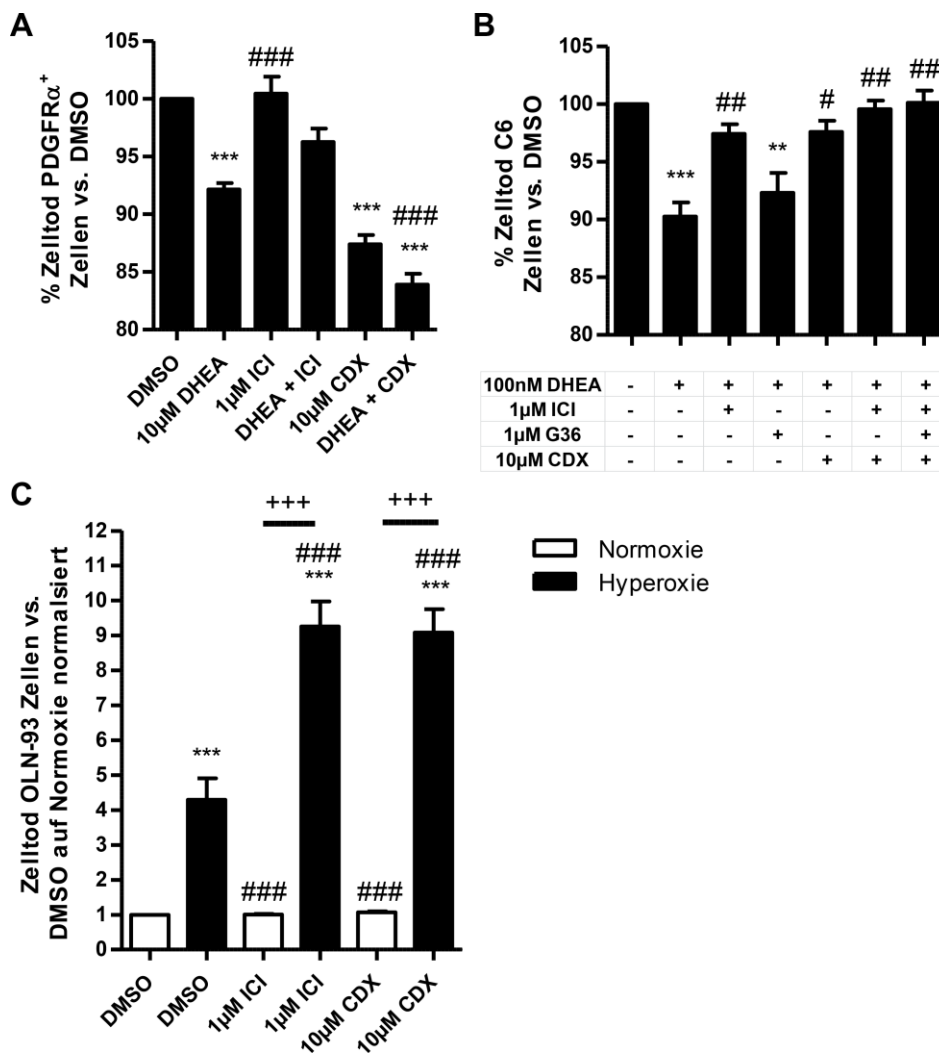
In PDGFR α^+ Primärzellen führte die Einzelbehandlung mit CDX zu einer signifikanten Reduktion von Zelltod, was für proapoptotisches *Signaling* über den AR spricht (Abbildung 16A). Während die zeitgleiche Behandlung mit DHEA und ICI zum signifikanten Verlust der DHEA-vermittelten Protektion führte, wurde durch die zeitgleiche Behandlung mit DHEA und CDX die durch DHEA-vermittelte Protektion signifikant gesteigert. Durch diesen (additiven) protektiven Effekt von CDX war es nicht möglich zu untersuchen, ob andere Rezeptoren an der DHEA-vermittelten Protektion beteiligt sind. Jedoch wird ein signifikanter Teil der Protektion durch DHEA in PDGFR α^+ Primärzellen über klassische ERs vermittelt.

In C6 Zellen beeinflusste die Einzelbehandlung mit CDX das Überleben der Zellen nicht (Abbildung 16B). Die zeitgleiche Behandlung mit DHEA und ICI bzw. mit DHEA und CDX führte zu einer signifikanten Reduktion der DHEA-vermittelten Protektion. Die Behandlung der Zellen mit DHEA und G36 hatte keinen Einfluss auf die DHEA-vermittelte Protektion. Die Behandlung mit DHEA und allen drei Antagonisten gleichzeitig führte zu einem Verlust der Protektion auf das Niveau von DMSO-behandelten Zellen. Dadurch gibt es vermutlich keine weiteren protektive Wege neben den untersuchten Rezeptoren. Der protektive Effekt von DHEA in C6 Zellen wird daher über klassische ERs und den AR vermittelt.

In OLN-93 Zellen führte die Einzelbehandlung mit CDX zu massiven Zelltod wie bei der Behandlung mit ICI (Abbildung 16C und Ergänzende Abbildung 7). Auch im Fall von CDX wurde das Überleben der Zellen unter Normoxie nicht beeinflusst. Die Induktion des Zelltods durch CDX könnte daher neben der Abhängigkeit von *Survival Signaling* über die klassischen ERs auch auf eine Abhängigkeit der Zelllinie von *Signaling* über den AR zum Überleben der Zelllinie weisen. Aufgrund dieser starken Reaktion der Zellen auf CDX war es nicht möglich Rückschlüsse aus der Behandlung mit DHEA und CDX zu ziehen (Daten nicht gezeigt). Daraus ergibt sich jedoch, dass die klassischen ERs und der AR das Potential besitzen, die Protektion von DHEA zu vermitteln.

Tabelle 11 fasst die (mutmaßlich) an der Protektion von E2 und DHEA beteiligten Rezeptoren für die drei untersuchten Zelltypen zusammen.

Abbildung 16: An der DHEA-vermittelten Protektion beteiligte Rezeptoren



Um die an der DHEA-vermittelten Protektion beteiligten Rezeptoren zu untersuchen, wurden ICI, G36, und der AR-Antagonist Bicalutamid (Casodex; CDX) verwendet. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Nach der zuvor beschriebenen Vorbehandlung und Schädigung von (A) PDGFR α^+ Primärzellen und (B) C6 Zellen, wurde die Zelltodrate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als ** $p < 0.001$ und *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zu DHEA-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$, und ### $p < 0.0001$. (C) Die OLN-93 Zellen wurden wie zuvor beschrieben vorbehandelt und geschädigt. Das Ergebnis der Vitalitätsassays wurde auf die Normoxie normalisiert. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als ### $p < 0.0001$. Signifikante Unterschiede einer Behandlung zwischen Normoxie und Hyperoxie sind dargestellt als +++ $p < 0.0001$. Weiße Balken repräsentieren Normoxie, schwarze Balken Hyperoxie.

Tabelle 11: An der Protektion beteiligte Rezeptoren

Rezeptor	PDGFR α		C6		OLN-93	
	E2	DHEA	E2	DHEA	E2	DHEA
ER- α / β	+	+	+	+	(+)	(+)
GPER	-	-	+	-	-	-
AR		-		+		(+)

+, vermittelt Protektion; -, vermittelt nicht Protektion; (+), besitzt das Potential Protektion zu vermitteln.

3.8. Auswirkung der Inhibition von Aromatasen auf Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion

Die CYP19-Aromatase ist in der Lage die untersuchten Fetalzonensterioide intrazellulär so umzuwandeln, dass sie dadurch stärker mit den ERs wechselwirken können. Durch Inhibition dieser Aromatase mit Exe wurde untersucht, ob in den untersuchten Zelltypen Aromatasen aktiv sind und inwieweit diese Umwandlung sich auf die Protektion auswirkt.

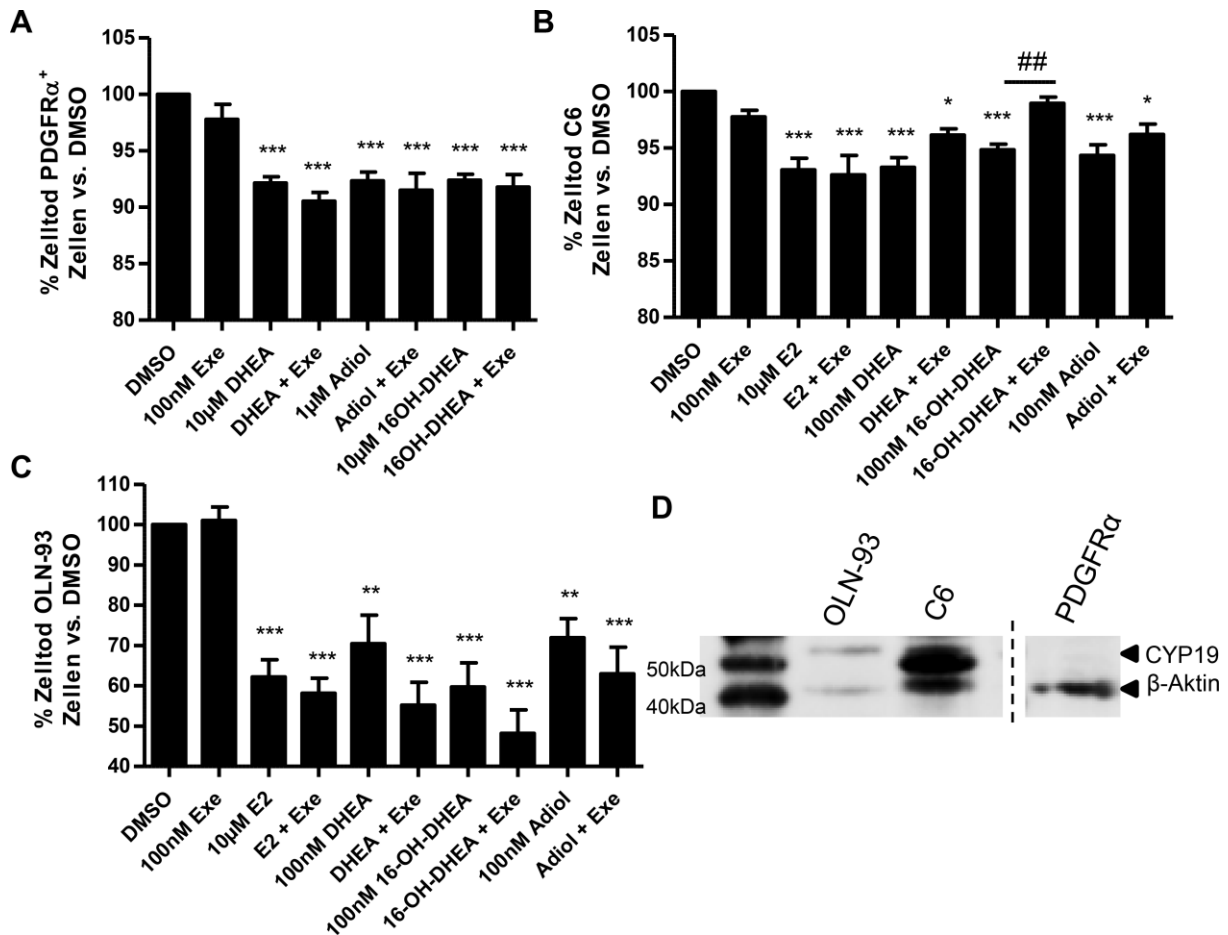
In PDGFR α ⁺ Primärzellen hatte die Einzelbehandlung mit Exe keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen (Abbildung 17A). Auch die zeitgleiche Behandlung von Exe mit DHEA, 16OH-DHEA bzw. Adiol hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen.

In C6 Zellen hatte die Einzelbehandlung mit Exe keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen (Abbildung 17B). Die zeitgleiche Behandlung von Exe mit den DHEA, 16OH-DHEA bzw. Adiol führte zu einer Reduktion der protektiven Eigenschaften der Fetalzonensterioide. Diese Reduktion war jedoch nur im Fall von 16OH-DHEA signifikant und führte hier zu einem vollständigen Verlust der Protektion. Folglich gibt es CYP19-Aromatasen in C6 Zellen, welche die Fetalzonensterioide in östrogenere Moleküle umwandeln. Diese umgewandelten Moleküle haben ein höheres protektives Potenzial als nicht-umgewandelte Fetalzonensterioide.

In OLN-93 Zellen hatte die Einzelbehandlung mit Exe keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen (Abbildung 17C). Die zeitgleiche Behandlung von Exe mit DHEA, 16OH-DHEA und Adiol führte zu einer nicht-signifikanten Steigerung der Protektion in allen untersuchten Fetalzonensteroiden. Folglich gibt es CYP19-Aromatasen in OLN-93 Zellen, welche die Fetalzonensterioide in östrogenere Moleküle umwandeln. Die nicht-umgewandelten Fetalzonensterioide haben jedoch scheinbar ein tendenziell größeres protektives Potenzial.

Die Expression von CYP19-Aromatasen in den drei Zelltypen wurde mit Western Blots untersucht. CYP19-Aromatasen wurden in C6 und OLN-93 Zellen gefunden, jedoch nicht in den PDGFR α ⁺ Primärzellen (Abbildung 17D).

Abbildung 17: Einfluss von Aromatasen auf die Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion



Um die intrazelluläre Konversion der Fetalzonensteroiden in östrogenere Substanzen zu untersuchen, wurde der CYP19-Aromatase-Inhibitor Exemestan (Exe) verwendet. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Nach wie zuvor beschriebener Vorbehandlung und Schädigung der (A) PDGFR α ⁺ Primärzellen, (B) C6 und (C) OLN-93 Zellen, wurde die Zelltodrate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, und *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zwischen der Fetalzonensteroid-Einzelbehandlung und der Kombinationsbehandlung mit Exe sind dargestellt als ## $p < 0.001$. Schwarze Balken repräsentieren Hyperoxie. (D) Western Blot Analyse der CYP19-Aromatase-Expression in OLN-93, C6, und PDGFR α ⁺ Zellen.

3.9. Einfluss der Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden auf die Protektion

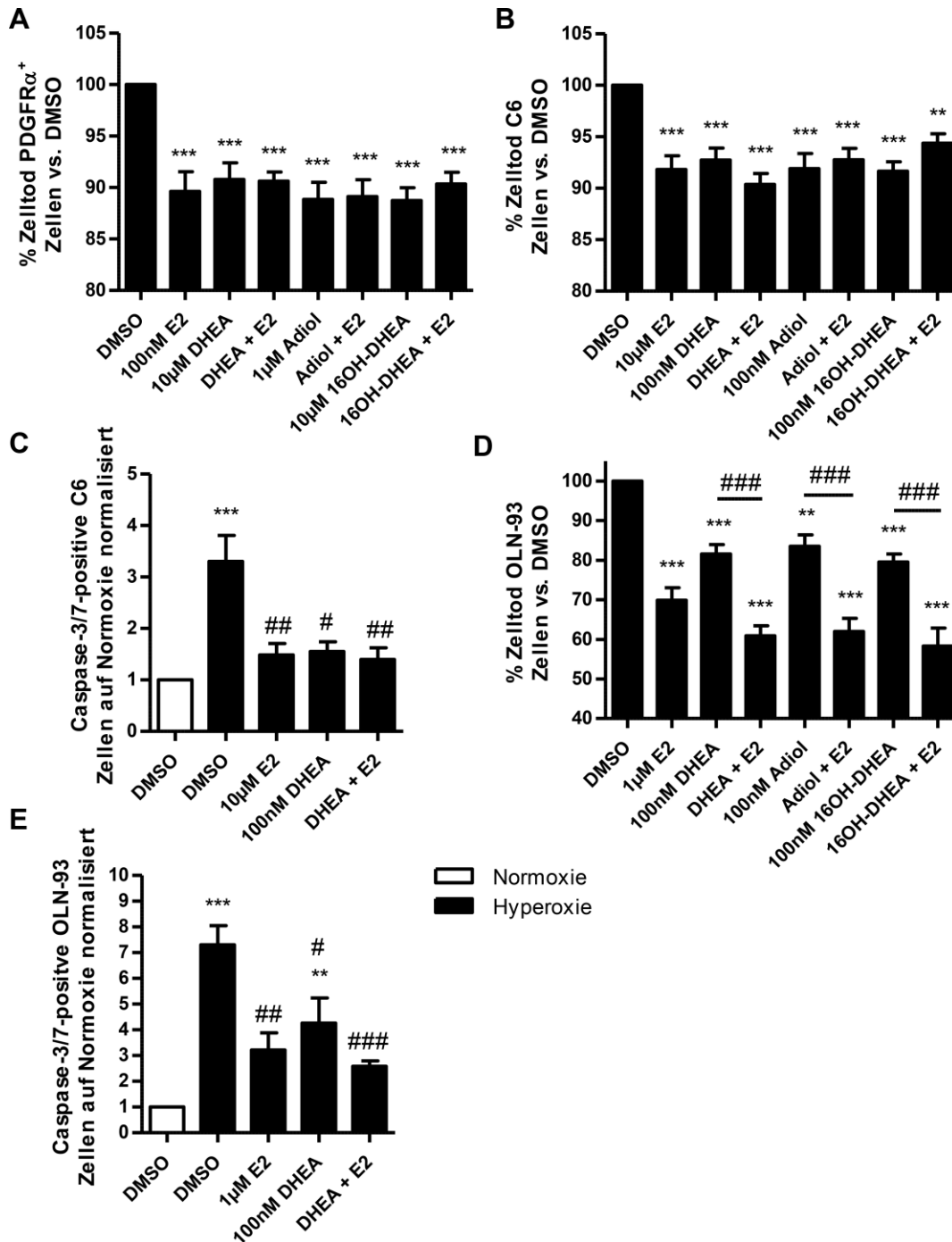
Um den Einfluss der Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden zu untersuchen, wurden die verschiedenen Zelltypen wie zuvor beschrieben mit DMSO, E2, den einzelnen Fetalzonensteroiden und Kombinationen aus E2 mit DHEA, 16OH-DHEA bzw. Adiol präinkubiert und dann mit Hyperoxie geschädigt. Anschließend wurde das Maß an Zelltod mittels Vitalitätsassays und FACS-Analyse von aktivierter Caspase-3/7 gemessen.

In PDGFR α^+ Primärzellen führte die Kombinationsbehandlung von DHEA, 16OH-DHEA bzw. Adiol mit E2 in den Vitalitätsassays nicht zu einer Steigerung des protektiven Effekts im Vergleich zu den Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen (Abbildung 18A).

Auch in den C6 Zellen führte die Kombinationsbehandlung mit E2 nicht zu einer Steigerung der Protektion gegenüber den Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen in den Vitalitätsassays (Abbildung 18B). Dieses Ergebnis wurde durch FACS-Analyse von aktivierter Caspase-3/7 am Beispiel von DHEA verifiziert (Abbildung 18C).

In OLN-93 Zellen führte die Kombinationsbehandlung von DHEA, 16OH-DHEA bzw. Adiol mit E2 jedoch in den Vitalitätsassays zu einer signifikanten Steigerung des protektiven Effekts im Vergleich zu den Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen (Abbildung 18D). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht am Beispiel von DHEA durch FACS-Analyse von aktivierter Caspase-3/7 bestätigen (Abbildung 18E). Dies könnte jedoch der niedrigeren Anzahl an FACS-Experimenten (N= 4) im Gegensatz zu den Vitalitätsassays (N= 7) geschuldet sein.

Folglich kam es durch Kombinationsbehandlung von E2 mit Fetalzonensteroiden nur in den OLN-93 Zellen zu einem synergistischen Effekt auf die Protektion. Bei den PDGFR α^+ Primärzellen und den C6 Zellen ließ sich durch gleichzeitige Zugabe von E2 und Fetalzonensteroiden der protektive Effekt gegenüber den Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen nicht weiter steigern.

Abbildung 18: **Protektion durch Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden**

Um den Effekt der Kombinationsbehandlung auf den Hyperoxie-vermittelten Zelltod zu untersuchen, wurden Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen gegen die Kombinationsbehandlung mit E2 verglichen. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Nach wie zuvor beschriebener Vorbehandlung und Schädigung der (A) PDGFR α^+ Primärzellen und (B) C6 Zellen wurde die Zelltodrate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als ** $p < 0.001$ und *** $p < 0.0001$. (C) Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde mittels FACS-Analyse die Caspase-3/7-Aktivierung in den C6 Zellen gemessen. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als # $p < 0.05$ und ## $p < 0.001$. Weiße Balken repräsentieren Normoxie, schwarze Balken Hyperoxie.

(D) Nach wie zuvor beschriebener Vorbehandlung und Schädigung der OLN-93 Zellen, wurde die Zelltoderate mittels Vitalitätsassays bestimmt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als ** $p < 0.001$ und *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zwischen Fetalzonensteroid-Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen mit E2 sind dargestellt als ### $p < 0.0001$. (E) Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde mittels FACS-Analyse die Caspase-3/7-Aktivierung in den OLN-93 Zellen gemessen. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als ** $p < 0.001$ und *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$, und ### $p < 0.0001$. Weiße Balken repräsentieren Normoxie, schwarze Balken Hyperoxie.

3.10. Die relativen Rezeptordichte unter Hyperoxie und Steroideinfluss

Um zu untersuchen, ob sich durch die Hyperoxie bzw. durch die Behandlung mit den Steroidhormonen die Rezeptordichte verändert, wurde die relative Rezeptordichte von ER- α , ER- β , GPER und AR analysiert. Im Fall von ER- α wurden die Veränderungen der 50kDa *Splice*-Variante quantifiziert, da diese *Splice*-Variante der Menge nach am häufigsten vertreten war. Für die Analyse wurden C6 und OLN-93 Zellen mit DMSO, E2, DHEA bzw. E2 und DHEA präinkubiert und anschließend für 48h Normoxie bzw. Hyperoxie ausgesetzt. Die Menge an Rezeptorproteinen wurde als Verhältnis zu β -Aktin mittels Western Blot berechnet und die relative Rezeptordichte wurde dann aus dem Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie ermittelt.

In C6 Zellen führte weder die Hyperoxie noch die Behandlung mit Steroidhormonen im Vergleich zur Normoxie (DMSO) zu einer Veränderung der relativen Menge von ER- α (Abbildung 19A). Nur zwischen zwei Behandlungen ohne weiteren Zusammenhang bestand ein signifikanter Unterschied. Folglich scheinen weder die Hyperoxie, noch die Steroidhormone einen Einfluss auf die Menge an exprimierten ER- α zu haben.

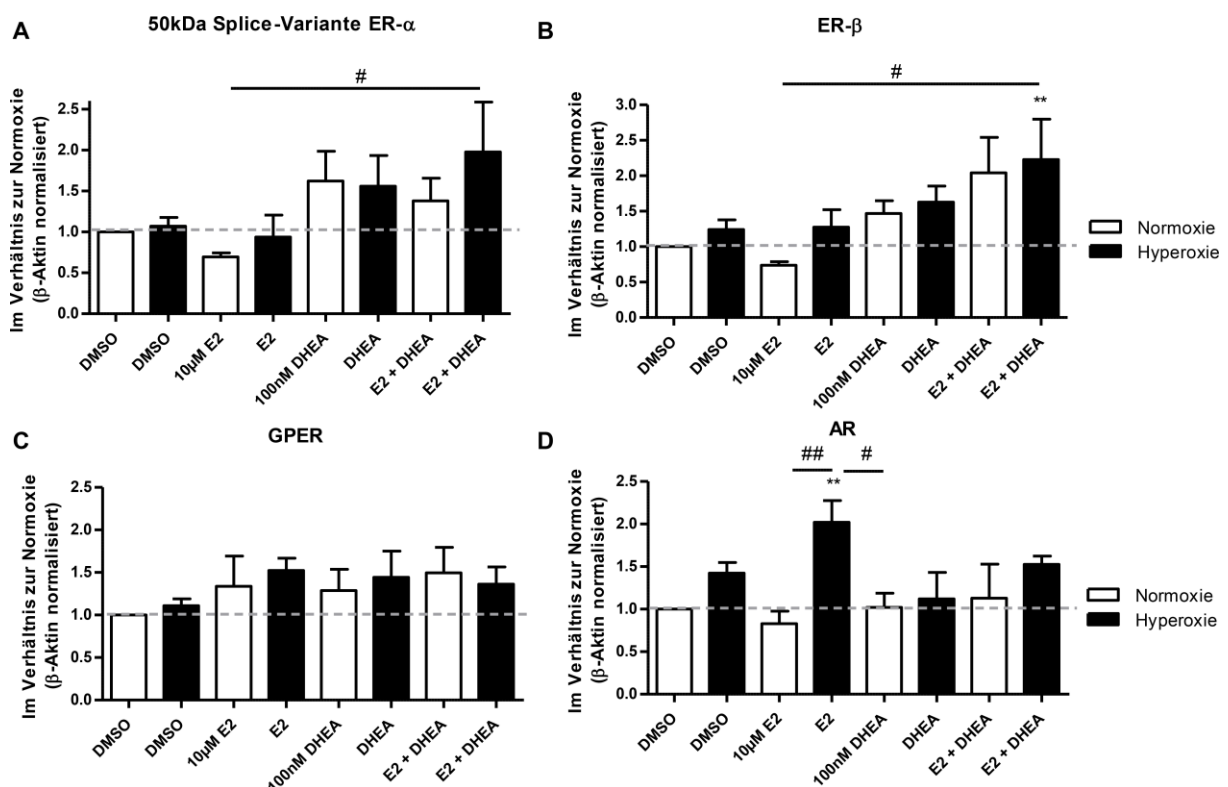
Die relative Quantifizierung von ER- β führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Hyperoxie führte im Vergleich zur Normoxie zu keiner Veränderung der relativen Menge von ER- β (Abbildung 19B). Die Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA führte jedoch unter Hyperoxie zu einem signifikanten Anstieg von exprimierten ER- β im Vergleich zur Normoxie. Zwischen zwei anderen Behandlungen ohne weiteren Zusammenhang bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Folglich scheint die Hyperoxie allein keinen Einfluss auf die Rezeptordichte zu haben. Jedoch konnte die Kombination aus beiden Steroidhormonen unter Hyperoxie signifikant die Menge an exprimierten ER- β steigern.

Weder Hyperoxie noch die Behandlung mit Steroidhormonen führte im Vergleich zur Normoxie zu einer Veränderung der relativen Menge von GPER (Abbildung 19C). Folglich

scheinen weder die Hyperoxie, noch die Steroidhormone einen Einfluss auf die Menge an exprimierten GPER zu haben.

Hyperoxie führte im Vergleich zur Normoxie zu keiner Veränderung der relativen Menge von AR (Abbildung 19D). Die Behandlung mit E2 unter Hyperoxie führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg an AR im Vergleich zur Normoxie. Dieser Anstieg an AR durch E2-Behandlung unter Hyperoxie unterscheidet sich zudem signifikant von der relativen Rezeptordichte durch E2-Behandlung unter Normoxie. Zwischen zwei anderen Behandlungen ohne weiteren Zusammenhang bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Folglich scheint die Hyperoxie unter Einfluss von E2 zu einem signifikanten Anstieg an AR zu führen. Sonst hatten weder die Hyperoxie noch die Steroidhormone allein Einfluss auf die Rezeptordichte.

Abbildung 19: Relative Rezeptordichte durch Hyperoxie und Steroidhormon-Behandlung in C6 Zellen



Um den Einfluss auf die relative Rezeptordichte zu untersuchen, wurden C6 Zellen wie zuvor beschrieben vorbehandelt und geschädigt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Mittels Western Blot Analyse wurde die Rezeptordichte von (A) ER- α , (B) ER- β , (C) GPER und (D) AR bestimmt. Dafür wurden die einzelnen Experimente auf β -Aktin normiert und die Ergebnisse dann in Relation zur Rezeptordichte von DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie angegeben. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als ** p < 0.001; signifikante Unterschiede zwischen zwei Behandlungen sind dargestellt als # p < 0.05 und ## p < 0.001.

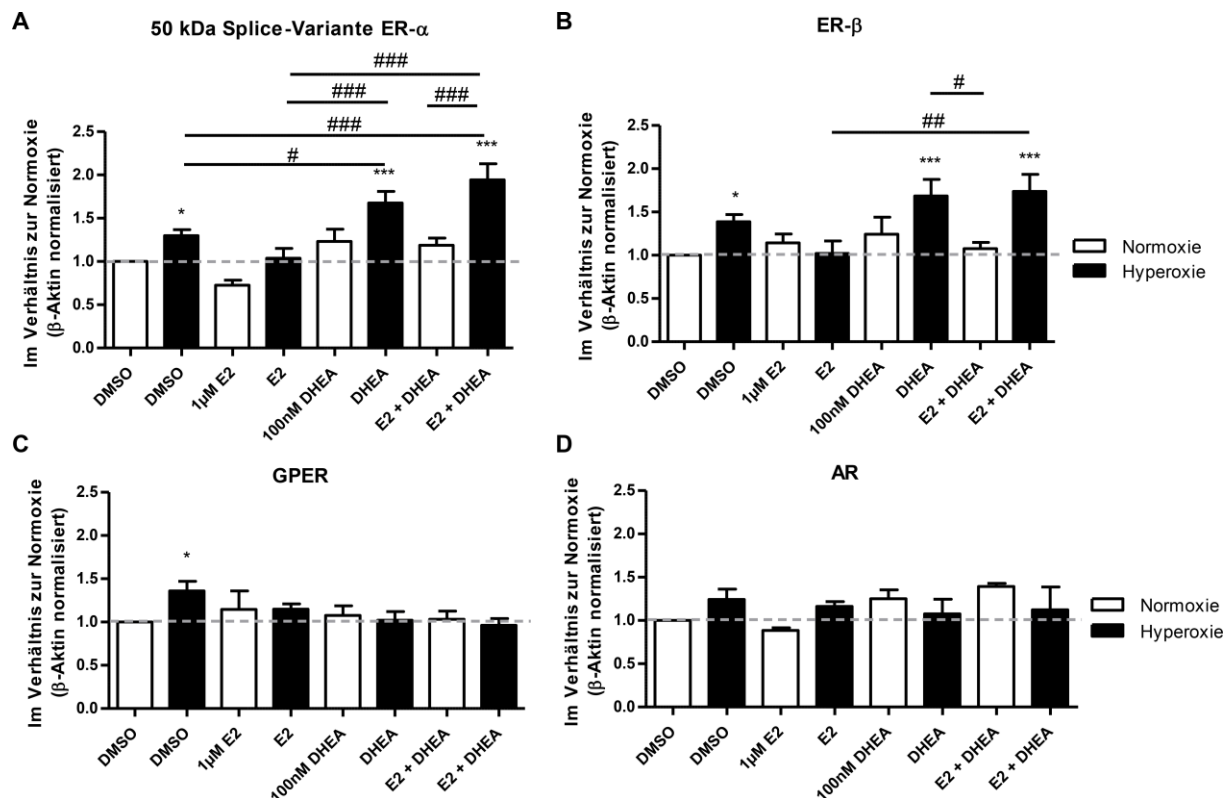
In OLN-93 Zellen führte bereits Hyperoxie allein zu einem signifikanten Anstieg der relativen Menge von ER- α (Abbildung 20A). Aber auch die Behandlung mit DHEA sowie die Kombinationsbehandlung mit DHEA und E2 führten unter Hyperoxie zu einem signifikanten Anstieg von ER- α im Vergleich zur Normoxie (DMSO). Dabei waren beide Behandlungen (DHEA und E2 + DHEA) in der Lage, die relative Rezeptordichte von ER- α gegenüber Zellen unter Hyperoxie (DMSO) nochmals signifikant zu steigern. Zusätzlich bestand ein signifikanter Unterschied in der Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA unter Normoxie gegenüber dieser Behandlung unter Hyperoxie. Zwischen anderen Behandlungen ohne weiteren Zusammenhang bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Folglich scheinen Hyperoxie allein, aber auch die Behandlungen mit DHEA unter Hyperoxie zu einem Anstieg an exprimierten ER- α zu führen. Dabei ist DHEA in der Lage, den von der Hyperoxie initiierten Anstieg an ER- α nochmals signifikant zu steigern.

Die relative Quantifizierung von ER- β führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen. So führte bereits Hyperoxie allein zu einem signifikanten Anstieg der relativen Menge von ER- β (Abbildung 20B). Auch die Behandlung mit DHEA sowie die Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA führten unter Hyperoxie zu einem signifikanten Anstieg von ER- β im Vergleich zur Normoxie. Zusätzlich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen E2-behandelten Zellen unter Hyperoxie und Kombinationsbehandelten Zellen (E2 + DHEA) unter Hyperoxie. Zwischen zwei anderen Behandlungen ohne weiteren Zusammenhang bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Folglich scheinen Hyperoxie allein, aber auch die Behandlungen mit DHEA unter Hyperoxie zu einem Anstieg an exprimierten ER- β zu führen.

Hyperoxie allein führte im Vergleich zur Normoxie zu einem signifikanten Anstieg der relativen Menge von GPER (Abbildung 20C). Weder unter Normoxie noch unter Hyperoxie waren die Steroidhormone in der Lage die relative Rezeptordichte von GPER zu verändern. Folglich scheint nur Hyperoxie allein, jedoch nicht die Behandlung mit Steroidhormonen einen Einfluss auf die Menge an exprimierten GPER zu haben.

Weder Hyperoxie noch die Behandlung mit Steroidhormonen führte im Vergleich zur Normoxie zu einer Veränderung der relativen Menge von AR (Abbildung 20D). Folglich scheinen weder die Hyperoxie, noch die Steroidhormone einen Einfluss auf die Menge an exprimierten AR zu haben.

Abbildung 20: Relative Rezeptordichte durch Hyperoxie und Steroidhormonbehandlung in OLN-93 Zellen



Um den Einfluss auf die relative Rezeptordichte zu untersuchen, wurden OLN-93 Zellen wie zuvor beschrieben vorbehandelt und geschädigt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. Mittels Western Blot Analyse wurde die Rezeptordichte von (A) ER- α , (B) ER- β , (C) GPER und (D) AR bestimmt. Dafür wurden die einzelnen Experimente auf β -Aktin normiert und die Ergebnisse dann in Relation zur Rezeptordichte von DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie angegeben. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als * $p < 0.05$ und *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zwischen zwei Behandlungen sind dargestellt als # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$, und ### $p < 0.0001$.

3.11. Aktivierung des PI3K- und MAPK-Signaltransduktionsweges durch Steroidbehandlungen

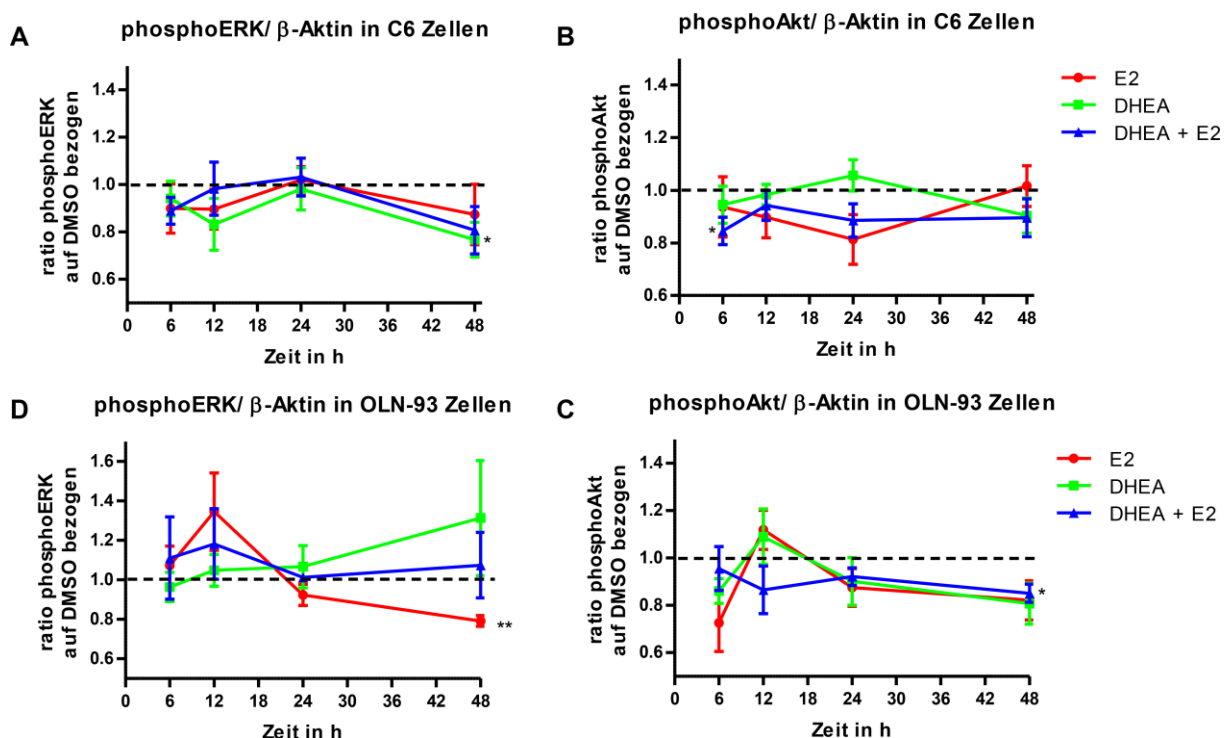
Um auf nicht-genomischer Ebene Faktoren für die protektiven Effekte von E2 und Fetalzonensteroiden zu untersuchen, wurden die MAPK- und PI3K-Signaltransduktionswege untersucht, welche bereits bei E2-vermittelter Protektion beschrieben worden sind. ERK1/2 und Akt wurden als Vertreter dieser Signaltransduktionswege im Western Blot analysiert. Dafür wurden C6 und OLN-93 Zellen 2h mit DMSO, E2, DHEA oder E2 und DHEA inkubiert und anschließend der Hyperoxie ausgesetzt. Die Menge an phosphorylierten bzw. an Gesamtprotein von ERK1/2 und Akt (Ser473) in den Zellen wurde nach 0h, 6h, 12h, 24h und 48h Hyperoxie untersucht. Dadurch konnte der zeitliche Verlauf durch eine Behandlung, aber

auch der Unterschied zwischen steroidhormonbehandelten und DMSO-behandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden. Dafür wurden zuerst die Ergebnisse im Verhältnis zum 0h-Zeitpunkt (=1) berechnet, was der üblichen Darstellungsweise von Zeitverläufen phosphorylierter Proteine entspricht. An den sehr unterschiedlichen Verläufen der jeweiligen DMSO-Kurven wurde jedoch sichtbar, dass es trotz gleicher Behandlung zu individuellen, experimentabhängigen Schwankungen kommt, welche sich auf den Vergleich zwischen Behandlung und DMSO auswirkten (Daten nicht gezeigt). Um diese individuellen Schwankungen der einzelnen Experimente herauszurechnen, wurden die Ergebnisse daher als Verhältnis zur Kontrolle des jeweiligen Experiments dargestellt. Dadurch wurde in beiden Zelltypen der Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung deutlicher.

Mit dieser Darstellung führte in den C6 Zellen die Behandlung mit DHEA nach 48h Hyperoxie zu einem signifikanten Verlust an phosphoryliertem ERK1/2 (Abbildung 21A). Bei der Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA kommt es nach 6h unter Hyperoxie in den C6 Zellen zu einem signifikanten Verlust an phosphoryliertem Akt (Abbildung 21B).

In den OLN-93 Zellen führte die Behandlung mit E2 nach 48h Hyperoxie zu einem signifikanten Verlust an phosphoryliertem ERK1/2 (Abbildung 21C). Bei der Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA kommt es nach 48h unter Hyperoxie zu einem signifikanten Verlust an phosphoryliertem Akt (Abbildung 21D).

Abbildung 21: Ergebnisse der Western Blots nach Normierung auf DMSO



Um den Einfluss der Steroidhormon-Behandlung auf ERK1/2 und Akt zu untersuchen, wurden C6 und OLN-93 Zellen 2h mit DMSO, E2, DHEA oder E2 mit DHEA inkubiert und anschließend für die angegebene Zeit mit Hyperoxie geschädigt. Die Menge an phosphorylierten ERK1/2 und Akt (Ser473) wurde dann nach 6h, 12h, 24h und 48h Hyperoxie im Western Blot untersucht. Für die Auswertung wurden die einzelnen Experimente auf β -Aktin normiert und die Ergebnisse dann in Relation zur Rezeptordichte von DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben. **(A-B)** Bei den C6 Zellen wurden 10 μ M E2 und 100nM DHEA verwendet, **(C-D)** bei den OLN-93 Zellen wurden 1 μ M E2 und 100nM DHEA verwendet. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie zum jeweiligen Zeitpunkt sind dargestellt als * $p < 0.05$ und ** $p < 0.001$.

Die Darstellung dieser Ergebnisse als phosphorylierte Form im Verhältnis zum Standard unterschied sich statistisch nicht von der Darstellung der phosphorylierten Form im Verhältnis zum entsprechenden Gesamtprotein (Tabelle 12). Daher spiegelt auch die Darstellung der phosphorylierten Proteine die tatsächliche Veränderungen des Phosphorylierungsstatus wieder und nicht nur eine Veränderungen der Gesamt-Proteinmenge.

Tabelle 12: Statistischer Vergleich der Darstellungsmöglichkeiten der Ergebnisse des Western Blot

	C6	OLN-93
Ratio p-ERK/GAPDH vs. Ratio p-ERK/total-ERK	p= 0,9485	p= 0,8611
Ratio p-Akt/ β -Aktin vs. Ratio p-Akt/total-Akt	p= 0,9994	p= 0,7917

Während die Protektion durch Steigerung als auch durch Verlust an phosphorylierten ERK1/2 in der Literatur beschrieben wurde [43, 96], ist nur die Steigerung von phosphorylierten Akt mit der Protektion assoziiert [92]. Um die Ergebnisse der Western Blots besser zu verstehen, wurden im nächsten Schritt der MAPK-, der PI3K- und der AMPK-Signaltransduktionsweg unter Berücksichtigung weiterer *Downstream*-Signalmoleküle dieser Signalwege mit einer PathScan-Analyse (Dot Blot) untersucht. Dafür wurden OLN-93 und C6 Zellen mit DMSO, E2, DHEA bzw. E2 und DHEA vorbehandelt und anschließend für 6h bzw. 24h mittels Hyperoxie geschädigt. Durch einen frühen und einen späteren Zeitpunkt sollte transiente und permanente Aktivierung bestimmter Signalmoleküle untersucht werden. Durch die begrenzten Möglichkeiten zur Normalisierung der Daten zueinander wurden die Behandlungen nur an den jeweiligen Zeitpunkten zu ihrer jeweiligen DMSO-Kontrolle verglichen. Es wurde kein Vergleich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten berechnet, da die mittlere Signalintensität der Arrays zwischen den beiden Zeitpunkten zu verschieden war und nach 24h Hyperoxie signifikant weniger Signalstärke im Vergleich zu 6h gemessen wurde (Ergänzende Abbildung

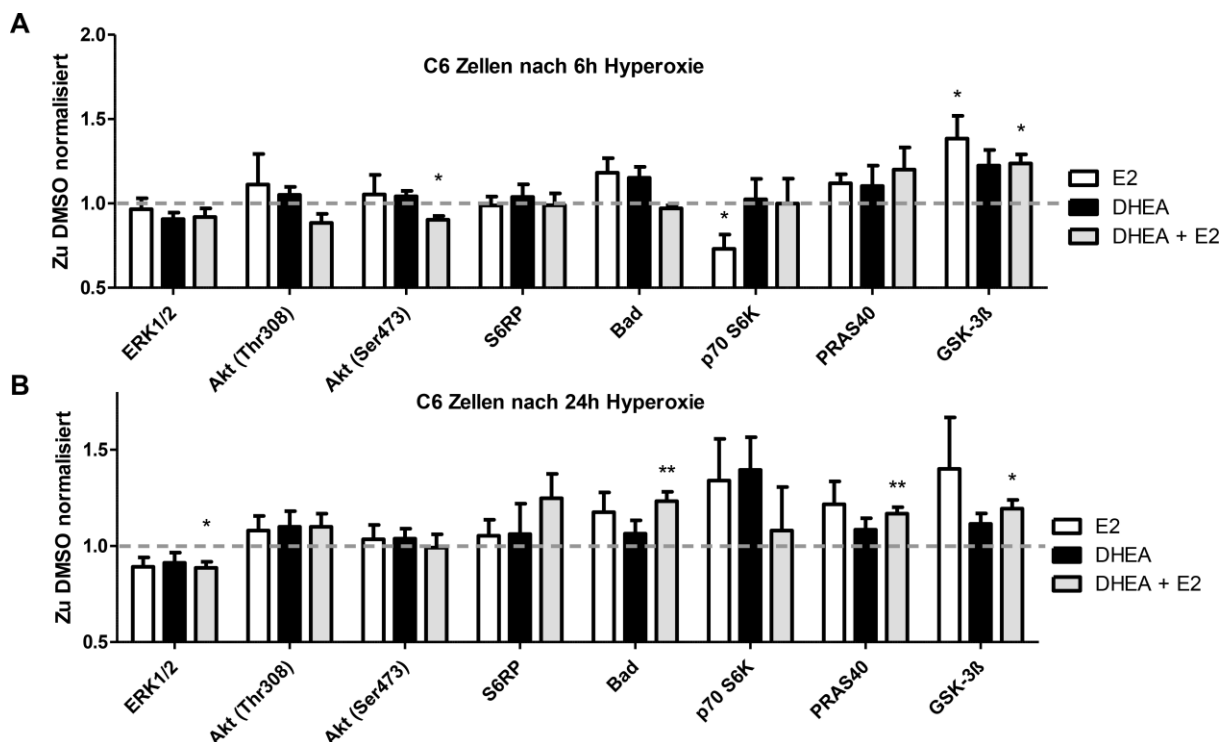
8A-B). Innerhalb der Experimente gab es keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Signalintensität zwischen Kontrolle und Behandlung nach 6h bzw. 24h Hyperoxie.

In C6 Zellen wurden Signale von phosphorylierten ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Akt (Thr308 und Ser473), S6RP (Ser235/236), Bad (Ser112), p70S6K (Thr389), PRAS40 (Thr246) und GSK-3 β (Ser9) gemessen. Es wurde keine Aktivierung von Stat3 (Tyr705) und p38 (Thr180/Tyr182) gemessen. Aus dem Phosphorylierungsstatus dieser Proteine lassen sich folgende Signalwege ableiten: (I) der PI3K/Akt/Bad Signalweg (Akt, Bad), (II) der PI3K/Akt/mTOR Signalweg (Akt, PRAS40, GSK-3 β) und (III) der MAPK/ERK/mTOR Signalweg (ERK1/2, p70S6K, S6RP). Diese Signalwege interagieren miteinander und ihre Aktivierung ist mit Zellüberleben assoziiert (Abbildung 5, Seite 23).

Nach 6h Hyperoxie war in den E2-behandelten C6 Zellen p70S6K signifikant herunterreguliert, während GSK-3 β signifikant hochreguliert war (Abbildung 22A). Bei den DHEA-behandelten Zellen gab es keine Unterschiede zur Kontrolle. In den E2 und DHEA-kombinationsbehandelten Zellen war Akt (Ser473) signifikant herunterreguliert, während GSK-3 β signifikant hochreguliert war. Es gab keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs durch E2 hin. Trotz der signifikanten Herunterregulierung von Akt durch Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA, wurde eine signifikante Hochregulierung von Downstream-Signalmolekülen des Akt Signalweges gefunden. Das könnte für eine transiente Aktivierung von Akt sprechen, welche vor dem Zeitpunkt der Untersuchung schon abgeklungen ist. Das könnte auch auf die E2-einzelbehandelten Zellen zutreffen, da auch hier Downstream-Signalmoleküle von Akt signifikant angestiegen waren ohne dass Akt selbst reguliert war.

Nach 24h Hyperoxie gab es weder in den E2-, noch in den DHEA-einzelbehandelten C6 Zellen signifikante Veränderungen zur Kontrolle (Abbildung 22B). In den E2 und DHEA kombinationsbehandelten Zellen war ERK1/2 signifikant runterreguliert, während Bad, PRAS40 und GSK-3 β signifikant hochreguliert waren. Es gab keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die signifikante Herunterregulierung von ERK1/2 spricht nicht für eine vorausgegangene Aktivierung von ERK1/2, da keine der Downstream-Signalmoleküle des Signalweges reguliert sind. Die Ergebnisse in der Kombinationsbehandlungsgruppe weisen auf aktivierte PI3K/Akt/Bad und PI3K/Akt/mTOR Signalwege hin.

Abbildung 22: Ergebnisse der PathScan-Analyse in den C6 Zellen



Um intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, wurde eine PathScan-Analyse in den C6 Zellen durchgeführt. Nach 2h Präinkubation mit DMSO, 10 μ M E2, 100nM DHEA oder E2 mit DHEA (Kombinationsbehandlung), wurden die Zellen für (A) 6h oder (B) 24h mit Hyperoxie geschädigt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$. Weiße Balken repräsentieren E2-behandelten Zellen, schwarze Balken repräsentieren DHEA-behandelten Zellen und graue Balken repräsentieren E2 mit DHEA behandelte Zellen.

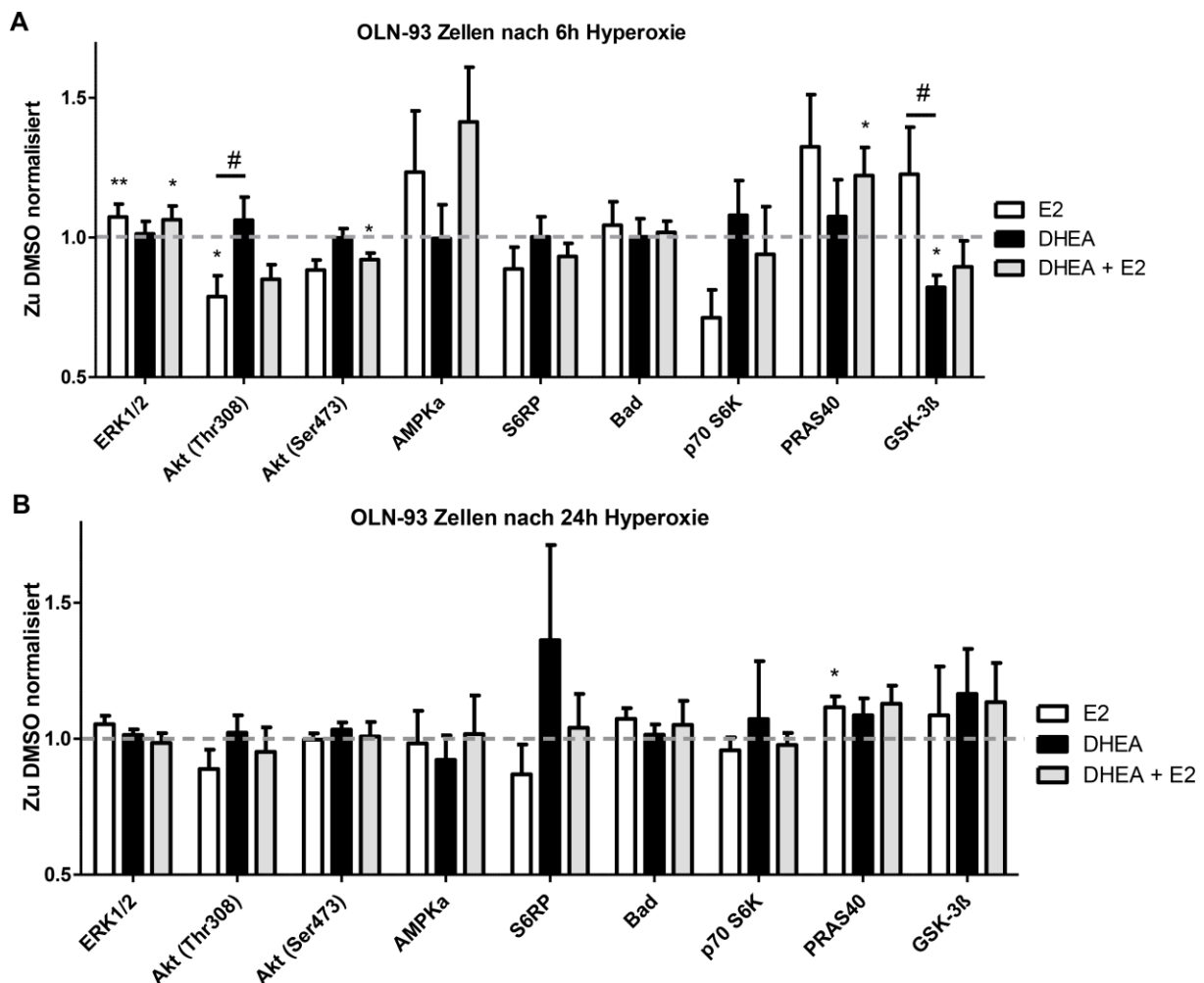
In den OLN-93 Zellen wurden Signale der zuvor genannten Signalmoleküle und von AMPK α (Thr172) gemessen. Auch hier wurde keine Aktivierung von Stat3 und p38 gemessen. Neben den drei zuvor genannten Signalwegen lässt sich hier noch ein vierter ableiten: (IV) der AMPK α /mTOR Signalweg (AMPK α , p70S6K, S6RP). Dieser Signalweg fördert den Zelltod über die Aktivierung von AMPK α , was zur Inaktivierung von p70S6K und S6RP führt.

Nach 6h Hyperoxie führte die Behandlung mit E2 zu einer signifikanten Herunterregulierung von Akt (Thr308) und einer signifikanten Hochregulierung von ERK1/2 (Abbildung 23A). Unter DHEA-Behandlung wurde GSK-3 β signifikant herunterreguliert. Durch Kombinationsbehandlung mit E2 und DHEA kam es zur signifikanten Herunterregulierung von Akt (Ser473), während ERK1/2 und PRAS40 signifikant hochreguliert wurden. Zusätzlich gab es signifikante Unterschiede zwischen E2- und DHEA-Einzelbehandlungen beim Phosphorylierungsstatus von Akt (Thr308) und GSK-3 β . Obwohl Akt in den beiden Behandlungsgruppen mit E2 signifikant herunterreguliert war, wurden auch hier wieder signifikant hochregulierte *Downstream*-Signalmoleküle der Akt-Signalwege

gefunden. Das könnte wie bei den C6 Zellen für eine transiente Aktivierung von Akt sprechen, welche vor dem Zeitpunkt der Untersuchung schon abgeklungen ist. Interessanterweise gab es in den beiden mit E2 behandelten Gruppen eine signifikante Hochregulierung von ERK1/2 ohne dass Downstream-Signalmoleküle bereits aktiviert waren. Diese Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR- und des MAPK/ERK/mTOR-Signalwegs durch E2 hin. Bei den DHEA-behandelten Zellen gibt es keinen Hinweis auf eine Aktivierung einer der genannten Signalwege. Aufgrund der signifikanten Herunterregulierung von GSK-3 β könnte der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg sogar aktiv blockiert zu sein.

Nach 24h Hyperoxie führte die Einzelbehandlung mit E2 zu einer signifikanten Hochregulierung von phosphorylierten PRAS40 (Abbildung 23B). Es gab keine weiteren Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle bzw. zwischen zwei Behandlungen. Das Ergebnis weist auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg durch E2-Einzelbehandlung hin. Eine Zusammenfassung der PathScan-Ergebnisse ist in Tabelle 13 dargestellt.

Abbildung 23: Ergebnisse der PathScan-Analyse in den OLN-93 Zellen



Um intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, wurde eine PathScan-Analyse in den OLN-93 Zellen durchgeführt. Nach 2h Präinkubation mit DMSO, 1 μ M E2, 100nM DHEA oder E2 mit DHEA (Kombinationsbehandlung), wurden die Zellen für (A) 6h oder (B) 24h mit Hyperoxie geschädigt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * $p < 0.05$ und ** $p < 0.001$; signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Steroidhormonbehandlungen sind dargestellt als # $p < 0.05$. Weiße Balken repräsentieren E2-behandelten Zellen, schwarze Balken repräsentieren DHEA-behandelten Zellen und graue Balken repräsentieren E2 mit DHEA behandelte Zellen.

Tabelle 13: Aktivierte Signalwege durch Steroidhormonbehandlung im PathScan

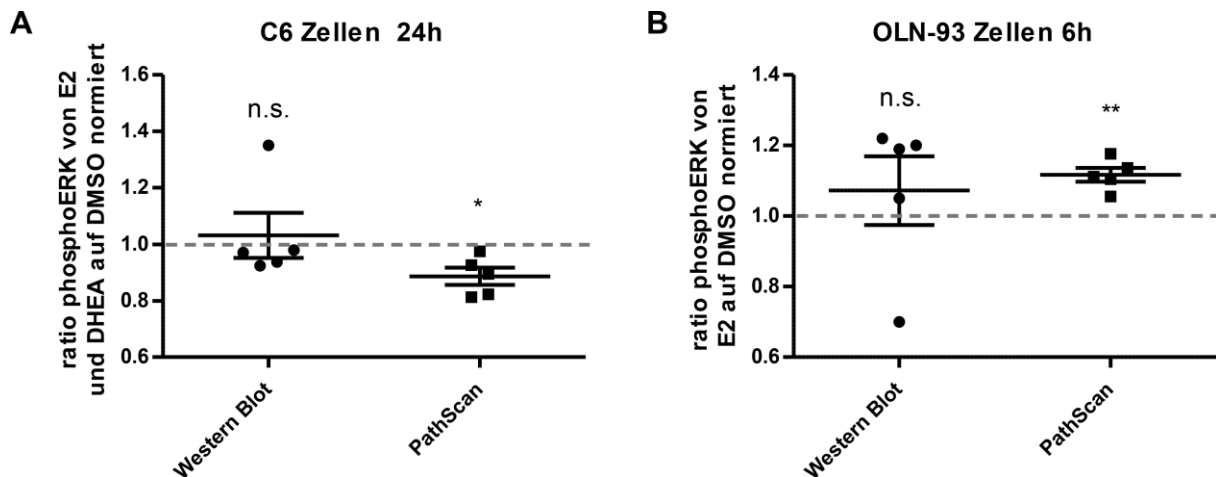
Steroide	C6		OLN-93	
	6 h	24 h	6 h	24 h
E2	Akt (II)	-	Akt (II)/ ERK (III)	Akt (II)
DHEA	-	-	-	-
DHEA + E2	Akt (II)	Akt (I,II)	Akt (II)/ ERK (III)	-

(I) PI3K/Akt/Bad-Signalweg, (II) PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und (III) MAPK/ERK/mTOR-Signalweg.

Der Vergleich der beiden Methoden in Bezug auf Akt (Ser473) und ERK1/2 zeigt nur im Fall von Akt in den kombinationsbehandelten C6 Zellen nach 24h Hyperoxie eine Übereinstimmung. Im Gegensatz zum Western Blot wurden mit dem PathScan jedoch vier weitere Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle gefunden.

Der direkte Vergleich der Daten aus beiden Methoden zeigt eine größere Streuung bei den Ergebnissen aus den Western Blots (Abbildung 24A-B). Dies könnte den Unterschied bei der statistischen Auswertung zwischen beiden Methoden erklären.

Abbildung 24: Vergleich Ergebnisse aus Western Blots und PathScan-Analyse



Vergleich der Ergebnisse aus den Western Blots und der PathScan-Analyse am Beispiel von (A) dem Verhältnis an phosphorylierten ERK1/2 unter Kombinationsbehandlung zu DMSO in C6 Zellen nach 24h Hyperoxie, sowie (B) dem Verhältnis an phosphorylierten ERK1/2 unter E2-Behandlung zu DMSO nach 6h Hyperoxie. Aufgetragen sind jeweils die Ergebnisse der zu Grunde liegenden Einzelergebnisse. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Hyperoxie sind dargestellt als * $p < 0.05$ und ** $p < 0.001$.

4. Diskussion

Während der Schwangerschaft werden die Fetalzonensteroidoide vom Fetus synthetisiert und dienen als Vorläufer der Östrogensynthese in der Plazenta [21]. Heckmann *et al.* und andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Synthese der Fetalzonensteroidoide in Frühgeborenen bis zum Zeitpunkt der reifen Geburt in hohen Konzentrationen persistiert [32, 33]. Die Literaturrecherche wies darauf hin, dass Fetalzonensteroidoide in der Lage sind, die klassischen ERs zu aktivieren, was zur Protektion vor apoptotischen Zelltod führen könnte [145]. Dieses Potential könnte die supprimierten Effekte der E2- und Progesteron-Substitution auf das neurologische Outcome in Frühgeborenen erklären [119], obwohl verschiedene Modelle gezeigt haben, dass E2 unreife OLs wirkungsvoll vor Zelltod schützt und auch im Tiermodell vor einer Schädigung der weißen Substanz schützt [91-93]. Daraus entstand die Frage, ob E2 auch noch in Gegenwart von Fetalzonensteroiden protektiv wirken kann. Diese Hypothese wurde als *Commentary* veröffentlicht [145] und für die vorliegende Arbeit experimentell untersucht. Der Großteil dieser Experimente wurde als Originalarbeit veröffentlicht [146]. Für die Untersuchung der Hypothese sollten molekularbiologische Hintergründe der Protektion genauer untersucht werden, um die Ergebnisse aus mechanistischer Sicht begründen zu können. Für die Untersuchung der Fragestellung wurden drei Typen unreifer Gliazellen verwendet, welche mit Hyperoxie geschädigt wurden. Die Fetalzonensteroidoide wirkten vergleichbar mit E2 dosisabhängig protektiv in den drei Zelltypen. Die Zugabe von E2 in Anwesenheit von Fetalzonensteroiden führte nur in einem der drei Zelltypen zu (zusätzlicher) Protektion. Damit wurde die Hypothese teilweise bestätigt. Für die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse wurden nur Arbeiten einbezogen, in denen entsprechend unreifen OLs, unreife Astrozyten bzw. neugeborene Tiere untersucht wurden, da der Reifegrad der Zellen einen Einfluss auf Rezeptoren, intrazelluläre Enzyme usw. aber auch auf das Schädigungsmodell hat [13, 48, 92, 139, 147, 148].

4.1. Protektion von E2 wird durch zelltypabhängige Rezeptoren vermittelt

Mit dem Nachweis von aktivierter Caspase-3/7 bzw. Phosphatidylserin konnte gezeigt werden, dass Hyperoxie in PDGFR α ⁺-Primärzellen, OLN-93 und C6 Zellen apoptotischen Zelltod induziert. In allen drei Typen unreifer Gliazellen war E2 in der Lage dosisabhängig vor apoptotischen Zelltod zu schützen, wobei je nach Zelltyp verschiedene Rezeptoren beteiligt waren.

In primären unreifen OLs (*Oligodendrocyte Precursor Cells*, OPCs; dazu gehören auch die PDGFR α^+ Primärzellen) und der unreifen oligodendroglialen Zelllinie OLN-93 konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass E2 vor Hyperoxie-induzierter Apoptose schützt indem u.a. die Aktivierung von Caspase-3 verhindert wird [92, 149], was auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte. Jedoch wurden in diesen Arbeiten die beteiligten Rezeptoren nicht untersucht. In einer Arbeit von Takao *et al.* wurde mit 3-(4-Morpholinyl)-Sydnominin (SIN-1) Zelltod in OPCs induziert. In diesem Modell war E2 in der Lage über klassische ERs vor Apoptose zu schützen [150]. Bei dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Hyperoxie-Schädigungsmodell konnte gezeigt werden, dass ebenfalls die klassischen ERs an der E2-vermittelten Protektion in PDGFR α^+ OPCs und OLN-93 Zellen beteiligt sind. An der Protektion der PDGFR α^+ OPCs konnten rezeptorunabhängige Effekte ausgeschlossen werden, während diese Frage für die OLN-93 Zellen nicht zu klären war wegen der starken Reaktion der Zellen auf die beiden Antagonisten ICI und G36. Antagonisten von klassischen ERs (wie z.B. ICI) sind in der Lage Zelltod zu induzieren, wenn Zellen von diesem Rezeptorsignalweg essentiell abhängig sind wie es beispielsweise bei bestimmten Brustkrebsarten vorkommt [151]. Das weist auf eine Abhängigkeit der Zelllinie für *Survival Signaling* über klassische ERs hin. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur ein fördernder Effekt des Zellüberlebens durch G36 jedoch bisher noch nicht beschrieben worden. In den OLN-93 Zellen scheint es einen GPER-assoziierten Signalweg zu geben, welcher wichtig für den Vorgang der Apoptose ist.

In der unreifen astroglialen Zelllinie C6 konnten Sur *et al.* zeigen, dass E2 in der Lage ist, den durch oxidativen Stress induzierten apoptotischen Zelltod durch Reduktion von aktivierter Caspase-3 zu verhindern [97], was auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte. In diesen Experimenten wurde jedoch nicht untersucht über welche Rezeptoren E2 vor Hyperoxie-induziertem Zelltod schützt. Allerdings wurde in einem Modell mit Glutamat-induzierter Apoptose in C6 Zellen der protektive Effekt von E2 auf Rezeptor-Ebene untersucht [152]. Hier haben die Autoren eine signifikante Reduktion der protektiven Eigenschaften von E2 festgestellt, wenn ICI zu E2 gegeben wurde und schlossen daraus, dass die Protektion über klassische ERs vermittelt wird. Interessanterweise haben die Autoren auch signifikanten Schutz vor Glutamat-induziertem Zelltod festgestellt, wenn die Zellen nur mit ICI inkubiert wurden. Dieses Ergebnis wurde in der Publikation nicht weiter diskutiert, jedoch kann ICI auch als Agonist am GPER wirken. Damit reflektieren diese Ergebnisse auch die E2-vermittelte Protektion bei Hyperoxie-induziertem Zelltod, wo klassische und nicht-

klassische ERs an der Protektion beteiligt sind. Des Weiteren wurden keine rezeptorunabhängige Protektion in den C6 Zellen gefunden.

4.2. Fetalzonensteroid-induzieren dosisabhängig Protektion

Die vorherige Arbeit von Miller *et al.* konnte zeigen, dass DHEA und einige seiner Metaboliten in der Lage sind, die transkriptionale Aktivität von klassischen ERs signifikant zu induzieren [126]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in allen drei untersuchten Zelltypen die Fetalzonensteroid DHEA, 16OH-DHEA und Adiol vergleichbar zu E2 dosisabhängig signifikant vor apoptotischen Zelltod geschützt haben. Im Fall von DHEA wurde die Protektion über klassische ERs vermittelt, während der AR abhängig vom Zelltyp sowohl Überleben als auch Zelltod induzieren konnte. Da die Fetalzonensteroid keinen phenolischen Ring wie E2 besitzen, sind antioxidative Eigenschaften über rezeptorunabhängige Mechanismen nicht wahrscheinlich.

Die Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion wurde zuvor noch nie in OLN-93 Zellen untersucht und im Jahre 2016 wurde erstmals ein protektiver Effekt von DHEA in OPCs gegen 6-amino-NADP (6AN)-induzierte Nekrose beschrieben [153]. In dieser Arbeit wurden die Effekt-vermittelnden Rezeptoren jedoch nicht weiter untersucht. Für 16OH-DHEA und Adiol wurden in OPCs bisher noch keine protektiven Effekte beschrieben. Caruso *et al.* haben herausgefunden, dass Testosteron in OPCs gering toxisch über den AR wirkt [154]. Daran angelehnt führte die Blockierung des AR in den PDGFR α^+ OPCs unter Hyperoxie zu signifikant weniger Zelltod. Das stand im Gegensatz zu den OLN-93 Zellen, wo die Blockierung des AR unter Hyperoxie zur Induktion von Zelltod führte. Dementsprechend liegt in den OLN-93 Zellen nicht nur eine Abhängigkeit von ER-Signalwegen, sondern auch von AR-vermittelten Effekten für das Zellüberleben vor. Diese gegensätzlichen Reaktionen auf die Blockierung des AR in beiden Zelltypen sind gut untersucht und hängen vom Zelltyp und der Mikroumgebung ab [155, 156]. In dem Hyperoxie-Modell der vorliegenden Arbeit vermitteln die klassischen ERs den protektiven Effekt von DHEA in den PDGFR α^+ OPCs, während klassische ERs und ARs in den OLN-93 Zellen das Potential für die Vermittlung der Protektion haben.

In C6 Zellen wurde die Protektion durch Adiol und 16OH-DHEA zuvor noch nicht beschrieben. In einem Modell mit immunstimulierten und Glucose-deprivierten C6 Zellen schützte DHEA dosisabhängig vor Zelltod, wobei die daran beteiligten Rezeptoren nicht weiter untersucht wurden [157]. In Konzentrationen von 10 bis 100 μ M steigerte DHEA das

Zellüberleben in diesen Experimenten, während im Gegensatz dazu im hier untersuchten Hyperoxie-Modell ein U-förmiger Verlauf beobachtet wurde. Hier liegt das Maximum der Protektion bei ~100nM DHEA, wobei der protektive Effekt bereits bei 1µM wieder verschwunden ist. Diese Unterschiede könnten in der Art der Schädigung, aber auch in den Zellkulturbedingungen oder in der Dauer der Präinkubation mit DHEA begründet sein. Allgemein können U-förmige Dosis-Antwort-Kurven durch die Bildung eines Kolloids der verwendeten Substanz entstehen, sowie durch Bindung der Substanz an verschiedene, sich entgegen wirkende Zielmoleküle oder durch Bindung an verschiedenen Bindungsstellen des selben Zielmoleküls [158, 159]. Ein U-förmiger Verlauf der Dosis-Antwort-Kurve durch DHEA wurde ebenfalls in Bezug auf die IL-6 Sekretion in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes gefunden [160]. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in den C6 Zellen klassische ERs und der AR an der Protektion durch DHEA im Hyperoxie-Modell beteiligt sind.

4.3. Intrazelluläre Aromatasen verändern die Protektion

Die Expression der intrazellulären Aromatasen hing vom Zelltyp ab und ihre Aktivität war durch einen Einfluss auf die Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion gekennzeichnet. Die CYP19-Aromatase wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, sie kann aber in Astrozyten durch eine Schädigung des Gehirns induziert werden [161].

In den einzigen beiden vorangegangenen Arbeiten zur Protektion durch DHEA in OPCs [153] und C6 Zellen [157] wurde die Möglichkeit der intrazellulären Konversion zu östrogenen Molekülen nicht weiter berücksichtigt. Allerdings spielen Aromatasen in OPCs wahrscheinlich keine Rolle, da sie dort bisher nicht nachgewiesen werden konnten [162]. Dementsprechend wurden in den PDGFR α^+ OPCs auch keine Aktivität bzw. Expression von Aromatasen gefunden. In den OLN-93 Zellen wurde jedoch Aktivität von CYP19-Aromatase gefunden, wie es häufig bei östrogenabhängigen Tumorzellen vorkommt [163]. Hier führte die Inhibition der Aromatase-Aktivität interessanterweise zu einem tendenziellen Anstieg der Fetalzonensteroid-vermittelten Protektion. Das spricht für eine wichtige Rolle des AR bei den anti-apoptischen Effekten von Fetalzonensteroiden in den OLN-93 Zellen.

In C6 Zellen wurde die Aktivität von CYP19 bereits zuvor beschrieben [164]. Bei der Fetalzonensteroid-vermittelten Protektion hat die Aromatase in diesen Zellen einen Protektion-unterstützenden Effekt. Ohne den Einfluss von Aromatasen kam es im Fall von 16OH-DHEA sogar zum Verlust der protektiven Eigenschaften. Dieses Ergebnis

unterstreicht, dass die zelltypspezifische Ausstattung mit metabolisierenden Enzymen eine entscheidende Rolle bei der Fetalzonensteroid-vermittelten Protektion spielen kann.

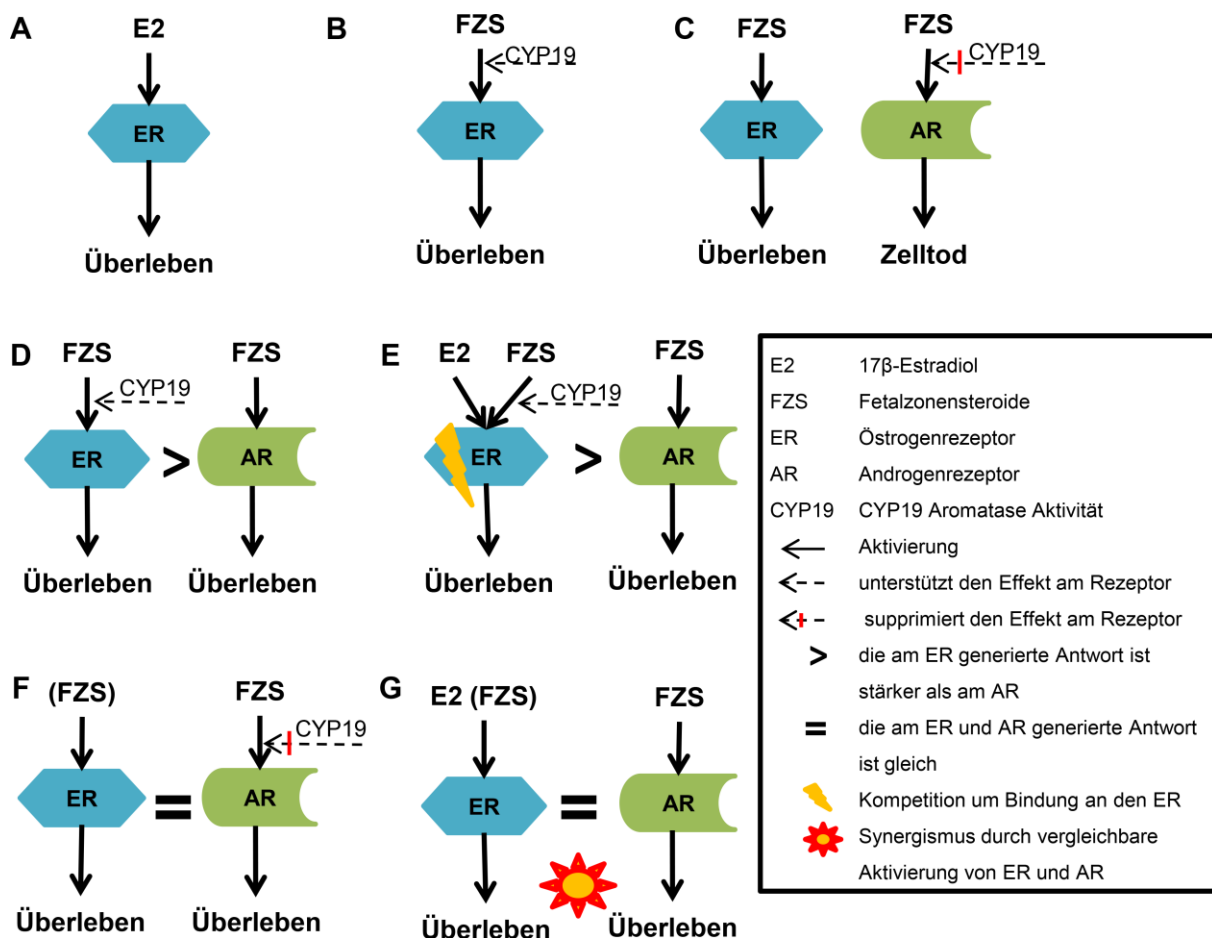
4.4. Zelltypabhängiges Auftreten von Synergien durch Kombinationsbehandlungen

In der zuvor beschriebenen Arbeit von Miller *et al.* konnte Konkurrenz von E2 und DHEA bzw. DHEA-Metaboliten um die Bindung an die klassischen ERs gezeigt werden, was dazu führte, dass durch Zugabe beider der Effekt auf die transkriptionale Aktivität nicht gesteigert werden konnte [126]. Der Effekt dieser Kombinationsbehandlungen von E2 und Fetalzonensteroiden wurden zuvor noch nicht in Schädigungsmodellen untersucht. In C6 Zellen und PDGFR α ⁺ OPCs führte die zeitgleiche Behandlung mit E2 und Fetalzonensteroiden nicht zu synergistischen Effekten, was die Hypothese der vorliegenden Arbeit bestätigt. Im Gegensatz dazu, kam es in den OLN-93 Zellen jedoch durch Kombinationsbehandlung zu synergistischen Effekten.

Diese verschiedenen Reaktionen der Zellen zeigen, dass es keine allgemein gültige Aussage zum Synergismus in diesem *in vitro* Frühgeborenen-Modell geben kann. Wie sich die verschiedenen Aspekte der Anwesenheit von Aromatasen, der Rezeptorausstattung, sowie der Bindungsaffinität (bzw. Effizienz der Bindung an den Rezeptor) auswirken, wird in Abbildung 25 dargestellt: Im ersten Fall ist die klassische protektive Wirkung von E2 über die ERs dargestellt (Abbildung 25A). Die Fetalzonensteroiden besitzen ebenfalls das Potential die klassischen ERs zu aktivieren, um protektive Effekte zu induzieren (Abbildung 25B). Dabei unterstützen Aromatasen diesen Effekt, da sie Moleküle mit größerem östrogenen Potential bilden, welche wiederum stärker mit den ERs wechselwirken können. Wenn die maximal mögliche Aktivität des Rezeptors jedoch erreicht ist, dann erzeugt die Zugabe von Substanzen, welche ebenfalls über den Rezeptor wirken (wie E2) keine zusätzlichen protektiven Effekte. Das heißt, dass es zu keinen synergistischen Effekten bei der Kombinationsbehandlung kommt. Wenn der AR Apoptose vermittelt, dann kann die Umwandlung durch Aromatasen ein proapoptotisches Wirken der Fetalzonensteroiden über den AR reduzieren (Abbildung 25C). Wenn klassische ERs und der AR beide protektive Effekte vermitteln, dann ergeben sich zwei Möglichkeiten: (I) Die klassischen ERs vermitteln stärker den Effekt, oder (II) klassische ERs und der AR besitzen das gleiche Potential zum Generieren der Antwort. Auch wenn DHEA in C6 Zellen die Protektion über klassische ERs und den AR vermittelt, so scheint es, dass die Protektion zum größeren Teil über die klassischen ERs vermittelt wird (Abbildung 25D). Diese überwiegende Wirkung über die

klassischen ERs könnte durch die Aromatase-Aktivität erklärt oder auch nur verstärkt werden, indem mehr Moleküle mit östrogenen Potential entstehen. Diese überwiegende Aktivierung der klassischen ERs führt jedoch zu einem maximalen Effekt, welcher durch die Kombinationsbehandlung nicht weiter erhöht werden kann wie beispielsweise in den C6 Zellen (Abbildung 25E). Im Fall der OLN-93 Zellen scheinen klassische ERs und der AR das gleiche Potential zur Vermittlung der Protektion zu besitzen (Abbildung 25F). Hier führt die Inhibition der Aromatasen zu einer erhöhten Protektion durch die Fetalzonensteroid, was das protektive Potential des AR unterstreicht. Unter diesen Bedingungen kommt es zu synergistischen Effekten durch die Kombinationsbehandlung, da keine Konkurrenz um denselben Rezeptor stattfindet (Abbildung 25G). In den OLN-93 Zellen scheint es daher zu einer Aktivierung der klassischen ERs durch E2 und des AR durch Fetalzonensteroid zu kommen. Ob die Fetalzonensteroid als solche auf die Zellen wirken oder ob diese durch 3 β - und/oder 17 β -HSDs zu potenteren Androgenen weiter prozessiert werden, bleibt zu klären.

Abbildung 25: Übersicht der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten von Zellen auf Östrogene und/oder Fetalzonensteroid



Schematische Zusammenfassung der verschiedenen Möglichkeiten zum Zusammenspiel von Rezeptoren und Aromatasen bei der Behandlung mit E2, Fetalzonensteroiden und der Kombinationsbehandlung von E2 mit Fetalzonensteroiden. (A) E2 und (B) Fetalzonensteroiden sind in der Lage Östrogenrezeptoren (ERs) zu aktivieren, was zum Überleben der Zellen führt. CYP19-Aromatase-Aktivität unterstützt den Effekt der Fetalzonensteroiden, indem es diese zu östrogenen Substanzen umwandelt. (C) Wenn über die Aktivierung des Androgenrezeptors Zelltod vermittelt wird, dann können Fetalzonensteroiden Zelltod induzieren. Dieser Effekt kann durch CYP19-Aromatasen reduziert werden. Wenn Zellüberleben über ERs und den AR vermittelt werden kann, dann gibt es zwei Möglichkeiten: (D, E) Ein Rezeptor ist potenter in der Vermittlung des protektiven Effektes oder (F, G) beide Rezeptoren sind gleich potent. (D) Auch wenn die Stärke der Interaktion der Fetalzonensteroiden an den ERs stärker ist, so können die Fetalzonensteroiden im Falle einer Einzelbehandlung über ERs und den AR protektiv wirken. Der protektive Effekt an den ERs wird durch CYP19-Aromatasen weiter unterstützt. (E) Im Falle der Kombinationsbehandlung mit E2 führt die vorwiegend über die ERs ablaufende Protektion dann aber zur Konkurrenz von den Fetalzonensteroiden und E2 um die Bindung an die ERs. Durch die Sättigung des vom Rezeptor generierbaren protektiven Effektes, findet kein Synergismus statt. (F) Die ERs und der AR können aber auch beide im gleichen Maße die Protektion vermitteln. Durch CYP19-Aromatasen kann der protektive Effekt über den AR jedoch reduziert werden. (G) Im Falle der vergleichbaren Potenz von ERs und AR führt die Kombinationsbehandlung zu einer Aktivierung der ERs durch E2 und des AR durch die Fetalzonensteroiden. Es findet keine Konkurrenz um denselben Rezeptor statt und so führt die Kombinationsbehandlung zum Synergismus.

Nichtsdestotrotz ist das Auftreten von Synergien wie in den OLN-93 Zellen in Frühgeborenen sehr unwahrscheinlich, da die Rezeptoraffinitäten der humanen Rezeptoren nicht zu einer überwiegenden Aktivierung des AR durch die Fetalzonensteroiden führen (z.B. DHEA: ER- β $K_d \sim 0.5 \mu\text{M}$, für ER- α $K_d \sim 1,1 \mu\text{M}$ und für AR $K_d \sim 1.2 \mu\text{M}$) [126, 138].

4.5. Auswirkungen von Hyperoxie und Steroidbehandlung auf die Rezeptordichte

Die Auswirkungen der Hyperoxie bzw. der Steroidhormone auf die Rezeptordichte wurden bisher in zwei Studien untersucht. In der einen Studie konnte an Astrozyten gezeigt werden, dass durch Hyperoxie die Menge an Progesteron-Rezeptor herunterreguliert wird [165]. In der anderen Studie wurde an kultivierten glatten Muskelzellen der Atemwege von humanen Feten gezeigt, dass Hyperoxie (mit 50% O_2) zu keiner Änderung der Rezeptordichte von ER- α und ER- β führt [166]. Bei dieser Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass auch die Menge an CYP19 Aromatase nicht durch die Hyperoxie verändert wurde. Es gibt keine Untersuchungen zur Expression des AR unter Hyperoxie.

In C6 und OLN-93 Zellen führte die Behandlung mit den Steroidhormonen unter Normoxie zu keiner Veränderung der untersuchten relativen Rezeptordichten von ER- α , ER- β , GPER und AR. Erst die Schädigung der Zellen konnte Effekte auf die relative

Rezeptordichte induzieren. Dabei waren die Effekte auf die C6 Zellen nur gering, während es bei den OLN-93 Zellen vermehrt zur Regulation der Rezeptoren kam.

Da *full-length* ER- α in beiden Zelltypen kaum nachweisbar war und es dagegen eine relativ große Menge an einer ~50kDa *Splice*-Variante von ER- α gab, wurde diese Variante quantifiziert. Die mRNA von ER- α kann alternatives Splicing durchlaufen, wobei ein oder mehrere Exone deletiert werden [167]. Bei der hier untersuchten 50kDa-Bande für ER- α ist Exon 7 deletiert [168]. Über diese *Splice*-Variante ist bisher nicht viel bekannt. Sie scheint jedoch nicht in der Lage zu sein, die Genexpression zu modulieren [169]. Damit wäre zum einen die direkte Wirkung über nicht-genomische Effekte möglich, diese Varianten könnten aber auch nur rein regulatorische Effekte ausüben. Diese Frage der Funktion dieser *Splice*-Variante bei der Rezeptor-vermittelten Protektion sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen werden.

Unter Normoxie fand in beiden Zelltypen keine Regulation der vier untersuchten Rezeptoren durch Zugabe von E2 und/oder DHEA statt. Erst die pathologische Situation (Schädigung durch Hyperoxie) ermöglichte die Rezeptorregulation. In den C6 Zellen scheint E2 unter Hyperoxie über *Cross*-Regulation den AR zu induzieren. Die Induktion des AR über E2 ist bereits für andere Gewebe beschrieben worden [170]. Bei der Kombination von Hyperoxie, E2 und DHEA kommt es in den C6 Zellen zur signifikanten Hochregulierung von ER- β . Da die Einzelbehandlungen keinen Effekt haben, könnte es hier zu einem Zusammenspiel von Veränderungen unter der pathologischen Situation zusammen mit Autoinduktion durch E2 und einem zusätzlichen Effekt durch DHEA kommen. Es bleibt jedoch zu klären, ob es sich bei dem Effekt von DHEA um eine Verstärkung der Autoinduktion handelt und/oder um eine *Cross*-Regulation, da DHEA an klassische ERs und den AR binden kann. Die Kombinationsbehandlung aus E2 und DHEA hat die Menge an klassischen ERs unter Hyperoxie zwar erhöht, dieser Effekt hatte jedoch keinen Einfluss, um zu einem synergistisch verstärkten Antwortverhalten der Zelle gegenüber den Steroidhormonen zu führen.

In den OLN-93 Zellen kam es zur Hochregulierung von ER- α , ER- β und GPER unter der pathologischen Situation. Dieser Effekt wurde jedoch für alle drei Rezeptoren durch Behandlung mit E2 durch Autorepression wieder aufgehoben. Diese Autorepression durch E2 wurde zuvor auch bei anderen östrogenabhängigen Tumorzellen gefunden [171]. In Bezug auf den GPER wurde durch die Behandlung mit DHEA ebenfalls die Menge an Rezeptor wieder herunterreguliert. Dieser Effekt läuft wahrscheinlich über *Cross*-Regulation ab, da es in den Experimenten keine Hinweise gibt, dass DHEA an den GPER binden kann. Durch

Behandlung mit DHEA blieb die Menge an ER- α und ER- β jedoch erhöht bzw. wurde durch DHEA die Menge an ER- α zusätzlich signifikant gegenüber der Hyperoxie erhöht. Dieser Effekt am ER- α scheint für eine *Cross-Regulation* durch DHEA zu sprechen. Auch wenn im Fall der OLN-93 Zellen DHEA vermutlich über den AR protektiv wirkt, so unterstützt es die E2-vermittelte Protektion indem die Menge an klassischen ERs bei Anwesenheit von E2 erhöht erhalten werden. Diese Ergebnisse zeigen zudem das Auftreten genomischer Effekte, die durch die Behandlung mit E2 und DHEA induziert wurden.

Auto- und *Cross-Regulation* sind wichtige Mechanismen für die Verstärkung von Hormon-Signalen, der Regulation von Hormon-Aktivitäten durch negative Feedback-Mechanismen und für die Koordinierung von Hormonwirkungen in einer temporären und gewebespezifischen Weise [108]. Die wichtigste Funktion der Autorepression ist im Allgemeinen bei steigender Menge an Hormon durch Herunterregulierung des Rezeptors die Homöostase wiederherzustellen [108]. In beiden untersuchten Zelltypen konnte dieser Effekt innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht gefunden werden. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich der starke Mangel an Östrogenen und Progesteron zusammen mit der großen Menge an adrenalen Androgenen (Fetalzonensteroiden) auf die Rezeptorausstattung im Frühgeborenen nach der Geburt, aber auch langfristig auswirkt.

4.6. Phosphorylierungsstatus von intrazellulären Signal-Molekülen

Rezeptor-vermitteltes Zellüberleben kann neben genomischen Signalwegen auch über nicht-genomische Signalwege ablaufen. E2 und DHEA können dabei nicht-genomische neuroprotektive Signalwege über ERK1/2 und Akt induzieren [40, 92, 131, 132]. Nach der Untersuchung der Rezeptorausstattung und der Beteiligung der Rezeptoren an der Protektion sollte untersucht werden, ob intrazelluläre Signaltransduktionswege an den Effekten beteiligt sein können.

Dies wurde zuerst im Western Blot über die Menge an aktivierten ERK1/2 und Akt bestimmt. Eine Arbeit von Gerstner *et al.* hatte gezeigt, dass es in den unbehandelten OPCs zu einem Verlust an aktivierten ERK1/2 und Akt durch Hyperoxie kommt und dass die Behandlung mit E2 zu einem Erhalt des Pools an aktivierten ERK1/2 und Akt führt [92]. Erst nach 6h wurden in diesen Experimenten signifikante Unterschiede zwischen E2-behandelten und unbehandelten OPCs festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Western Blot jedoch kaum Unterschiede gefunden und es kam in einigen Fällen durch die Behandlung mit den Steroidhormonen sogar zum Verlust an aktivierten ERK1/2 und Akt. Für ERK1/2 ist

zwar in der Literatur beschrieben, dass sowohl die Aktivierung [92] als auch die Blockierung [96] mit Überleben assoziiert ist, aber bei Akt ist nur die Aktivierung mit Überleben assoziiert [92]. Da die Behandlung mit den Steroidhormonen das Überleben der Zellen steigert, deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche vorausgegangene Aktivierung der beiden Signalwege hin, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung schon beendet waren und dass eine Regeneration des Proteinpools noch nicht stattgefunden hatte bzw. durch die andauernde Schädigung eine Regeneration des Proteinpools nicht mehr stattfinden konnten. Da die Zellen vor Beginn der Hyperoxie 2h mit dem Steroidhormon bzw. DMSO präinkubiert wurden, dafür das Medium zur Präinkubation und nochmals vor Beginn der Hyperoxie gewechselt worden ist, kann eine Untersuchung von früheren Zeitpunkten nur bedingt Aufschluss geben, könnte aber zum Nachweis einer vorangegangenen Aktivierung der beiden Signalmoleküle dienen. Da beide Zelllinien spontan entstandene Tumorzellen sind, könnten sie ihr Proliferationspotential über permanent aktivierte PI3K- und MAPK-Signalwege erhalten [172, 173], was sich ebenfalls auf die Messung auswirken würde.

Mit der PathScan-Analyse sollte daher untersucht werden, ob *Downstream*-Moleküle dieser beiden Signalwege verändert sind. Durch die Untersuchung eines frühen und eines späteren Zeitpunkts sollte transiente und permanente Aktivierung dieser Signalmoleküle genauer betrachtet werden. Bei OPCs war bereits bekannt, dass E2 ERK1/2- und Akt-Signalwege induzieren kann, was mit einem Schutz vor Zelltod assoziiert war [92]. Entsprechend kam es in den Behandlungsgruppen mit E2 (in Einzelbehandlung und Kombinationsbehandlung mit DHEA) in den OLN-93 Zellen zu einer transienten Aktivierung von *Downstream*-Signalmolekülen des ERK1/2- und Akt-Signalweges. Die DHEA-Behandlung führte zu einem von der E2-Behandlung signifikant verschiedenen Ergebnis, welches jedoch für DHEA mit den untersuchten Zeitpunkten bzw. mit diesem Assay nicht weiter definierbar war. Da nach 24h Hyperoxie nur bei E2-Behandlung noch Veränderungen gegenüber der Kontrolle gemessen wurden, könnte zu späteren Zeitpunkten die Protektion hauptsächlich über Genexpression reguliert sein. Dabei kann die Genexpression das Resultat initiiertem genomischer und nicht-genomischer Effekte sein.

In vorherigen Arbeiten mit C6 Zellen konnte gezeigt werden, dass E2 vor oxidativen Stress-induzierten Zelltod über PI3K/Akt/Bad-Signalwege schützt [97]. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Behandlungsgruppen mit E2 der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg zum frühen Zeitpunkt induziert. Am späteren Zeitpunkt wurde nur noch in der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung eine Aktivierung von Signalmolekülen aus den PI3K/Akt/Bad und PI3K/Akt/mTOR-Signalwegen gefunden. Zudem wurde in der Kombinationsgruppe ERK1/2

herunterreguliert ohne dass Downstream-Moleküle des MAPK/ERK/mTOR-Signalweges verändert waren. Es gibt Untersuchungen, dass eine Induktion von Zelltod zur Aktivierung von ERK1/2 in Astrozyten führen kann [174, 175] und das E2 in der Lage ist, diese Aktivierung wieder rückgängig zu machen [96]. Daher könnte es sich bei der Herunterregulation von ERK1/2 um diesen Effekt handeln. Zum 24h Zeitpunkt gab es in den C6 Zellen damit deutlich mehr Aktivität der Signalwege als in den OLN-93 Zellen.

Auch wenn das Auftreten von Synergien wie in den OLN-93 Zellen in Frühgeborenen nicht wahrscheinlich ist, so könnte eine intensivere Untersuchung der genomischen und nicht-genomischen Signalwege in den OLN-93 Zellen jedoch Hinweise auf die Voraussetzungen für synergistische Effekte und somit für zukünftige Behandlungsstrategien geben. So scheint es in den OLN-93 Zellen nicht zur synergistischen Aktivierung eines einzelnen spezifischen Vorgangs zu kommen, sondern zu verschiedenen Signalmustern durch E2 bzw. DHEA. Es bleibt jedoch zu klären, ob es sich dabei um eine Aktivierung derselben Signalfamilie mit einer anderen zeitlichen Struktur oder aber um zwei verschiedene Signalwege handelt. Daher könnte eine Behandlung, die ein zu den Fetalzonensteroiden verschiedenes protektives Signalmuster erzeugt, das klinische Outcome von Frühgeborenen in synergistischer Weise verbessern.

4.7. Stärken und Grenzen

Die Stärke der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung von drei verschiedenen Typen unreifer Gliazellen, was eine zelltypspezifische Untersuchung des Outcomes erlaubte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die neuroprotektiven Effekte der Fetalzonensteroiden hochgradig abhängig waren von der zelltypspezifischen Expression von Aromatasen, der Rezeptorausstattung, sowie der Bindungsaffinität bzw. Effizienz der Bindung der Fetalzonensteroiden an die Rezeptoren. Die Bindungsaffinität bzw. die Effizienz der Bindung der Fetalzonensteroiden an die Rezeptoren kann jedoch mit den durchgeführten Experimenten nicht unterschieden werden, da das Zusammenspiel aus beiden den Effekt bildet. Die Verwendung der drei verschiedenen Zelltypen führte damit zu drei verschiedenen Mechanismen und damit auch Erklärungen, warum es zum Auftreten bzw. Ausbleiben von synergistischen Effekten kommt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Fetalzonensteroiden unter den gleichen Bedingungen zu untersuchen in denen E2 protektiv wirkt. Dabei könnten einige allgemeine Aspekte wie die Hormonkonzentrationen oder die Inkubationszeit die Ergebnisse beeinflusst haben. Denn je

länger die Präinkubation mit den Steroiden dauert, desto mehr genomische Effekte können induziert werden, welche dann zu einem veränderten Resultat führen könnten. Zudem wurden in den Kombinationsexperimenten nur Konzentrationen verwendet, welche zu signifikanter Protektion in der Einzelbehandlung führten. Niedrigere Konzentrationen von E2 und Fetalzonensteroiden könnten in den untersuchten Zelltypen synergistisch auf die klassischen ERs wirken. Im Fall der U-förmigen Dosis-Antwort-Kurven der Fetalzonensteroiden in den C6 Zellen könnte die Zugabe von E2 zu einer Verschiebung des Maximums geführt haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht zwischen den klassischen ERs unterschieden. Mit der Verwendung selektiver Östrogenrezeptormodulatoren (*selective estrogen receptor modulators*; SERMs), welche selektive Antagonisten für ER- α oder ER- β sind, wäre es möglich zwischen ER- α und ER- β –vermittelten Effekten zu unterscheiden. Auch die Geschlechterunterschiede sollten in zukünftigen Arbeiten genauer untersucht werden. Bei den PDGFR α^+ Primärzellen handelte es sich um eine Mischpopulation beider Geschlechter. Es ist bekannt, dass die Proliferation und Reifung von OPCs verschieden durch männliche und weibliche Sexualhormone reguliert wird und dass die OLs der beiden Geschlechtern unterschiedliche Eigenschaften besitzen [176, 177]. Da weibliche Frühgeborene bessere Überlebensraten haben [178] und weniger neurologische Defizite entwickeln [179] als männliche Frühgeborene, sollten in zukünftigen Experimenten beide Geschlechter getrennt voneinander untersucht werden, um eine mögliche Rolle der Fetalzonensteroiden bei diesen Unterschieden genauer zu untersuchen.

Zusätzlich gibt es noch weitere Fragen in der Zukunft zu klären, welche die physiologische Aktivität und lokale Konzentration der Fetalzonensteroiden betreffen. Eine Frage ist daher, wie konjugierte Fetalzonensteroiden im Vergleich zu unkonjugierten wirken, da die Fetalzonensteroiden zum großen Teil als Sulfat-Konjugate in der Zirkulation des Frühgeborenen vorkommen [129]. Das Gewebe mit der größten Sulfatase-Aktivität ist die Plazenta [180]. Es wäre daher denkbar, dass im Frühgeborenen weniger unkonjugierte Fetalzonensteroiden vorkommen als im Zusammenspiel mit der fetoplazentaren Einheit. Im Gegensatz zum Erwachsenen wurden im Fetus aber in allen Geweben Sulfatasen nachgewiesen, welche jedoch in geringeren Mengen vorkommen als in der Plazenta [181]. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen zeigen neuere Arbeiten, dass auch schon während der Entwicklung des Fetus die Blut-Hirn-Schranke geschlossen ist [182]. Bei Infektionen und Hypoxie-Ischämie kommt es zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, aber auch bei Komplikationen, wo es zu einer Schädigung der fragilen unreifen Blutgefäße im Gehirn kommt, wird es wahrscheinlich auch zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke im

Frühgeborenen kommen [182, 183]. Es bleibt also zu klären wie permeabel die Blut-Hirn-Schranke bei gesunden und kranken Frühgeborenen gegenüber den Fetalzonensteroiden ist. Allgemein gilt, je hydrophiler das Molekül, desto weniger wahrscheinlich passiert es die Blut-Hirn-Schranke und wird in entsprechend niedrigeren Konzentrationen im Gehirn zu messen sein. Dabei ist die selektive Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke umgekehrt proportional zu der Anzahl an potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen in wässriger Lösung [184]. Die Sulfat-konjugierte Form ist in der Lage mehr potentielle Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen als die unkonjugierte Form. Konjugierte Fetalzonensteroiden sind aber trotzdem nicht gut wasserlöslich und werden auch die intakte Blut-Hirn-Schranke überwinden können, eben nur in geringeren Mengen als die unkonjugierten Formen. Die Messung der ausgeschiedenen Fetalzonensteroid-Metaboliten im Urin von Frühgeborenen zeigt zudem, dass auch die sulfatierten Steroide durch die enzymatischen Aktivitäten (z.B. 3β - und 17β -HSD) metabolisiert werden [33]. Es gibt mehrere Arbeiten, welche die biologische Aktivität von DHEA und DHEAS vergleichend untersucht haben [185, 186]. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nur DHEA eine biologische Aktivität gegenüber einer bestimmten Funktion ausübt, während DHEAS nicht in der Lage war diese Aktivität zu induzieren bzw. stattdessen andere Aktivitäten induzierte [187, 188]. Es gibt jedoch auch viele Arbeiten, welche das gleiche Maß an Aktivität auf eine bestimmte Funktion durch DHEA und DHEAS festgestellt haben [189-192]. Zukünftige Untersuchungen sollten diese Fragen adressieren, um diese Einflussfaktoren besser einschätzen zu können. Nichtsdestotrotz gibt es diese große Diskrepanz im neurologischen Outcome von Frühgeborenen, welche mit (unkonjugierten) E2 und Progesteron behandelt worden sind gegenüber den experimentellen Modellen, was durchaus für eine signifikante biologische Aktivität der vermutlich Sulfat-konjugierten Fetalzonensteroiden hinter der Blut-Hirn-Schranke spricht.

4.8. Klinische Relevanz

In einer großen Kohorte von mehr als 900 Frühgeborenen mit einem extrem niedrigen Geburtsgewicht (<1.000g) konnte das Risiko der Sterblichkeit bzw. der neurologischen Defizite über das Auftreten von drei verbreiteten Erkrankungen des Neugeborenen prognostiziert werden [193]. Ein wichtiger Faktor für die Entstehung dieser drei Erkrankungen ist Hyperoxie. Ein therapeutischer Nutzen von E2 wurde bereits bei allen drei Erkrankungen experimentell untersucht: bei (I) Frühgeborenen-Retinopathie [194], bei (II) bronchopulmonaler Dysplasie [195] und bei (III) Erkrankungen des ZNS wie in der

vorliegenden Arbeit beschrieben. Folglich werden protektive Strategien bei verschiedenen Erkrankungen des Kindes benötigt in denen Steroidhormone eine wichtige Rolle spielen könnten.

Studien an Nagetieren haben gezeigt, dass die Verabreichung von Hormonen an Neugeborene zu negativen Langzeiteffekten im späteren Leben führt. So kann sich die Stimulation der ERs durch Östrogene und Xenoöstrogene (z.B. Bisphenol A) auf die spätere Fortpflanzung, die Entstehung von Tumoren und auf die Epigenetik auswirken [196-198]. Die pränatale Gabe des synthetische Östrogens DES führte beim Menschen beispielsweise zu einer erhöhten Inzidenz von Tumoren [199]. Beim Behandlungsansatz der Hormon-Substitution sollten daher potentielle Nebenwirkungen gegen den erhofften Nutzen gut abwägt sein, da die Langzeitfolgen dieser Behandlung bisher noch nicht bekannt sind.

4.9. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Frühgeburt erzeugt ein einzigartiges hormonelles Milieu, welches so nur beim Menschen und anderen höheren Primaten vorkommt. Weder bei der Entwicklung neuer Therapieansätze, noch bei *in vivo* oder *in vitro* Experimenten wurde dies bisher beachtet. In anderen Forschungsbereichen war bereits bekannt, dass die adrenalen Androgene DHEA, 16OH-DHEA, und Adiol in der Lage sind klassischer ERs und den AR zu aktivieren. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Interaktion mit den Rezeptoren stark genug ist, um in einem *in vitro* Schädigungsmodell unreifer Gliazellen Protektion zu vermitteln. Die Fetalzonensteroide als Vorläufer der Östrogensynthese zirkulieren in anhaltend hohen Konzentrationen im Frühgeborenen, weshalb zu erwarten wäre, dass es zu einer permanenten Aktivierung der beiden klassischen ERs im Frühgeborenen kommt, obwohl keine Versorgung mit Östrogenen mehr durch die Plazenta stattfindet. Diese kontinuierliche Aktivierung könnte an sich bereits zu einer Art von transienter endogener Neuroprotektion führen und des Weiteren die normale Entwicklung des Frühgeborenen unterstützen. Darüber hinaus konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Gegenwart von Fetalzonensteroiden die Zugabe von E2 keinen zusätzlichen Effekt zur Fetalzonensteroid-initiierten Protektion verursachte. Da Fetalzonensteroide im μM -Bereich im Frühgeborenen akkumulieren, könnte eine Sättigung durch Bindungskonkurrenz am ER bei E2-Substitution stattfinden. Eine Sättigung des Effekts am Rezeptor könnte so den klinischen Effekt einer Substitution von E2 bei Frühgeborenen abschwächen wie er in den zuvor durchgeführten präklinischen Studien zu beobachten war.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die derzeit verwendeten Frühgeborenen-Modelle eine solide Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze bieten, da diese bisher die großen Mengen an Fetalzonensteroiden nicht berücksichtigen. Ein Ansatz, welcher Fetalzonensteroiden mit dem unreifen Modell verbindet, sollte für zukünftige Untersuchungen in Betracht gezogen werden, am besten für alle Erkrankungen im Frühgeborenen.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16:3-11.
- [2] Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology*. 1990;11:690-8.
- [3] Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clinical science*. 1992;83:639-48.
- [4] Franklin RA, McCubrey JA. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia*. 2000;14:2019-34.
- [5] Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997;88:347-54.
- [6] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7.
- [7] Simmons LE, Rubens CE, Darmstadt GL, Gravett MG. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Seminars in perinatology*. 2010;34:408-15.
- [8] Perrott S, Dodds L, Vincer M. A population-based study of prognostic factors related to major disability in very preterm survivors. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2003;23:111-6.
- [9] Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. *NICHD Neonatal Research Network*. *Pediatrics*. 2001;107:E1.
- [10] Dobbing J, Sands J. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biology of the neonate*. 1971;19:363-78.
- [11] Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 5th ed. 2008; Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008.
- [12] Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2011;29:423-40.
- [13] Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, et al. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28:1236-45.
- [14] Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR, Paneth N. Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatric research*. 2001;50:712-9.

- [15] Holling EE, Leviton A. Characteristics of cranial ultrasound white-matter echolucencies that predict disability: a review. *Developmental medicine and child neurology*. 1999;41:136-9.
- [16] Beaino G, Khoshnood B, Kaminski M, Pierrat V, Marret S, Matis J, et al. Predictors of cerebral palsy in very preterm infants: the EPIPAGE prospective population-based cohort study. *Developmental medicine and child neurology*. 2010;52:e119-25.
- [17] Brossard-Racine M, du Plessis AJ, Limperopoulos C. Developmental cerebellar cognitive affective syndrome in ex-preterm survivors following cerebellar injury. *Cerebellum*. 2015;14:151-64.
- [18] Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012;379:2162-72.
- [19] Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocrine reviews*. 1997;18:378-403.
- [20] Ishimoto H, Jaffe RB. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocrine reviews*. 2011;32:317-55.
- [21] Diczfalusy E. Endocrine Functions of the Human Fetoplacental Unit. *Federation proceedings*. 1964;23:791-8.
- [22] Pasqualini JR, Cedard L, Nguyen BL, Alsatt E. Differences in the activity of human term placenta sulphatases for steroid ester sulphates. *Biochimica et biophysica acta*. 1967;139:177-9.
- [23] Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocrine reviews*. 1990;11:124-50.
- [24] Siiteri PK, MacDonald PC. The utilization of circulating dehydroepiandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy. *Steroids*. 1963;2:713-30.
- [25] Blackburn S. *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology*: Elsevier Health Sciences; 2014.
- [26] Seron-Ferre M, Jaffe RB. The fetal adrenal gland. *Annual review of physiology*. 1981;43:141-62.
- [27] Bolte E, Mancuso S, Eriksson G, Wiquist N, Diczfalusy E. Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women. I. Aromatisation of C-19 Steroids by Placentas Perfused in Situ. *Acta endocrinologica*. 1964;45:535-59.
- [28] Siiteri PK, MacDonald PC. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1966;26:751-61.
- [29] Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJ. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;110:138-43.

- [30] Grueters A, Korth-Schutz S. Longitudinal study of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in preterm and fullterm infants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1982;55:314-20.
- [31] Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1972;112:1095-100.
- [32] Midgley PC, Russell K, Oates N, Shaw JC, Honour JW. Activity of the adrenal fetal zone in preterm infants continues to term. *Endocrine research*. 1996;22:729-33.
- [33] Heckmann M, Hartmann MF, Kampschulte B, Gack H, Bodeker RH, Gortner L, et al. Persistent high activity of the fetal adrenal cortex in preterm infants: is there a clinical significance? *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2006;19:1303-12.
- [34] Bocian-Sobkowska J. Morphometric study of the human suprarenal gland in the first postnatal year. *Folia morphologica*. 2000;58:275-84.
- [35] Hata K, Nagata H, Nishigaki A, Aoki S, Hata T, Murao F, et al. Ultrasonographic evaluation of adrenal involution during antenatal and neonatal periods. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1988;26:29-32.
- [36] Forest MG, de Peretti E, Bertrand J. Testicular and adrenal androgens and their binding to plasma proteins in the perinatal period: developmental patterns of plasma testosterone, 4-androstenedione, dehydroepiandrosterone and its sulfate in premature and small for date infants as compared with that of full-term infants. *Journal of steroid biochemistry*. 1980;12:25-36.
- [37] Midgley PC, Russell K, Oates N, Holownia P, Shaw JC, Honour JW. Adrenal function in preterm infants: ACTH may not be the sole regulator of the fetal zone. *Pediatric research*. 1998;44:887-93.
- [38] Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 2007;28:931-7.
- [39] Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of experimental biology*. 2004;207:3149-54.
- [40] Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, Mahler L, et al. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of disease*. 2004;17:273-82.
- [41] Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P, et al. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatric research*. 2006;59:428-33.
- [42] Eklind S, Hagberg H, Wang X, Savman K, Leverin AL, Hedtjarn M, et al. Effect of lipopolysaccharide on global gene expression in the immature rat brain. *Pediatric research*. 2006;60:161-8.
- [43] Brehmer F, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, et al. Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PloS one*. 2012;7:e49023.

- [44] Brochu ME, Girard S, Lavoie K, Sebire G. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8:55.
- [45] Rosenberg PA, Dai W, Gan XD, Ali S, Fu J, Back SA, et al. Mature myelin basic protein-expressing oligodendrocytes are insensitive to kainate toxicity. *Journal of neuroscience research*. 2003;71:237-45.
- [46] Cizkova D, Cizek M, Nagyova M, Slovinska L, Novotna I, Jergova S, et al. Enrichment of rat oligodendrocyte progenitor cells by magnetic cell sorting. *Journal of neuroscience methods*. 2009;184:88-94.
- [47] Zhang SC, Lundberg C, Lipsitz D, O'Connor LT, Duncan ID. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *Journal of neurocytology*. 1998;27:475-89.
- [48] Gerstner B, Buhner C, Rheinlander C, Polley O, Schuller A, Berns M, et al. Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *Journal of neuroscience research*. 2006;84:306-15.
- [49] Deng W, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:6801-6.
- [50] Miller BA, Crum JM, Tovar CA, Ferguson AR, Bresnahan JC, Beattie MS. Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. *Journal of neuroinflammation*. 2007;4.
- [51] Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA, Levison SW, Wood TL, Gressens P, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289:9430-9.
- [52] Takahashi H, Kosaka N, Nakagawa S. alpha-Tocopherol protects PC12 cells from hyperoxia-induced apoptosis. *Journal of neuroscience research*. 1998;52:184-91.
- [53] Li Y, Xu N, Cai L, Gao ZJ, Shen L, Zhang QM, et al. NDRG2 Is a Novel p53-Associated Regulator of Apoptosis in C6-Originated Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation. *PLoS One*. 2013;8.
- [54] Kim NG, Lee H, Son E, Kwon OY, Park JY, Park JH, et al. Hypoxic induction of caspase-11/caspase-1/interleukin-1beta in brain microglia. *Brain research Molecular brain research*. 2003;114:107-14.
- [55] Polin RA, Fox WW, Abman SH. *Fetal and neonatal physiology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2011.
- [56] Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, et al. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics*. 2008;121:882-9.

- [57] Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovacs L, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2002;103:136-9.
- [58] Smith CV, Hansen TN, Martin NE, McMicken HW, Elliott SJ. Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatric research*. 1993;34:360-5.
- [59] Sim FJ, McClain CR, Schanz SJ, Protack TL, Windrem MS, Goldman SA. CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nature biotechnology*. 2011;29:934-41.
- [60] Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *Journal of neuroscience research*. 1996;43:299-314.
- [61] Richter-Landsberg C, Heinrich M. OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *Journal of neuroscience research*. 1996;45:161-73.
- [62] Ozgen H, Kahya N, de Jonge JC, Smith GS, Harauz G, Hoekstra D, et al. Regulation of cell proliferation by nucleocytoplasmic dynamics of postnatal and embryonic exon-II-containing MBP isoforms. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843:517-30.
- [63] Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*. 2001;81:871-927.
- [64] Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 1968;161:370-1.
- [65] Li Y, Xu N, Cai L, Gao Z, Shen L, Zhang Q, et al. NDRG2 is a novel p53-associated regulator of apoptosis in C6-originated astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. *PloS one*. 2013;8:e57130.
- [66] Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*. 2001;2:120-9.
- [67] Krencik R, Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nature protocols*. 2011;6:1710-7.
- [68] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A, et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803:991-1002.
- [69] Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2005;69:79-100.
- [70] Xu Y, Liu C, Chen S, Ye Y, Guo M, Ren Q, et al. Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease. *Cellular signalling*. 2014;26:1680-9.

- [71] Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30:214-26.
- [72] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36:320-8.
- [73] Chen JR, Plotkin LI, Aguirre JI, Han L, Jilka RL, Kousteni S, et al. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:4632-8.
- [74] Gross SM, Rotwein P. Mapping growth-factor-modulated Akt signaling dynamics. *Journal of cell science*. 2016;129:2052-63.
- [75] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology*. 1999;11:211-8.
- [76] Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:14843-6.
- [77] Petrache I, Choi ME, Otterbein LE, Chin BY, Mantell LL, Horowitz S, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *The American journal of physiology*. 1999;277:L589-95.
- [78] Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*. 1998;31:152-61.
- [79] Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling*. 2009;21:656-64.
- [80] Tamburini J, Green AS, Chapuis N, Bardet V, Lacombe C, Mayeux P, et al. Targeting translation in acute myeloid leukemia: a new paradigm for therapy? *Cell cycle*. 2009;8:3893-9.
- [81] Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005;121:179-93.
- [82] Lehman JA, Gomez-Cambronero J. Molecular crosstalk between p70S6k and MAPK cell signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;293:463-9.
- [83] Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, et al. S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology*. 2004;24:3112-24.
- [84] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29:233-42.
- [85] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129:1261-74.
- [86] Bergmann A. Survival signaling goes BAD. *Developmental cell*. 2002;3:607-8.

- [87] Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:9666-70.
- [88] Wiza C, Nascimento EB, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302:E1453-60.
- [89] Kim WY, Snider WD. Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011;4:44.
- [90] Priebe A, Tan L, Wahl H, Kueck A, He G, Kwok R, et al. Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2011;122:389-95.
- [91] Gerstner B, Lee J, DeSilva TM, Jensen FE, Volpe JJ, Rosenberg PA. 17beta-estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain. *Journal of neuroscience research*. 2009;87:2078-86.
- [92] Gerstner B, Sifringer M, Dzierko M, Schuller A, Lee J, Simons S, et al. Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol*. 2007;61:562-73.
- [93] Nunez J, Yang Z, Jiang Y, Grandys T, Mark I, Levison SW. 17beta-estradiol protects the neonatal brain from hypoxia-ischemia. *Experimental neurology*. 2007;208:269-76.
- [94] Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, Thompson SM, McCarthy MM. Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluR-induced release of Ca⁺⁺ from intracellular stores and is prevented by estradiol. *The European journal of neuroscience*. 2006;24:3008-16.
- [95] Abdelhamid R, Luo J, Vandevrede L, Kundu I, Michalsen B, Litosh VA, et al. Benzothiophene Selective Estrogen Receptor Modulators Provide Neuroprotection by a novel GPR30-dependent Mechanism. *ACS chemical neuroscience*. 2011;2:256-68.
- [96] Huppmann S, Romer S, Altmann R, Obladen M, Berns M. 17beta-estradiol attenuates hyperoxia-induced apoptosis in mouse C8-D1A cell line. *Journal of neuroscience research*. 2008;86:3420-6.
- [97] Sur P, Sribnick EA, Wingrave JM, Nowak MW, Ray SK, Banik NL. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells. *Brain research*. 2003;971:178-88.
- [98] Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine*. 2006;29:209-15.
- [99] Stein DG. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain research reviews*. 2008;57:386-97.
- [100] Gonzalez M, Cabrera-Socorro A, Perez-Garcia CG, Fraser JD, Lopez FJ, Alonso R, et al. Distribution patterns of estrogen receptor alpha and beta in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. *The Journal of comparative neurology*. 2007;503:790-802.

- [101] Belcher SM. Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum. *Brain research reviews*. 2008;57:481-92.
- [102] Hirahara Y, Matsuda KI, Yamada H, Saitou A, Morisaki S, Takanami K, et al. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia*. 2013;61:420-31.
- [103] Patchev AV, Gotz F, Rohde W. Differential role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *Faseb J*. 2004;18:1568-70.
- [104] Ivanova T, Beyer C. Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell and tissue research*. 2000;300:231-7.
- [105] Broughton BR, Brait VH, Kim HA, Lee S, Chu HX, Gardiner-Mann CV, et al. Sex-dependent effects of G protein-coupled estrogen receptor activity on outcome after ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014;45:835-41.
- [106] Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2009;89:89-97.
- [107] Ruiz-Palmero I, Simon-Areces J, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. Notch/neurogenin 3 signalling is involved in the neurotogenic actions of oestradiol in developing hippocampal neurones. *Journal of neuroendocrinology*. 2011;23:355-64.
- [108] Bagamasbad P, Denver RJ. Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and comparative endocrinology*. 2011;170:3-17.
- [109] Lee YJ, Gorski J. Estrogen-induced transcription of the progesterone receptor gene does not parallel estrogen receptor occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:15180-4.
- [110] Gingerich S, Kim GL, Chalmers JA, Koletar MM, Wang X, Wang Y, et al. Estrogen receptor alpha and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17beta-estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*. 2010;170:54-66.
- [111] Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lytle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*. 2003;144:4562-74.
- [112] Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11:297-305.
- [113] Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16:5425-36.

- [114] Romer W, Oettel M, Menzenbach B, Droescher P, Schwarz S. Novel estrogens and their radical scavenging effects, iron-chelating, and total antioxidative activities: 17 alpha-substituted analogs of delta 9(11)-dehydro-17 beta-estradiol. *Steroids*. 1997;62:688-94.
- [115] Trotter A, Maier L, Pohlandt F. Management of the extremely preterm infant: is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? *Paediatric drugs*. 2001;3:629-37.
- [116] Trotter A, Maier L, Grill HJ, Kohn T, Heckmann M, Pohlandt F. Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84:4531-5.
- [117] Trotter A, Bokelmann B, Sorgo W, Bechinger-Kornhuber D, Heinemann H, Schmucker G, et al. Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement. *J Clin Endocr Metab*. 2001;86:601-3.
- [118] Trotter A, Maier L, Kron M, Pohlandt F. Effect of oestradiol and progesterone replacement on bronchopulmonary dysplasia in extremely preterm infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2007;92:F94-8.
- [119] Trotter A, Steinmacher J, Kron M, Pohlandt F. Neurodevelopmental Follow-Up at Five Years Corrected Age of Extremely Low Birth Weight Infants after Postnatal Replacement of 17 beta-Estradiol and Progesterone. *J Clin Endocr Metab*. 2012;97:1041-7.
- [120] Rees S, Loeliger M, Shields A, Shaul PW, McCurnin D, Yoder B, et al. The effects of postnatal estrogen therapy on brain development in preterm baboons. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;204.
- [121] Lathe R, Kotelevtsev Y. Steroid signaling: ligand-binding promiscuity, molecular symmetry, and the need for gating. *Steroids*. 2014;82:14-22.
- [122] Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2008;11 Suppl 1:64-8.
- [123] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138:863-70.
- [124] Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78:4704-7.
- [125] Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain research*. 1999;830:72-87.
- [126] Miller KK, Al-Rayyan N, Ivanova MM, Mattingly KA, Ripp SL, Klinge CM, et al. DHEA metabolites activate estrogen receptors alpha and beta. *Steroids*. 2013;78:15-25.
- [127] Bruder JM, Sobek L, Oettel M. Dehydroepiandrosterone stimulates the estrogen response element. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1997;62:461-6.

- [128] Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer research*. 1999;59:4864-9.
- [129] Hill M, Paskova A, Kanceva R, Velikova M, Kubatova J, Kancheva L, et al. Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;139:201-22.
- [130] Birmingham MK, Kraulis I, Traikov H, Bartova A, Li MP, Chan TH, et al. Biological consequences of 18-hydroxylation. *Journal of steroid biochemistry*. 1974;5:789-94.
- [131] Li L, Xu B, Zhu Y, Chen L, Sokabe M, Chen L. DHEA prevents Abeta25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology*. 2010;59:323-33.
- [132] Zhang L, Li B, Ma W, Barker JL, Chang YH, Zhao W, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Brain research Molecular brain research*. 2002;98:58-66.
- [133] Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146:624-32.
- [134] Sandra N, Ester P, Marie-Agnes P, Robert M, Olivier H. The DHEA metabolite 7beta-hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines. *Steroids*. 2012;77:542-51.
- [135] Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;320:162-70.
- [136] Liu X, Arnold JT, Blackman MR. Dehydroepiandrosterone administration or G{alpha}q overexpression induces {beta}-catenin/T-Cell factor signaling and growth via increasing association of estrogen receptor-{beta}/Dishevelled2 in androgen-independent prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2010;151:1428-40.
- [137] Mo Q, Lu SF, Simon NG. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;99:50-8.
- [138] Chen F, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, et al. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology*. 2005;146:4568-76.
- [139] Montelli S, Peruffo A, Zambenedetti P, Rossipal E, Giacomello M, Zatta P, et al. Expression of aromatase P450(AROM) in the human fetal and early postnatal cerebral cortex. *Brain research*. 2012;1475:11-8.
- [140] Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.

- [141] Griffith OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257:13704-12.
- [142] Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, et al. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *The American journal of pathology*. 2004;165:501-10.
- [143] Carpentier G. Dot Blot Analyzer: Software development using the macro language of ImageJ. *Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference*, : Centre de Recherche Public Henri Tudor; 2008. p. 3-5.
- [144] Jozwik KM, Carroll JS. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nature reviews Cancer*. 2012;12:381-5.
- [145] Hübner S, Reich B, Heckmann M. Role of sex steroids and their receptors in human preterm infants: Impacts on future treatment strategies for cerebral development. *Biochemical pharmacology*. 2015;98:556-63.
- [146] Hübner S, Sunny DE, Pöhlke C, Ruhnau J, Vogelgesang A, Reich B, et al. Protective Effects of Fetal Zone Steroids Are Comparable to Estradiol in Hyperoxia-Induced Cell Death of Immature Glia. *Endocrinology*. 2017.
- [147] Miller BA, Crum JM, Tovar CA, Ferguson AR, Bresnahan JC, Beattie MS. Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. *Journal of neuroinflammation*. 2007;4:28.
- [148] Butts BD, Houde C, Mehmet H. Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell death and differentiation*. 2008;15:1178-86.
- [149] Wang H, Wu JL. 17 beta-estradiol suppresses hyperoxia-induced apoptosis of oligodendrocytes through paired-immunoglobulin-like receptor B. *Mol Med Rep*. 2016;13:2892-8.
- [150] Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, Chandross KJ. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J Neurochem*. 2004;89:660-73.
- [151] Yeh WL, Shioda K, Coser KR, Rivizzigno D, McSweeney KR, Shioda T. Fulvestrant-induced cell death and proteasomal degradation of estrogen receptor alpha protein in MCF-7 cells require the CSK c-Src tyrosine kinase. *PloS one*. 2013;8:e60889.
- [152] Sribnick EA, Ray SK, Banik NL. Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience*. 2006;137:197-209.
- [153] Kilanczyk E, Saraswat Ohri S, Whittemore SR, Hetman M. Antioxidant Protection of NADPH-Depleted Oligodendrocyte Precursor Cells Is Dependent on Supply of Reduced Glutathione. *ASN neuro*. 2016;8.
- [154] Caruso A, Di Giorgi Gerevini V, Castiglione M, Marinelli F, Tomassini V, Pozzilli C, et al. Testosterone amplifies excitotoxic damage of cultured oligodendrocytes. *J Neurochem*. 2004;88:1179-85.

- [155] Frezza M, Yang H, Dou QP. Modulation of the tumor cell death pathway by androgen receptor in response to cytotoxic stimuli. *Journal of cellular physiology*. 2011;226:2731-9.
- [156] Wen S, Niu Y, Lee SO, Chang C. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer treatment reviews*. 2014;40:31-40.
- [157] Shin CY, Choi JW, Jang ES, Ju C, Kim WK, Kim HC, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the death of immunostimulated rat C6 glioma cells deprived of glucose. *Brain research*. 2001;922:267-75.
- [158] Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 2012;33:378-455.
- [159] Owen SC, Doak AK, Ganesh AN, Nedyalkova L, McLaughlin CK, Shoichet BK, et al. Colloidal drug formulations can explain "bell-shaped" concentration-response curves. *ACS chemical biology*. 2014;9:777-84.
- [160] Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Scholmerich J, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83:2012-7.
- [161] Roselli CE, Liu M, Hurn PD. Brain aromatization: classic roles and new perspectives. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27:207-17.
- [162] Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. 1999;140:3843-52.
- [163] Yague JG, Lavaque E, Carretero J, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas. *Neuroscience letters*. 2004;368:279-84.
- [164] Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ, Cos S. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *British journal of cancer*. 2007;97:755-60.
- [165] Weber F, Endesfelder S, Buhner C, Berns M. Effects of progesterone on hyperoxia-induced damage in mouse C8-D1A astrocytes. *Brain and behavior*. 2016;6:e00435.
- [166] Martin YN, Manlove L, Dong J, Carey WA, Thompson MA, Pabelick CM, et al. Hyperoxia-induced changes in estradiol metabolism in postnatal airway smooth muscle. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;308:L141-6.
- [167] Poola I, Koduri S, Chatra S, Clarke R. Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;72:249-58.
- [168] Fasco MJ, Keyomarsi K, Arcaro KF, Gierthy JF. Expression of an estrogen receptor alpha variant protein in cell lines and tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;166:156-69.

- [169] Horvath G, Leser G, Helou K, Henriksson M. Function of the exon 7 deletion variant estrogen receptor alpha protein in an estradiol-resistant, tamoxifen-sensitive human endometrial adenocarcinoma grown in nude mice. *Gynecologic oncology*. 2002;84:271-9.
- [170] Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, Warner M, et al. Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biology of reproduction*. 2002;67:616-23.
- [171] Read LD, Greene GL, Katzenellenbogen BS. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors. *Molecular endocrinology*. 1989;3:295-304.
- [172] Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatology research and practice*. 2012;2012:354191.
- [173] Hsu J, Shi Y, Krajewski S, Renner S, Fisher M, Reed JC, et al. The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood*. 2001;98:2853-5.
- [174] Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzman M. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *Faseb J*. 2000;14:2315-22.
- [175] Oh HL, Seok JY, Kwon CH, Kang SK, Kim YK. Role of MAPK in ceramide-induced cell death in primary cultured astrocytes from mouse embryonic brain. *Neurotoxicology*. 2006;27:31-8.
- [176] Marin-Husstege M, Muggironi M, Raban D, Skoff RP, Casaccia-Bonnel P. Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones. *Dev Neurosci-Basel*. 2004;26:245-54.
- [177] Swamydas M, Bessert D, Skoff R. Sexual dimorphism of oligodendrocytes is mediated by differential regulation of signaling pathways. *Journal of neuroscience research*. 2009;87:3306-19.
- [178] Zisk JL, Genen LH, Kirkby S, Webb D, Greenspan J, Dysart K. Do premature female infants really do better than their male counterparts? *Am J Perinatol*. 2011;28:241-6.
- [179] Peacock JL, Marston L, Marlow N, Calvert SA, Greenough A. Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. *Pediatric research*. 2012;71:305-10.
- [180] Noel H, Plante L, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Human placental steroid sulfatase: purification and properties. *Journal of steroid biochemistry*. 1983;19:1591-8.
- [181] Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, et al. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87:5760-8.
- [182] Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:46.
- [183] Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, et al. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell and tissue research*. 2005;320:369-78.

- [184] Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *The Journal of clinical investigation*. 1979;64:145-54.
- [185] Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30:65-91.
- [186] Baulieu EE, Robel P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:4089-91.
- [187] Compagnone NA, Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:4678-83.
- [188] Carette B, Poulain P. Excitatory effect of dehydroepiandrosterone, its sulphate ester and pregnenolone sulphate, applied by iontophoresis and pressure, on single neurones in the septo-preoptic area of the guinea pig. *Neuroscience letters*. 1984;45:205-10.
- [189] Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, et al. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:8209-14.
- [190] Roberts E, Bologna L, Flood JF, Smith GE. Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. *Brain research*. 1987;406:357-62.
- [191] Melchior CL, Ritzmann RF. Neurosteroids block the memory-impairing effects of ethanol in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1996;53:51-6.
- [192] Kimonides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, Sofroniew MV, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:1852-7.
- [193] Schmidt B, Asztalos EV, Roberts RS, Robertson CM, Sauve RS, Whitfield MF, et al. Impact of bronchopulmonary dysplasia, brain injury, and severe retinopathy on the outcome of extremely low-birth-weight infants at 18 months: results from the trial of indomethacin prophylaxis in preterms. *Jama*. 2003;289:1124-9.
- [194] Zhang H, Wang X, Xu K, Wang Y, Wang Y, Liu X, et al. 17beta-estradiol ameliorates oxygen-induced retinopathy in the early hyperoxic phase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;457:700-5.
- [195] McCurnin DC, Pierce RA, Willis BC, Chang LY, Yoder BA, Yuhanna IS, et al. Postnatal estradiol up-regulates lung nitric oxide synthases and improves lung function in bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;179:492-500.

[196] Mileva G, Baker SL, Konkle AT, Bielajew C. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health*. 2014;11:7537-61.

[197] Varayoud J, Ramos JG, Munoz-de-Toro M, Luque EH. Long-lasting effects of neonatal bisphenol A exposure on the implantation process. *Vitamins and hormones*. 2014;94:253-75.

[198] Bern HA, Jones LA, Mills KT. Use of the neonatal mouse in studying long-term effects of early exposure to hormones and other agents. *Journal of toxicology and environmental health Supplement*. 1976;1:103-16.

[199] Troisi R, Hatch EE, Titus-Ernstoff L, Hyer M, Palmer JR, Robboy SJ, et al. Cancer risk in women prenatally exposed to diethylstilbestrol. *Int J Cancer*. 2007;121:356-60.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen und Synthese der Östrogene in der feto-plazentaren Einheit.	15
Abbildung 2: Urinausscheidungsraten von 3 β -OH-5-en-Steroiden in Frühgeborenen.....	16
Abbildung 3: Reifegrade von Oligodendrozyten mit entsprechenden Markern	19
Abbildung 4: Reifegrade von Astrozyten mit entsprechenden Markern.....	20
Abbildung 5: Downstream-Messenger der ERK1/2, Akt und AMPK Signalwege	23
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung genomischer und nicht-genomischer Effekte von E225	
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Objektträgers beim Dot Blot.	56
Abbildung 8: Workflow für die Array-Auswertung.	60
Abbildung 9: Nachweis zelltypspezifischer Marker	62
Abbildung 10: Rezeptorausstattung der untersuchten Zelltypen	63
Abbildung 11: Induktion von Apoptose durch Hyperoxie und Staurosporin	65
Abbildung 12: Repräsentatives Beispiel für OLN-93 Zellen bei Normoxie bzw. Hyperoxie. 65	
Abbildung 13: E2 schützt dosisabhängig vor Hyperoxie-induzierten Zelltod.....	67
Abbildung 14: Klassische und nicht-klassische ERs sind an der E2-vermittelten Protektion beteiligt.....	69
Abbildung 15: Dosisabhängige Protektion durch Fetalzonensteroiden	70
Abbildung 16: An der DHEA-vermittelten Protektion beteiligte Rezeptoren	73
Abbildung 17: Einfluss von Aromatasen auf die Fetalzonensteroid-vermittelte Protektion ...	75
Abbildung 18: Protektion durch Kombinationsbehandlung von E2 und Fetalzonensteroiden	
Abbildung 19: Relative Rezeptordichte durch Hyperoxie und Steroidhormonbehandlung in C6 Zellen.....	79
Abbildung 20: Relative Rezeptordichte durch Hyperoxie und Steroidhormonbehandlung in OLN-93 Zellen	81
Abbildung 21: Ergebnisse der Western Blots nach Normierung auf DMSO	82
Abbildung 22: Ergebnisse der PathScan-Analyse in den C6 Zellen	85
Abbildung 23: Ergebnisse der PathScan-Analyse in den OLN-93 Zellen	86
Abbildung 24: Vergleich Ergebnisse aus Western Blots und PathScan-Analyse	88
Abbildung 25: Übersicht der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten von Zellen auf Östrogene und/oder Fetalzonensteroiden	94

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen für OLN-93 Zellen.	36
Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen für C6 Zellen.	37
Tabelle 3: Verwendete Steroidhormone, Agonisten, Antagonisten und Inhibitoren mit Konzentrationen.	38
Tabelle 4: Details zu verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern für die Immunfluoreszenz.	45
Tabelle 5: Komponenten und Mengen für 20µl PCR-Reaktionsansatz.	47
Tabelle 6: Ablauf der PCR-Reaktionsschritte.	47
Tabelle 7: Pipettierschema für Standardkurve und Probenmessung beim Bradford Assay.	51
Tabelle 8: Details zu verwendeten Antikörpern für den Western Blot.	54
Tabelle 9: Details zu den im Dot Blot detektierbaren Zielmolekülen.	57
Tabelle 10: Median der wirksamen Konzentration (EC_{50}) der Dosis-Antwort-Kurven.	71
Tabelle 11: An der Protektion beteiligte Rezeptoren.	74
Tabelle 12: Statistischer Vergleich der Darstellungsmöglichkeiten der Ergebnisse des Western Blot.	83
Tabelle 13: Aktivierte Signalwege durch Steroidhormonbehandlung im PathScan.	87

V. Anhang

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma	Bestellnummer	Ort	Land
(±)-(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-8-(1-methylethyl)-3H-cyclopenta[c]quinolin (G36)	Tocris Bioscience	4759	Bristol	UK
(±)-1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanon (G1)	Tocris Bioscience	3577	Bristol	UK
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore	1.11474.0025	Darmstadt	Deutschland
100x TE-Puffer, pH 8	Merck Millipore	57493	Darmstadt	Deutschland
10x TAE-Puffer	Carl Roth	T845.2	Karlsruhe	Deutschland
17β-Estradiol (E2)	Sigma-Aldrich	E2758	Steinheim	Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth	6752.1	Karlsruhe	Deutschland
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (T3)	Sigma-Aldrich	T6397	Steinheim	Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat (CHAPS)	Carl Roth	1479.3	Karlsruhe	Deutschland
5-Androsten-3β, 16α-diol-17-one (16OH-DHEA)	Steraloids Inc.	A7900-000	Newport	USA
5-Androsten-3β, 17β-diol (Adiol)	Steraloids Inc.	A7830-000	Newport	USA
Agarose	Biozym	840004	Hessisch Oldendorf	Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck Millipore	1.01201	Darmstadt	Deutschland
Annexin V Binding Buffer	BioLegend	422201	Fell	Deutschland
Annexin V-APC Konjugat	BioLegend	640920	Fell	Deutschland
Aqua Ad Iniectionabilia	Alleman Pharma	PZN: 8771010	Reutlingen	Deutschland
Bicalutamide/ Casodex (CDX)	Sigma-Aldrich	B9061	Steinheim	Deutschland

Bovines Albumin, Fraktion V (BSA)	MP Biomedicals	810033	Solon	USA
Bromphenolblau (BPB)	Carl Roth	A512.1	Karlsruhe	Deutschland
Chloroform	Merck Millipore	1.02445.250	Darmstadt	Deutschland
D,L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)	Sigma-Aldrich	B2640	Steinheim	Deutschland
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	Sigma-Aldrich	D4000	Steinheim	Deutschland
DEPC-Wasser	Thermo Fisher	AM9906	Schwerte	Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D5879	Steinheim	Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Merck Millipore	1.06580.1000	Darmstadt	Deutschland
dNTP Mix (je 10mM)	Thermo Fisher	R0192	Schwerte	Deutschland
Donor Horse Serum (Pferdeserum, DHS)	Merck Millipore	S9135	Darmstadt	Deutschland
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase	Thermo Fisher	EP0701	Schwerte	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), modifiziert	Life Technologies	11960-044	Darmstadt	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), modifiziert	Biochrom	F 0425	Berlin	Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech	P04-36500	Aidenbach	Deutschland
Essigsäure, konzentriert (Eisessig)	Sigma-Aldrich	45731	Steinheim	Deutschland
Ethanol (EtOH)	Th. Geier	2246.1000	Renningen	Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck Millipore	8190400025	Darmstadt	Deutschland
Exemestane (Exe)	Sigma-Aldrich	PZ0006	Steinheim	Deutschland
Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum, FCS)	Biochrom	S0615	Berlin	Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich	F6886	Steinheim	Deutschland
GlutaMax	Life Technologies	35050-038	Darmstadt	Deutschland
Glyzerin	Sigma-Aldrich	G5516	Steinheim	Deutschland
Guanidinium-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	G3272	Steinheim	Deutschland
Glycine	Acros Organics	56-40-6	Geel	Belgien
Halt Protease & Phosphatase Single-use inhibitor cocktail (100x)	Thermo Fisher	78442	Schwerte	Deutschland
Ham's F-12K (Kaighn's)	Life Technologies	21127-022	Darmstadt	Deutschland

Medium (F-12K Medium)				
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) w Calcium und Magnesium	Life Technologies	14025-100	Darmstadt	Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) w/o Calcium und Magnesium	Sigma-Aldrich	H6648	Steinheim	Deutschland
Harnstoff	Merck Millipore	1.08488.100	Darmstadt	Deutschland
Hoechst 33342 (Hoechst)	Sigma-Aldrich	14533	Steinheim	Deutschland
Human Albumin 20% (HSA)	Grifols	PZN: 0954395	Frankfurt am Main	Deutschland
ICI 182,780 (Fulvestrant, ICI)	Sigma-Aldrich	I4409	Steinheim	Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	P017.2	Karlsruhe	Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Carl Roth	P018.2	Karlsruhe	Deutschland
MACS NeuroBrew	Miltenyi Biotech	130-093- 566	Bergisch Gladbach	Deutschland
MACS NeuroMedium	Miltenyi Biotech	130-093- 570	Bergisch Gladbach	Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth	T145.2	Karlsruhe	Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker	8402	Griesheim	Deutschland
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher	78501	Schwerte	Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957.1	Karlsruhe	Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	151-21-3	Heidelberg	Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Sigma-Aldrich	71692	Steinheim	Deutschland
Normal Goat Serum (Ziegenserum, NGS)	Jackson ImmunoResearch	005-000- 121	West Grove	USA
O'Gene Ruler DNA-Leiter	Thermo Fisher	SM1203	Schwerte	Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	158127	Steinheim	Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (P/S)	Life Technologies	15140122	Darmstadt	Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher	32106	Schwerte	Deutschland
Platelet-Derived Growth Factor-AA (PDGF)	Peptotech	100-13A	Hamburg	Deutschland
Poly-D,L-Ornithin Hydrobromid (Poly-Ornithin)	Sigma-Aldrich	P0421	Steinheim	Deutschland
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich	P9155	Steinheim	Deutschland

Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich	P4170	Steinheim	Deutschland
Recombinant Rat Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)	PeptoTech	450-50	Hamburg	Deutschland
Recombinant Rat Interleukin 6 (IL-6)	PeptoTech	400-06	Hamburg	Deutschland
recombinat human FGF-basic (bFGF)	Peptotech	100-18B	Hamburg	Deutschland
RedSafe	Intron Biotechnology	21141	Seongnam	Korea
10x SDS Page	Carl Roth	3060.2	Karlsruhe	Deutschland
Rotiphorese 30 Acrylamidlösung	Carl Roth	3029.2	Karlsruhe	Deutschland
Rotiquant	Carl Roth	K015.1	Karlsruhe	Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth	4625.1	Karlsruhe	Deutschland
Staurosporin (Ssp)	Sigma-Aldrich	S4400	Steinheim	Deutschland
SuperSignal Molecular Enhanced Weight Protein Ladder	Thermo Fisher	PI-84786	Schwerte	Deutschland
SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder	Thermo Fisher	84785	Schwerte	Deutschland
TE/G-Puffer (Probenpuffer)	Carl Roth	T839.1	Karlsruhe	Deutschland
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth	2367.1	Karlsruhe	Deutschland
Thioharnstoff	Merck Millipore	1.07979.0250	Darmstadt	Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth	0188.2	Karlsruhe	Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787	Steinheim	Deutschland
TRIZOL Reagent	Life Technologies	15596-026	Darmstadt	Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich	93595	Steinheim	Deutschland
Trypsin 2,5%	Biochrom	L 2133	Berlin	Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich	P137-9	Steinheim	Deutschland
Vectashield Mounting Medium mit Dapi	Vector Laboratories	H-1500	Peterborough	UK
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich	M-6250	Steinheim	Deutschland

2.1.2. Kits

Name	Firma	Bestell- nummer	Ort	Land
<i>Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set</i>	BD Bioscience	552843	Heidelberg	Deutschland
<i>CD140a (PDGFRα) MicroBead Kit</i>	Miltenyi Biotech	130-101- 502	Bergisch Gladbach	Deutschland
<i>CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit</i>	Life Technologies	C10427	Darmstadt	Deutschland
<i>CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i>	Promega	G4100	Mannheim	Deutschland
<i>LDH-Cytotoxicity Assay Kit II</i>	Abcam	65393	Cambridge	UK
<i>Neural Tissue Dissociation Kit (P)</i>	Miltenyi Biotech	130-092- 628	Bergisch Gladbach	Deutschland
<i>PathScan Intracellular Signaling Array Kit (Chemilumineszenz)</i>	Cell Signaling	7323S	Danvers	USA
<i>QIAamp DNA Kit Mini</i>	QIAGEN	51304	Hilden	Deutschland

2.1.3. Antikörper

Name	Firma	Bestell- nummer	Ort	Land
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 Konjugat	Life Technologies	A-11029	Darmstadt	Deutschland
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594 Konjugat	Life Technologies	A-11005	Darmstadt	Deutschland
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594 Konjugat	Life Technologies	A-11012	Darmstadt	Deutschland
Mouse Anti-Androgenrezeptor (Klon AR441)	Abcam	ab9474	Cambridge	UK
Mouse Anti-CNPase (Klon 11-5B)	Abcam	ab6319	Cambridge	UK
Mouse Anti-Oligodendrocyte Marker O4, (Klon O4)	R&D Systems	MAB1326	Wiesbaden	Deutschland

Mouse Anti-Rat IgG2a-APC (Klon RG7/1.30)	Miltenyi Biotech	130-104-736	Bergisch Gladbach	Deutschland
Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	115-036-146	West Grove	USA
Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	111-036-003	West Grove	USA
Rabbit Anti-Akt	Cell Signaling	9272 S	Danvers	USA
Rabbit Anti-CYP19 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology	sc-30086	Heidelberg	Deutschland
Rabbit Anti-Estrogenrezeptor-α (HC-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-543	Heidelberg	Deutschland
Rabbit Anti-Estrogenrezeptor-β	Affinity BioReagent	PA1-311	Golden	USA
Rabbit Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich	G9545	Steinheim	Deutschland
Rabbit Anti-GFAP (Klon G-A-5)	Sigma-Alrich	G3893	Steinheim	Deutschland
Rabbit Anti-GPER/GPR30	Abcam	ab39742	Cambridge	UK
Rabbit Anti-p44/42 MAP-Kinase (ERK1/2)	Cell Signaling	9102 S	Danvers	USA
Rabbit Anti-Phospho Akt (Ser473)	Cell Signalling	9271 S	Danvers	USA
Rabbit Anti-phospho-p44/42 MAP-Kinase (Klon D13.14.4E)	Cell Signaling	4370 S	Danvers	USA
Rabbit Anti-S100β (Klon EP1576Y)	Abcam	ab52642	Cambridge	UK
Rabbit Anti-β-Actin	Sigma-Aldrich	A6022-.2ML	Steinheim	Deutschland
Rat-Anti CD140-APC (Klon APA5)	Miltenyi Biotech	130-102-473	Bergisch Gladbach	Deutschland

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Bestellnummer	Ort	Land
0,2μm Filteraufsätze	Sarstedt	83.1836.001	Nümbrecht	Deutschland
0,5ml Aufsätze Multipette, steril	Eppendorf	0030.069.226	Hamburg	Deutschland
15ml Röhren, PP 17x120mm	Sarstedt	62554502	Nümbrecht	Deutschland

50ml Röhrchen, PP 30x115mm	BD Bioscience	352070	Heidelberg	Deutschland
70�m Zellsiebe	BD Bioscience	352340	Heidelberg	Deutschland
8-Tube-Streifen	Thermo Fisher	TUC0081	Schwerte	Deutschland
Blotting-Papier (GB003)	GE Healthcare	10427812	München	Deutschland
Cryovial Cryoröhrchen 2ml	Carl Roth	E309.1	Karlsruhe	Deutschland
Deckgläser rund, 12mm	Carl Roth	P231.1	Karlsruhe	Deutschland
Einmalküvetten	Carl Roth	Y195.1	Karlsruhe	Deutschland
Eppendorf Gefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml und 5ml)	Eppendorf	0030.119.40 1	Hamburg	Deutschland
FACS-Röhrchen	Falcon, Corning	352008	Kaisers- lautern	Deutschland
Filterpaper	GE Healthcare	1001150	München	Deutschland
Glaspasteurpipetten	John Poulten	D812	Essex	UK
LS-Säule	Miltenyi Biotech	130-042- 401	Bergisch- Gladbach	Deutschland
Nylonnetz	Flow Mesh	FM-100	Boston	USA
Objektträger	R. Langenbrinck	03-0040	Emmen- dingen	Deutschland
Petrischalen, cell+ für adherente Kulturen	Sarstedt	82.1473	Nümbrecht	Deutschland
Pipettenspitzen für jeweilige Pipetten	Eppendorf	0030.000.X XX	Hamburg	Deutschland
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz	Biozym	VT0210	Hessisch Oldendorf	Deutschland
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories	162-0177	München	Deutschland
serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt	86.XXX.00 1	Nümbrecht	Deutschland
Skalpellschneid- klingen (Einmalklingen, gerade), No.11	Feather	2201306	Osaka	Japan
Spritzen (10ml, 20ml)	BD Bioscience	309110	Heidelberg	Deutschland
T75- Zellkulturflachen, rote Kappe	Sarstedt	83.1813.002	Nümbrecht	Deutschland
Top Filter für Gewinde 45 mm (150ml; 0,2�m)	VWR	734-5063	Darmstadt	Deutschland
well-Platten (6-well; 24- well; 96-well), cell+ für adherente Kulturen	Sarstedt	83.XXXX.3 00	Nümbrecht	Deutschland
Zellschaber	Greiner BioOne	541070	Fricken- hausen	Deutschland

2.1.5. Geräte

Name	Firma	Model	Ort	Land
-20°C Tiefkühler	Liebherr	profi line 550l	Bulle	Schweiz
4°C Kühlschränk	Liebherr	gastro line 550l	Bulle	Schweiz
-80°C Tiefkühler	Heraeus	Hera Freeze	Hanau	Deutschland
8-Kanalpipette	Brand	Transferpett e, 20-200 µl	Wertheim	Deutschland
Autoklav	Systec	DX 150	Linden	Deutschland
Bunsenbrenner	Camping Gaz	C2016 GLS	Hungen- Inheiden	Deutschland
Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher	5100-0001	Schwerte	Deutschland
Dokumentationssystem für Gele und Membranen	Bio-Rad Laboratories	ChemiDoc XRS	München	Deutschland
Durchflusszytometer (FACS)	BD Bioscience	LSRII	Heidelberg	Deutschland
Elektronischer Hand- Dipenser	Eppendorf	Multipette Plus	Hamburg	Deutschland
Feinwaage	Ohaus	AR2140	Nänikon	Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Leica	DMI 4000b	Wetzlar	Deutschland
Gelkammer mit integriertem Gießstand für Agarose-Gele	Peqlab	40-0708	Erlangen	Deutschland
Inkubator mit 37°C, 5% CO2	Binder	CB150	Tuttlingen	Deutschland
Inkubator mit 37°C, 5% CO2 und 80% O2	Binder	CB53	Tuttlingen	Deutschland
Inversionsmikroskop mit Zählkular	Helmut Hund	Wilovert S	Wetzlar	Deutschland
kabelloser Inkubationsmischer	Miltenyi Biotech	MACSMix	Bergisch Gladbach	Deutschland
Kühlzentrifuge für Eppendorf-Gefäße	Sigma	1-15PK	Osterode am Harz	Deutschland
Magnetrührer	GLW	M23	Würzburg	Deutschland
Magnet-Separator	Miltenyi Biotech	Quadro- MACS	Bergisch Gladbach	Deutschland
Mechanischer Summenzähler	RS Components GmbH	710-5212	Mörfelden- Walldorf	Deutschland
Mikro-Messzelle (Küvette für Bestimmung DNA- Konzentration)	Hellma Analytics	TrayCell	Müllheim	Deutschland
Mikrowelle	Siemens	HF 800W	München	Deutschland

Mini Trans-Blot Module	Bio-Rad Laboratories	170-3935	München	Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories	165-8006	München	Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik	Neubauer	Friedrichs- dorf	Deutschland
Orbital-Mischer	Edmund Bühler	SM30A	Hechingen	Deutschland
pH-Messgerät	Mettler Toledo	MP 220	Gießen	Deutschland
Pinzette; 7cm, gebogene Spitze	Fine Science Tools	11067-07	Heidelberg	Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Research Plus	Hamburg	Deutschland
Pipettierhilfe serolog. Pipetten	Hirschmann	Pipetus- Akku	Eberstadt	Deutschland
Plattenreader	Thermo Fisher	Multiscan Ex	Schwerte	Deutschland
PowerSupply für Agarose Gele	Consort	EV202	Turnhout	Belgien
PowerSupply für Gel und Transfer Western Blot	Bio-Rad Laboratories	Power Pac 1000	München	Deutschland
Real-Time PCR-System	Applied Biosystems	StepOne- Plus	Hanau	Deutschland
Reinstwasser-Anlage	Millipore	Bio-Pak Polisher	Darmstadt	Deutschland
Ringpinzette für Membranen	Carl Roth	LL00.1	Karlsruhe	Deutschland
Rollinkubator	Karl Hecht	RM5.40	Sondheim	Deutschland
Schere; 14,5cm, gerade Spitze	Fine Science Tools	14002-14	Heidelberg	Deutschland
Schere; 9,5cm, gerade Spitze	Fine Science Tools	14060-09	Heidelberg	Deutschland
Schüttler	Thermo Fisher	64724	Schwerte	Deutschland
Skalpellschalenhalter; 12cm	Fine Science Tools	10003-12	Heidelberg	Deutschland
Spektralphotometer	Thermo Fisher	Genesys 10S UV-Vis	Schwerte	Deutschland
Sterilbank	Heraeus	HERA Safe	Hanau	Deutschland
Stickstofftank	Air Liquide	ARPEGE 40l	Krefeld	Deutschland
Thermo-Mixer	Biozym	PocketBloc Thermo- mixer	Hessisch Oldendorf	Deutschland
Tischzentrifuge	Hangzhaou Allsheng	Mini-6K	Zhejiang	China

	Instruments			
Vortexer	Phoenix Instrument	RS-VA10	Garbsen	Deutschland
Vortex-Mixer für Eppendorf-Gefäße	Eppendorf	MixMate	Hamburg	Deutschland
Waage	Sartorius	AZ3102	Göttingen	Deutschland
Wasserbad	GFL	1023	Burgwedel	Deutschland
Western Blot-Zubehör (Glassplatten, Schwämme, Käbme, Gießstand)	Bio-Rad Laboratories	für 1,5mm Minigele	München	Deutschland
Zentrifuge für große Tubes und Platten	Thermo Fisher	MegaFuge 40R	Hanau	Deutschland

2.1.6. Software

Name	Firma	Ort	Land
Ascent	Thermo Fisher	Schwerte	Deutschland
ChemSketch	Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)	Toronto	Kanada
Endnote	Thomson Reuters	New York	USA
FACSDIVA	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
FlowJo	FlowJo	Ashland	USA
Graphpad Prism 5	GraphPad Software	La Jolla	USA
ImageLab	Bio-Rad Laboratories	München	Deutschland
LAS AF	Leica	Wetzlar	Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation	Redmond	USA
ImageJ	National Institutes of Health	Bethesda	USA

2.1.7. Medium, Puffer und Lösungen

Puffer für PDGFR α -Isolation

2,5g BSA
in 500ml DPBS lösen
pH-Wert auf 7,2 einstellen und steril
filtrieren
bei 4°C lagern

Poly-Ornithin Stammlösung

2,5% 100mg Poly-Ornithin
in 4ml Aqua Ad Iniectionalia lösen und

steril filtrieren

Aliquote bei -80°C lagern

Poly-Ornithin Arbeitslösung

0,05% 200 μ l Poly-Ornithin-
Stammlösung
9,8ml Aqua Ad Iniectionalia
bei -20°C lagern

PDGFRα-Zellmedium			zwei Wochen bei 4°C stabil		
	96ml	MACS Neuromedium			
2%	2ml	MACS NeuroBrew			
1%	1ml	P/S			
0,5mM	250 μ l	GlutaMax			
10ng/ml	100 μ l	10 μ g/ml bFGF			
10ng/ml	100 μ l	10 μ g/ml PDGF			
steril ansetzen			FCS und DHS Hitze-inaktivieren		
eine Woche bei 4°C stabil			Serum ü. N. bei 4°C auftauen		
			steril 50ml-Aliquote herstellen		
			im Wasserbad für 30min bei 56°C Hitze-inaktivieren		
			abgekühlte Aliquote bei -20°C lagern		
Lösen der Zytokine bFGF, PDGF und CNTF			Einfriermedium OLN-93		
Mit Aqua Ad Iniectionabilia zu einer Konzentration von 0,1 bis 1mg/ml lösen			900 μ l FCS		
Mit Puffer für Langzeitlagerung weiterverdünnen, so dass eine 1:1.000 anzuwendende Stammlösung entsteht			10% 100 μ l DMSO		
Konzentrationen siehe Tabelle im Text			pro Aliquot mit 10 ⁶ Zellen		
Aliquote bei -20°C lagern					
Puffer für Langzeitlagerung Zytokine			BSO		
100mg BSA			250mM 500mg BSO		
in 100ml 1x TBS lösen und steril filtrieren			steril in 9ml Aqua Ad Iniectionabilia lösen		
Aliquote bei -20°C lagern			bei 4°C lagern		
Trypanblaulösung zur Zellzahlbestimmung			Experimentelles Medium		
7,5ml 0,4% Trypanblaulösung			445ml DMEM (Life Technologies)		
7,5ml DPBS			10% 50ml FCS		
mischen und 5min bei 3.000rpm zentrifugieren			1% 5ml P/S		
Überstand in frische Tubes überführen			steril ansetzen		
bei RT lagern			zwei Wochen bei 4°C stabil		
OLN-93 Medium			C6-Medium		
443,75ml DMEM (Biochrom)			407,5ml F-12K Medium		
10%	50ml	FCS	15%	75ml	DHS
1%	5ml	P/S	2,5%	12,5ml	FCS
0,05%	1,25ml	20% HSA	1%	5ml	P/S
steril ansetzen			steril ansetzen		
			zwei Wochen bei 4°C stabil		
			Einfriermedium C6		
			950 μ l C6-Medium		
			5% 50 μ l DMSO		

pro Aliquot mit 10^6 Zellen

Hormonlösungen

Mit DMSO zu einer Stammlösung von 0,1M oder 0,01M lösen (je nach Löslichkeit)

Ausnahme: 0,01M Adiol Stammlösung in DMSO:EtOH 1:1 angesetzt

1:10 Verdünnungen in DMSO bis 1nM herstellen

Aliquote bei -20°C lagern

Anwendung 1:1.000 der jeweiligen Stammlösung

FACS-Puffer

0,5% 2,5g BSA
2mM 0,405g EDTA

in 500ml DPBS lösen

pH-Wert auf 7,2 einstellen und steril filtrieren

bei 4°C lagern

PI

0,05% 5mg PI

in 10ml DPBS lösen

bei 4°C lichtgeschützt lagern

Hoechst

0,1% 10mg Hoechst

in 10ml DMSO lösen

bei -20°C lagern

Poly-L-Lysin

0,01% 5mg Poly-L-Lysin

in 50ml Aqua Ad Iniectionabilia lösen und steril filtrieren

bei -20°C lagern

10x PBS

1,37M 80g NaCl

27mM 20g KCl

100mM 17,8g Na_2HPO_4

18mM 2,4g KH_2PO_4

in 800ml ddH₂O lösen

pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen

auf 1l mit ddH₂O auffüllen und steril filtrieren

bei RT lagern

1x PBS

100ml 10x PBS

900ml ddH₂O

bei RT lagern

4% PFA

40g PFA

800ml 1x PBS

auf einem Magnetrührer auf ca. 60°C erwärmen

NaOH hinzugeben bis Lösung klar

nach dem Abkühlen Lösung filtrieren

Aliquote bei -20°C lagern oder bei 4°C für bis zu einem Monat

10% Triton

10ml Triton

in 90ml ddH₂O lösen und steril filtrieren

bei RT lagern

Blocking für IF

5% 500 μl NGS

0,3% 300 μl 10% Triton

9,2ml 1x PBS

Antikörperverdünnung für IF

3% 300 μl NGS

0,3% 300 μl 10% Triton

9,4ml	1x PBS		
1x TAE-Puffer			
100ml	10x TAE-Puffer		
900ml	ddH ₂ O		
bei RT lagern			
2% Agarosegel			
2g	Agarose		
100ml	1x TAE-Puffer		
in der Mikrowelle erhitzen bis die Agarose aufgelöst ist			
Auf ca. 60°C abkühlen lassen und 5µl RedSafe hinzugeben			
Nach dem Mischen sofort das Gel gießen und ca. 20min aushärten lassen			
Protein-Waschpuffer			
0,3M	14,33g	Guanidinium-Hydrochlorid	
mit reinem EtOH auf 500ml auffüllen bei RT lagern			
Proteinlysepuffer			
8M	24g	Harnstoff	
2M	7,6g	Thioharnstoff	
4%	2g	CHAPS	
40mM	0,24g	Tris	
65mM	0,5g	DTT	
mit ddH ₂ O auf 50ml auffüllen und steril filtrieren			
Aliquote bei -20°C lagern			
Bradford-Lösung			
20ml	Rotiquant		
80ml	ddH ₂ O		
Lösung mit Papierfilter filtern bei 4°C eine Woche stabil			
BSA-Stammlösung (200mg/ml)			
2g	BSA		
in 10ml ddH ₂ O lösen			
Aliquote bei -20°C lagern			
BSA-Lösung Standardkurve (1mg/ml)			
5µl	BSA-Stammlösung		
995µl	Lysepuffer		
bei -20°C lagern			
Trenngelpuffer			
1,5M	45,41g	Tris	
in 100ml ddH ₂ O lösen			
pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen mit ddH ₂ O auf 250ml auffüllen bei 4°C lagern			
Sammelgelpuffer			
1M	30,28g	Tris	
in 100ml ddH ₂ O lösen			
pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen mit ddH ₂ O auf 250ml auffüllen bei 4°C lagern			
10% APS			
1g	APS		
in 10ml ddH ₂ O lösen			
Aliquote bei -20°C lagern			
10% SDS			
10g	SDS		
in 100ml ddH ₂ O lösen bei RT lagern			
Trenngel für 2 Gele 1,5mm breit			
6,7ml	ddH ₂ O		
5,2ml	Trenngelpuffer		
208µl	10% SDS		

8ml Rotiphorese 30 Acrylamidlösung
kurz mit Magnetrührer rühren
200µl 10% APS
20µl TEMED
mischen und sofort in die Glasform
pipettieren
mit 2ml ddH₂O bedecken
30-60min polymerisieren lassen

Sammelgel für 2 Gele 1,5mm breit

6,1ml ddH₂O
2,6ml Sammelgelpuffer
104µl 10% SDS
1,3ml Rotiphorese 30 Acrylamidlösung
kurz mit Magnetrührer rühren
100µl 10% APS
20µl TEMED
mischen und sofort in die Glasform
pipettieren
Taschenkamm einsetzen
10-40min polymerisieren lassen

5x Probenpuffer Gelelektrophorese

312,5mM 31,25µl Sammelgelpuffer
25% 2,5ml Glyzerin
7,5% 750mg SDS
5% 0,5ml β-ME
0,1% 10mg BPB
mit ddH₂O auf 10ml auffüllen
Aliquote bei -20°C lagern

Laufpuffer Gelelektrophorese

100ml Rotiphorese 10x SDS Page
900ml ddH₂O
bei RT lagern

Transferpuffer Western Blot

5,8g Tris
2,9g Glycin
0,37g SDS

200ml Methanol
mit ddH₂O auf 1l auffüllen
bei 4°C lagern

10x TBS

24g Tris
88g NaCl
in 900ml ddH₂O lösen
pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 7,6
einstellen
mit ddH₂O auf 1l auffüllen und steril
filtrieren
bei RT lagern

1x TBS

100ml 10X TBS
900ml ddH₂O
bei RT lagern

1x TBS + 0,3% Tween 20 (TBST)

997ml 1x TBS
3ml Tween 20
bei RT lagern

Blocking für Membranen

5g Magermilchpulver
600µl Tween 20
mit 1x TBS auf 100ml auffüllen
keine Lagerung möglich, immer frisch
herstellen

Antikörperverdünnung Western Blot für Cell Signaling Antikörper

5% 0,5g BSA
0,1% 10µl Tween 20
mit 1x TBS auf 10ml auffüllen

Antikörperverdünnung Western Blot für restliche Antikörper

5%	500µl	NGS	
	9,5ml	TBST	

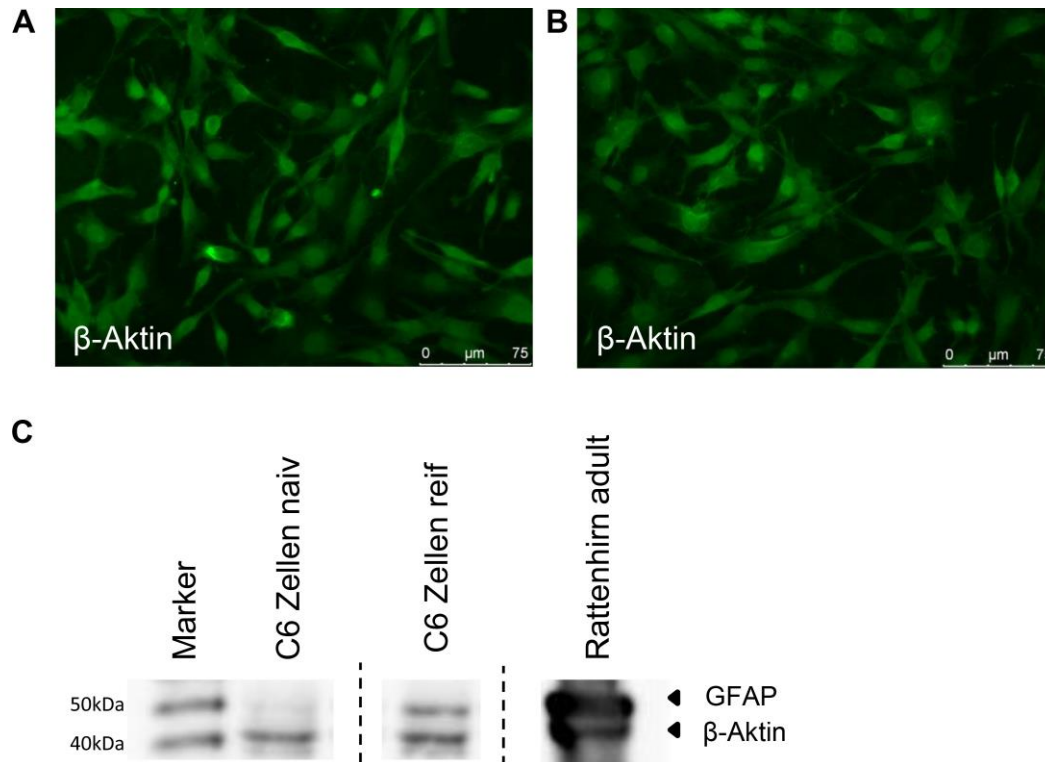
Stripping Puffer			
15g	Glycin		
1g	SDS		
10ml	Tween 20		
in 800ml ddH ₂ O lösen			
pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 2,2			

einstellen			
mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen und steril			
filtrieren			
bei 4°C lagern			

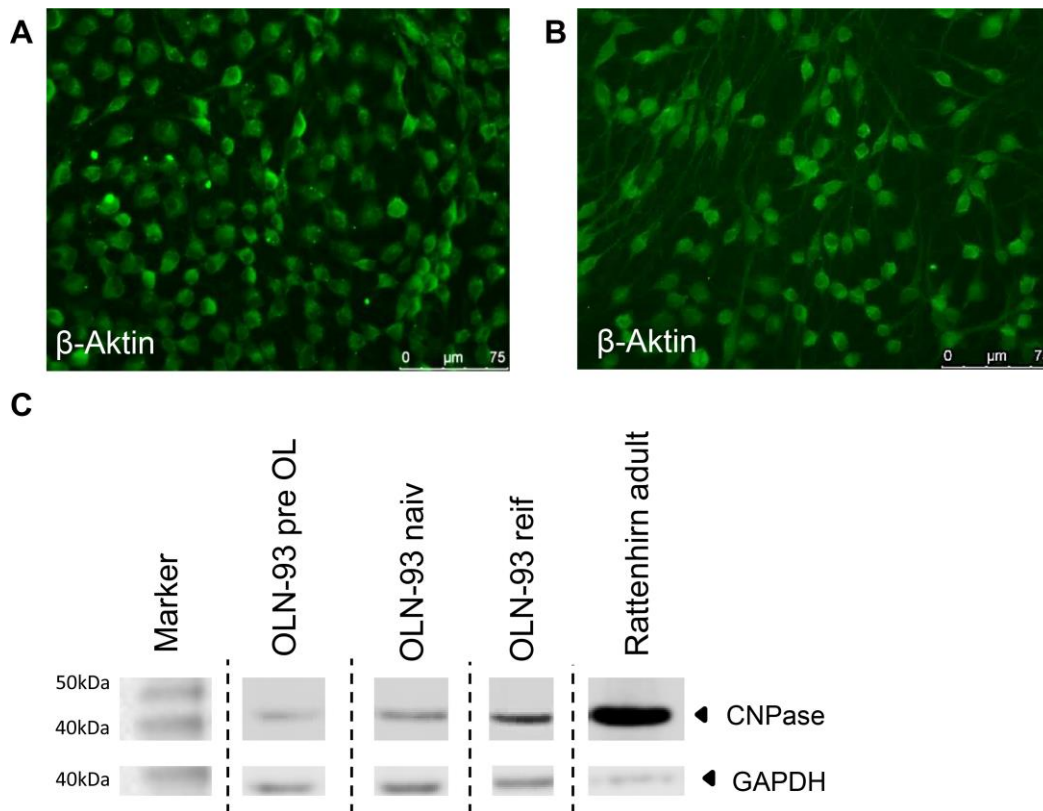
1x TE-Puffer			
10µl	100x TE-Puffer		
990µl	ddH ₂ O		
bei RT lagern			

V.I. Ergänzende Abbildungen

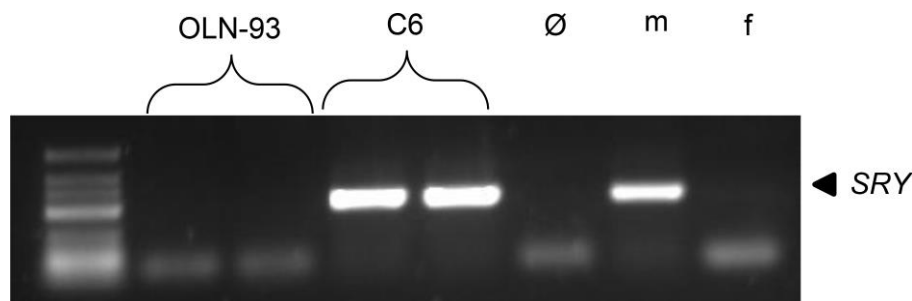
Ergänzende Abbildung 1: Induktion der Differenzierung in C6 Zellen



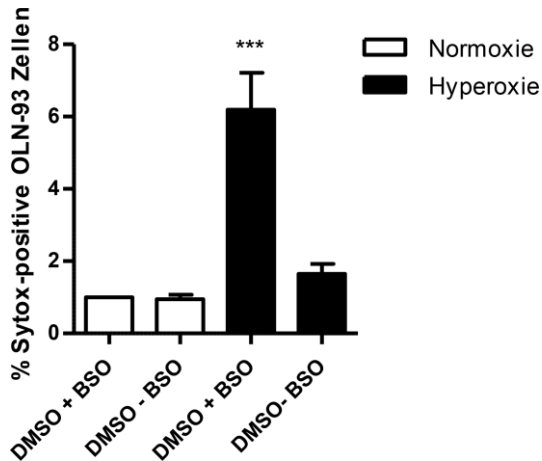
Charakterisierung der C6 Zellen. C6 Zellen wurden 48h mit IL-6 behandelt, um die Differenzierung der C6 Zellen zu induzieren. Die Immunfluoreszenzfärbung von β -Aktin zeigte keine morphologischen Veränderungen der Zellen zwischen (A) naiven (unbehandelten) Zellen und (B) den differenzierten Zellen. (C) Western Blot Analyse der Menge an exprimierten GFAP in naiven Zellen, durch IL-6 gereiften Astrozyten und adulten Rattenhirnlysate als positiv-Kontrolle.

Ergänzende Abbildung 2: Induktion verschiedener Reifegrade in OLN-93 Zellen

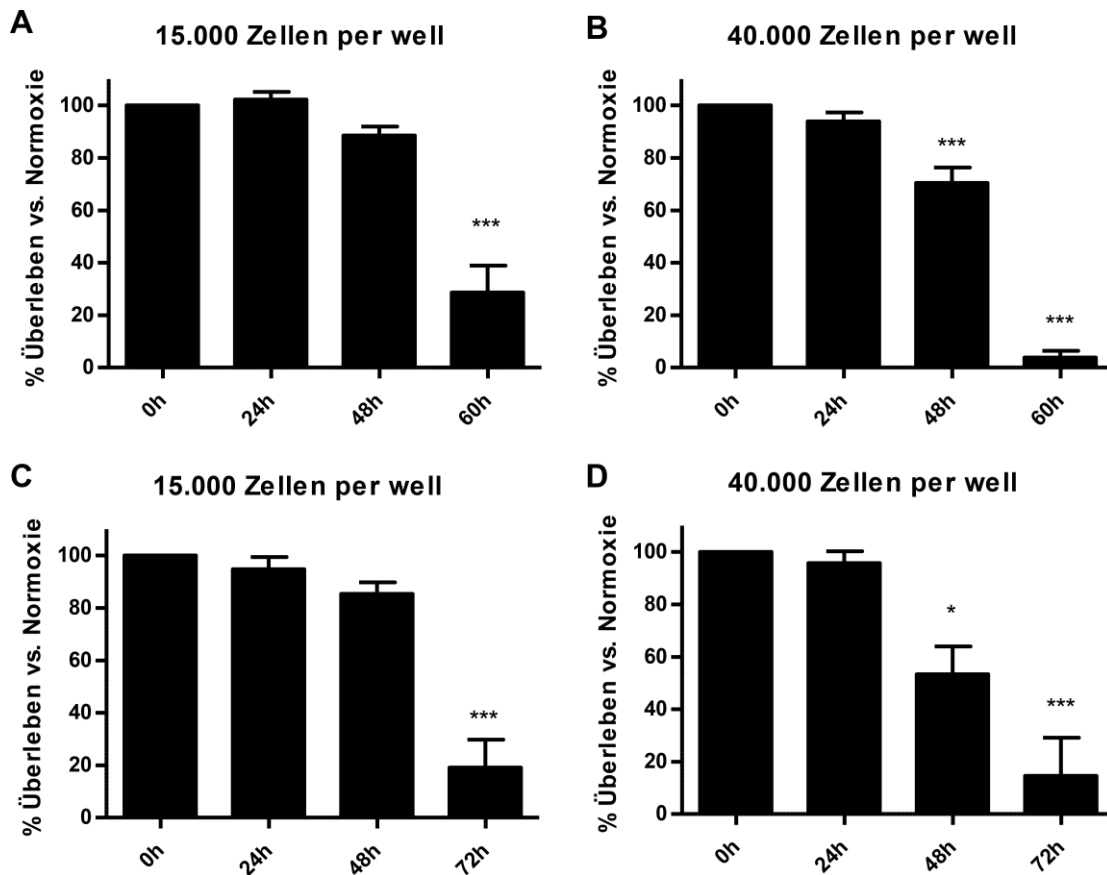
Charakterisierung der OLN-93 Zellen. Um die Eigenschaften zu untersuchen, wurden die Zellen durch eine 6-tägige Behandlung (A) mit PDGF und bFGF in pre-OLs induziert. Die Immunfluoreszenzfärbung von β -Aktin zeigt einen unreiferen Phänotyp der Zellen mit bipolarer Morphologie. (B) Durch die Behandlung mit CNTF, T_3 und Forskolin wurde die Differenzierung in reife OLs induziert. Die Immunfluoreszenzfärbung von β -Aktin zeigt einen unreiferen Phänotyp der Zellen mit bipolarer Morphologie. (C) Western Blot Analyse der Menge an exprimierter CNPase in pre-OLs, naiven und gereiften OLN-93 Zellen, sowie adulten Rattenhirnlysate als positiv-Kontrolle

Ergänzende Abbildung 3: Geschlechtsbestimmung der OLN-93 Zellen

Gelelektrophorese der SRY PCR-Produkte für die Geschlechtsbestimmung. Abkürzungen: Wasserkontrolle (\emptyset), adulte weibliche Ratte/negativ-Kontrolle (f) und adulte männliche Ratte/positiv-Kontrolle (m). OLN-93 Zellen zeigen keine Amplifikation des für männliche Ratten spezifischen Gens, wobei C6 Zellen als männlich bestätigt werden konnten durch die Amplifikation von SRY.

Ergänzende Abbildung 4: Einfluss von Hyperoxie und BSO auf OLN-93 Zellen

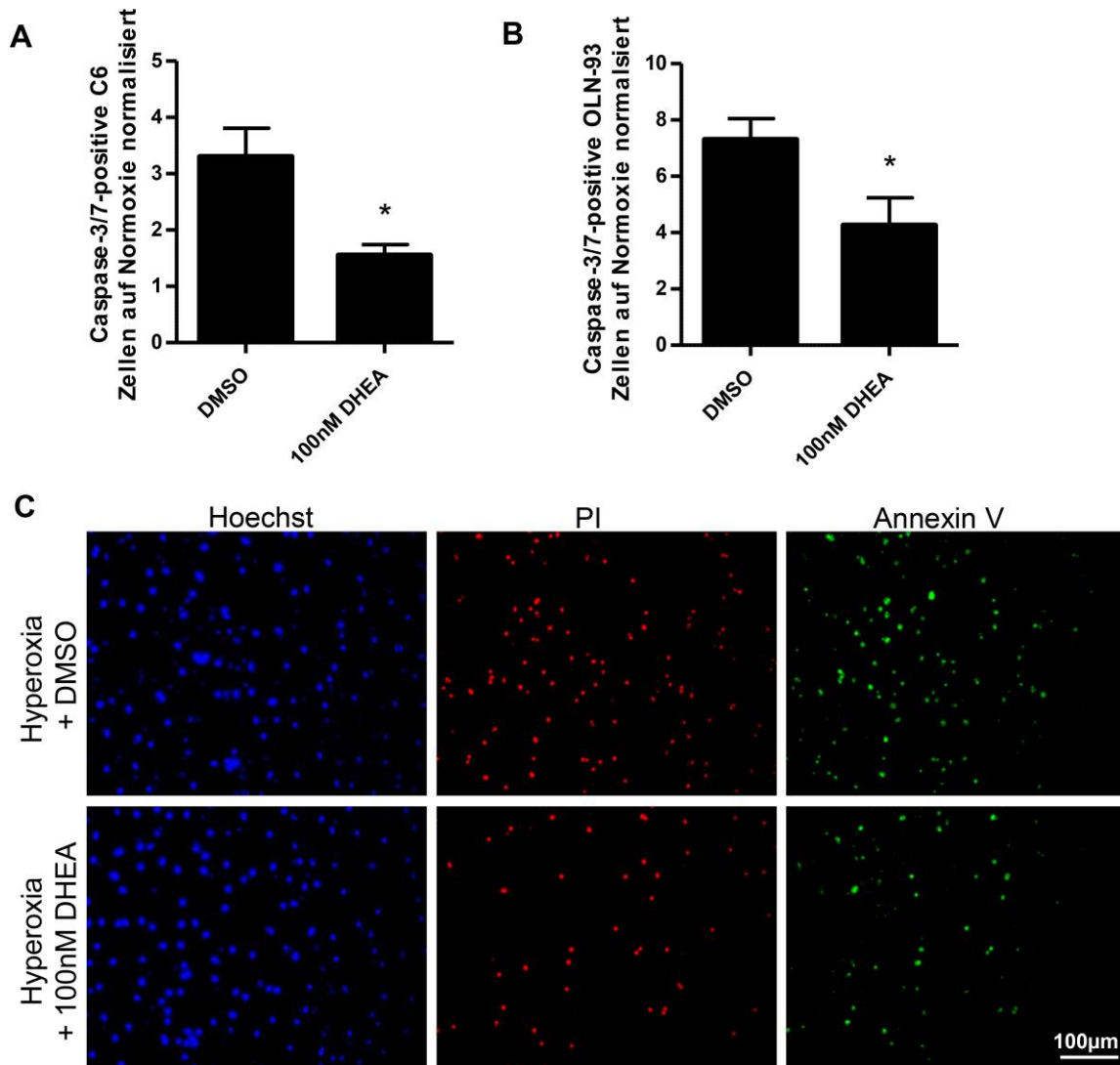
FACS-Analyse des Zelltodmarkers Sytox bei der Behandlung von OLN-93 Zellen mit Hyperoxie, Buthionine-sulfoximin (BSO) oder beidem. Signifikante Unterschiede zu DMSO mit BSO-behandelten Zellen unter Normoxie sind dargestellt als *** $p < 0.0001$. Weiße Balken repräsentieren Normoxie, schwarze Balken Hyperoxie.

Ergänzende Abbildung 5: Einfluss von Dauer der Schädigung und Zelldichte auf das Überleben

Die Viabilität von C6 Zellen bei einer Zelldichte (A) von 15.000 Zellen/*well* und (B) 40.000 Zellen/*well* wurde zu verschiedenen Zeitpunkten unter Hyperoxie mittels MTT-Assays gemessen. Die

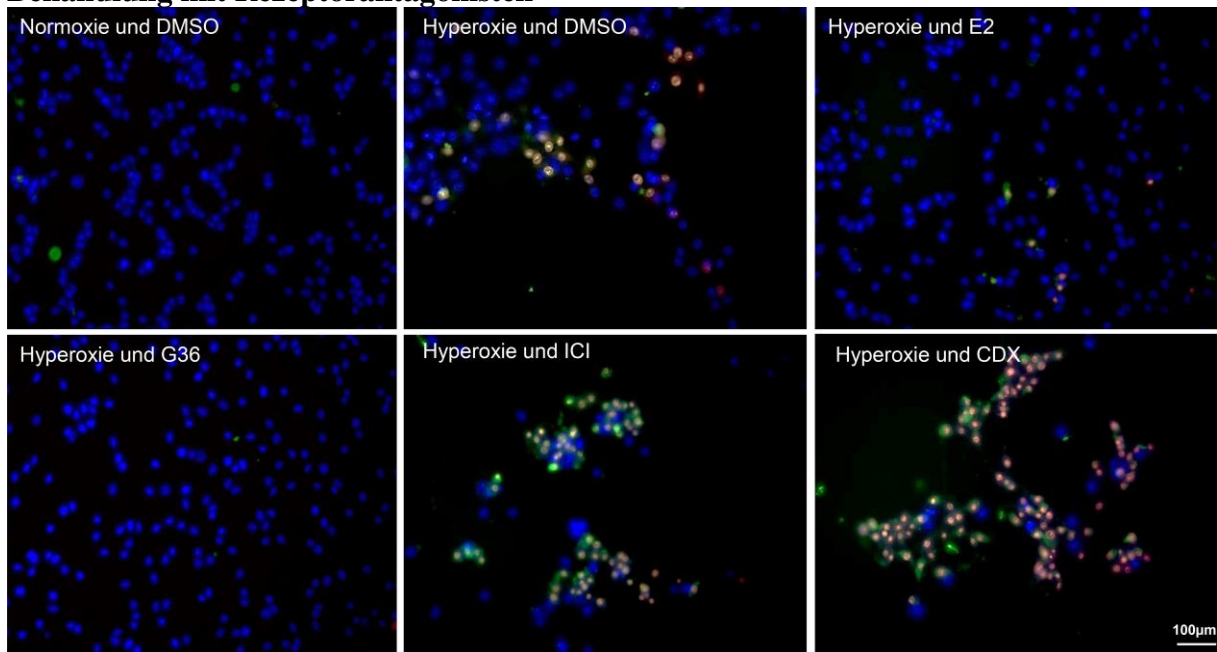
Viabilität von OLN-93 Zellen bei einer Zelldichte (C) von 15.000 Zellen/*well* und (D) 40.000 Zellen/*well* wurde ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten unter Hyperoxie mittels MTT-Assays gemessen. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen unter Normoxie an den entsprechenden Zeitpunkten sind dargestellt als * $p < 0.05$ und *** $p < 0.0001$.

Ergänzende Abbildung 6: DHEA-vermittelte Reduktion von Apoptose



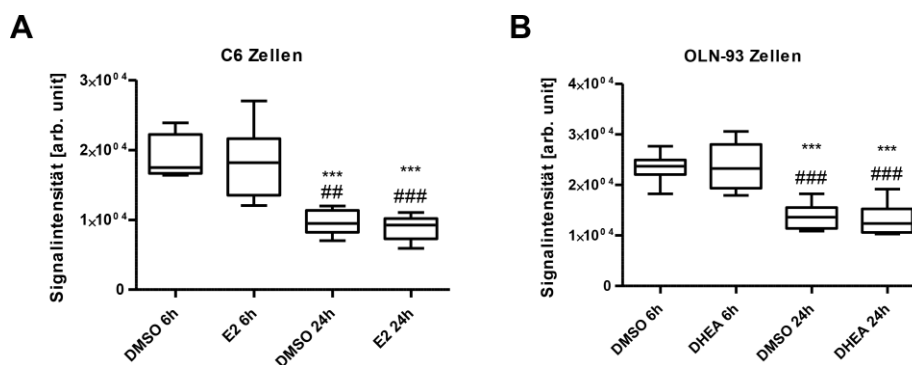
(A) Mittels FACS-Analyse wurde die Caspase-3/7-Aktivierung von DHEA- und DMSO-vorbehandelten C6 und (B) OLN-93 Zellen nach 48h Hyperoxie untersucht. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (DMSO) sind dargestellt als* $p < 0.05$. Schwarze Balken repräsentieren Hyperoxie. (C) PDGFR α^+ Primärzellen wurden 12h mit 100nM DHEA oder DMSO vorbehandelt und dann für 12h der Hyperoxie ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst, Propidiumiodid (PI) und Annexin V versetzt, um vitale, tote und apoptotische Zellen anzufärben. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

Ergänzende Abbildung 7: Repräsentative Beispielbilder für OLN-93 Zellen unter Behandlung mit Rezeptorantagonisten



Repräsentative Beispielbilder für OLN-93 Zellen unter Behandlung mit den verschiedenen Rezeptorantagonisten. Die OLN-93 Zellen wurden mit Hoechst, Propidiumiodid und Annexin V versetzt, um vitale, tote und apoptotische Zellen anzufärben. Während die Zellen durch die Behandlung mit G36 unter Hyperoxie genauso vital aussehen wie unbehandelten Zellen unter Normoxie, so induzieren ICI und CDX unter Hyperoxie massiven Zelltod. Das Ausmaß an Zelltod ist dabei größer als in den allein mit Hyperoxie behandelten Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

Ergänzende Abbildung 8: Darstellung von Signalintensitäten im PathScan am Beispiel von E2 in C6 Zellen und DHEA in OLN-93 Zellen



Darstellung von Signalintensitäten im PathScan am Beispiel von E2 in C6 Zellen und DHEA in OLN-93 Zellen. Nach 2h Vorbehandlung mit DMSO, E2, DHEA oder E2 mit DHEA (Kombinationsbehandlung), wurden die Zellen für 6h und 24h der Hyperoxie ausgesetzt. Als Beispiel für die mittleren Signalintensitäten sind (A) DMSO- und E2-behandelten C6 Zellen, sowie (B) DMSO- und DHEA-behandelte OLN-93 Zellen dargestellt. Signifikante Unterschiede zu DMSO-behandelten Zellen nach 6h Hyperoxie sind dargestellt als *** $p < 0.0001$; signifikante Unterschiede zu den mit den Steroidhormon-behandelten Zellen nach 6h Hyperoxie sind dargestellt als ## $p < 0.001$ und ### $p < 0.0001$.