

**Die Bedeutung zytoprotektiver Enzyme für den Schutz
insulinproduzierender Zellen gegenüber einer Schädigung
durch Sauerstoffradikale, NO und Zytokine**

Vom Fachbereich **Chemie** der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Stephan Lortz

geboren am **30.07.1969** in **Gehrden**

Referent: Prof. Dr. med. S. Lenzen, Medizinische Hochschule Hannover
Koreferent: PD. Dr. rer. nat. W. Müller, Medizinische Hochschule Hannover
Tag der Promotion: 09.02.1999
Datum der Publikation: 29.04.1999

Für Bettina

Zusammenfassung

Freie Sauerstoffradikale sind an der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt. Auch die Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen des Pankreas während des zum Typ I Diabetes führenden Autoimmunprozesses durch Zytokinmediatoren, Makrophagen und zelltoxische Lymphozyten ist ein Beispiel dafür. Die Zerstörung der pankreatischen B-Zellen ist dabei die Folge eines labilen Gleichgewichts aus der Schädigungsdosis der freien Radikale und den zellulären Abwehrmechanismen. Das Expressionsniveau der zytoprotektiven Enzyme, insbesondere der Katalase und Glutathionperoxidase, ist in B-Zellen des Pankreas sehr niedrig, so daß einer der effektivsten Schutzmechanismen gegenüber freien Sauerstoffradikalen in insulinproduzierenden Zellen nur sehr gering ausgebildet ist.

Durch die stabile Transfektion insulinproduzierender RINm5F-Gewebekulturzellen konnte die Expression der Katalase, der Glutathionperoxidase, der zytosolischen Cu/ZnSOD und der mitochondrialen MnSOD auf das Niveau der besonders zytoprotektiv geschützten Leber erhöht werden. Zusätzlich wurde durch Anwendung der *antisense* Technik die Expressionsstärke der MnSOD gesenkt. Gegenüber den durch H₂O₂, Hypoxanthin/Xanthinoxidase und Menadion generierten reaktiven Sauerstoffspezies konnte in erster Linie durch die Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase eine erhöhte Resistenz erreicht werden. In Inkubationsversuchen mit den NO generierenden Substanzen SIN-1, Natriumnitroprussid, SNAP, DETA/NO und SPER/NO konnte insbesondere bei den ebenfalls Sauerstoffradikale erzeugenden Substanzen SIN-1, SNAP und Natriumnitroprussid ein Zellschutz durch die Überexpression der zytoprotektiven Enzyme gezeigt werden. Gegenüber den durch die reinen NO-Generatoren DETA/NO und SPER/NO vermittelten Zellschädigungen konnten zytoprotektive Enzyme nicht schützen. In Koinkubationen von H₂O₂ oder Hypoxanthin/Xanthinoxidase mit SIN-1 oder SNAP zeigten sich überadditive Schädigungen durch den Synergismus der beiden in den jeweils benutzten Konzentrationen allein nur mäßig toxischen Substanzen. Die Überexpression zytoprotektiver Enzyme konnte somit die aus Reaktionen von NO und Sauerstoffradikalen hervorgehenden stark toxischen Reaktionsprodukte verhindern und so die Schädigung der Zelle reduzieren oder sogar vollkommen verhindern.

Expositionen von transfizierten oder nicht transfizierten RINm5F-Zellen mit IL-1 β induzierten nur geringe Abnahmen der Vitalität, die durch die Überexpression nicht signifikant verhindert werden konnten. Unter Verwendung einer Kombination der B-zelltoxischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ wurde die toxische Wirkung auf RINm5F-Zellen verstärkt. Die Überexpression von Katalase, Glutathionperoxidase und Cu/ZnSOD schützte vor der Zytokin-vermittelten Toxizität. Die für die Induktion der iNOS wichtige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die iNOS-Expression und die NO-Produktion wurden durch Überexpression zytoprotektiver Enzyme nicht beeinflusst. Der Schutzmechanismus zytoprotektiver Enzyme gegenüber der toxischen Wirkung des verwendeten Zytokingemisches beruht somit weder auf einer Unterdrückung der zur iNOS-Aktivierung führenden Signalkaskade noch auf der Unterdrückung der NO-Produktion. Vielmehr ist die Verringerung der durch NO und dessen reaktiven Folgeprodukten verursachten Radikalschäden oder eine verminderte Aktivierung zusätzlich schädigender Signalwege zu postulieren.

Die Modulation der MnSOD-Expressionsstärke durch Überexpression oder Suppression bewirkte nur eine geringe Veränderung der Empfindlichkeit der jeweiligen Zellen gegenüber den getesteten Noxen. Die Überexpression der MnSOD vermittelte den RINm5F-Zellen sogar eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem benutzten Zytokingemisch. Die Expression der MnSOD in RINm5F-Zellen ist im Gegensatz zu den zytosolischen Enzymen, insbesondere der Katalase und Glutathionperoxidase, bereits sehr hoch, und durch eine weitere Expressionserhöhung wird das Ungleichgewicht zwischen den Superoxid- und Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen sogar noch verstärkt. Somit führt eine weitere Erhöhung der MnSOD-Expression im Gegensatz zu zytoplasmatischen zytoprotektiven Enzymen nicht zu einem verbesserten antioxidativen Schutz.

Die Verbesserung des antioxidativen Abwehrstatus von insulinproduzierenden Zellen mit molekularbiologischen Methoden durch Überexpression von zytoprotektiven Enzymen in einem geeigneten optimalen Expressionsmuster stellt somit eine therapeutische Perspektive dar, um die Zerstörung der B-Zellen im Krankheitsverlauf des Autoimmundiabetes sowie eine neuerliche Zytokin-vermittelte Zerstörung nach Transplantation insulinproduzierender Zellen zu verhindern.

Schlüsselwörter: Diabetes mellitus, zytoprotektive Enzyme, Gentherapie

Abstract

Free oxygen radicals are involved in the pathogenesis of many diseases, including the destruction of insulin-producing pancreatic β -cells during the initial autoimmune attack leading to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). β -cell damage is mediated by cytokines, macrophages, and cytotoxic lymphocytes. The weak balance between the extent of damaging free radicals and the defence mechanisms determines the fate of pancreatic β -cells during the autoimmune process. Pancreatic β -cells show a very low expression level of cytoprotective enzymes in particular of the hydrogen peroxide inactivating enzymes catalase and glutathione peroxidase. Thus β -cells lack one of the most effective enzymatic mechanisms for the inactivation of free oxygen radicals.

Through stable transfection of insulin-producing RINm5F insulinoma cells the enzyme activities of catalase, glutathione peroxidase, cytosolic Cu/ZnSOD and mitochondrial MnSOD could be increased to levels comparable to those observed in liver. Additionally the expression level of MnSOD was reduced by an *antisense* technique. The bioengineered RINm5F cells were exposed to various chemical generators of free oxygen radicals and nitric oxide (NO) as well as to cytokines. Overexpression of the H_2O_2 -inactivating enzymes catalase and glutathione peroxidase resulted in an increased resistance against free oxygen radicals generated by H_2O_2 , hypoxanthine/xanthine oxidase and menadione whereas overexpression of Cu/ZnSOD was not effective. Overexpression of antioxidant enzymes provided significant protection against the toxicity of the NO and free oxygen radical generating compounds SNAP, sodium nitroprusside and SIN-1 with an individual specificity related to their chemical characteristics, but was without effect upon the toxicity of the pure NO donors DETA/NO and SPER/NO. Co-incubation of cells with NO donors and hydrogen peroxide or hypoxanthine and xanthine oxidase showed an overadditive synergism of toxicity, providing evidence for synergism between NO and reactive oxygen species, as has also been observed after exposure of beta cells to cytokines. The component of the toxicity that is mediated by oxygen radicals can be suppressed effectively through overexpression of CAT, GPx and/or Cu/ZnSOD.

After exposure of insulin-producing RINm5F cells to the cytokine IL-1 β alone or to a combination of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ a time- and concentration-dependent decrease of viability was observed by the MTT assay. Overexpression of CAT, GPx or Cu/ZnSOD significantly protected against toxicity of the cytokine mix but not against IL-1 β alone. Neither the activation of the transcription factor NF κ B, which is regarded as a prerequisite for the induction of iNOS nor the expression level of the iNOS protein and the production of NO were prevented through overexpression of cytoprotective enzymes. Thus protection of CAT, GPx and Cu/ZnSOD was conferred by the inactivation of ROS which were preferentially generated in the signal cascades of the cytokine mix. The modulation of the MnSOD enzyme activities through overexpression or suppression of the gene did not improve the resistance of RINm5F cells against chemical donors of NO and free oxygen radicals. On the contrary overexpression of MnSOD resulted in a higher susceptibility of RINm5F cells against the cytokine-induced toxicity.

In conclusion the overexpression of the cytoprotective enzymes catalase, glutathione peroxidase and Cu/ZnSOD proved to be a feasible strategy to protect insulin-producing cells against radical- and cytokine-mediated cytotoxicity. Increasing the antioxidative defence status of insulin-producing cells by molecular biology techniques may pave the way to gene therapy of diabetes mellitus through prevention of β -cell destruction during the initial phase of autoimmune attack and after transplantation of insulin-producing surrogate cells.

Keywords: diabetes mellitus, cytoprotective enzymes, gene therapy

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits veröffentlicht:

Lortz, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1997). Die Überexpression von H₂O₂-inaktivierenden Enzymen in RINm5F-Zellen verbessert die Abwehr gegenüber freien Sauerstoffradikalen. *Diabetes und Stoffwechsel* **6**: Suppl 1, 45.

Lortz, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Implications from studies of bioengineered RINm5F cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105**: A48.

Lenzen, S., Lortz, S. & Tiedge, M. (1997). Effects of overexpression of cytoprotective enzymes upon antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Biol Chem* **378**: S81.

Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* **46**: 1733-1742.

Lenzen, S., Lortz, S. & Tiedge, M. (1998). Effects of overexpression of cytoprotective enzymes upon antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **357**: R136.

Lortz, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1998). Verminderte NO-Toxizität von gentechnisch veränderten insulinproduzierenden RINm5F-Zellen durch Überexpression zytoprotektiver Enzyme. *Diabetes und Stoffwechsel* **7**: Suppl 1, 42.

Lortz, S., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1998). Protection of RINm5F cells against NO toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetologia* **41**: Suppl 1, A159.

Tiedge, M., Lortz, S., Munday, S. & Lenzen, S. (1998). Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* **47**: 1578-1585.

Tiedge, M., Lortz, S., Munday, S. & Lenzen, S. (1999). Protection against NO-induced toxicity by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia: Zur Publikation akzeptiert*.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies	1
1.2	Schutzsubstanzen und -systeme gegen reaktive Sauerstoffspezies	3
1.2.1	Chemische Antioxidantien	3
1.2.2	Zytoprotektive Enzymsysteme	4
1.2.2.1	Superoxiddismutasen	5
1.2.2.2	Glutathionperoxidasen	6
1.2.2.3	Katalase	7
1.3	NO und reaktive Stickstoffverbindungen.....	8
1.3.1	Synthese von NO in Säugetierzellen	8
1.3.2	Reaktivität von NO und reaktiven Stickstoffverbindungen	9
1.3.3	Schutzmechanismen gegen NO und reaktive Stickstoffverbindungen	11
1.4	Pathophysiologie von reaktiven Sauerstoffspezies und NO	11
1.4.1	Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies	11
1.4.2	Wirkung von NO und reaktiven Stickstoffverbindungen	13
1.4.3	Diabetes mellitus und der Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies, NO und Zytokinen	13
1.5	Fragestellung.....	17
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.2	Kultivierung der RINm5F-Zellen	23
2.2.1	Zellpassagierung	23
2.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen RINm5F-Zellen	24
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer	25
2.3	Transformation von <i>E. coli</i>-Bakterien mit Nukleinsäuren.....	25
2.3.1	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	25
2.3.2	Elektroporation.....	26
2.4	Subklonierung der cDNA-Sequenzen in eukaryotische Expressionsvektoren	27
2.4.1	Ausgangsvektoren mit den cDNA-Sequenzen der unterschiedlichen zytoprotektiven Enzyme	29
2.4.2	Restriktionsverdau der Ausgangsvektoren.....	29
2.4.3	Linearisierung und Dephosphorylierung der Expressionsvektoren	30
2.4.4	Plasmid-Isolierung (<i>Mini-Prep</i>)	31
2.4.5	Sequenzanalyse der Plasmidkonstrukte	33
2.4.6	Plasmid-Isolierung (<i>Maxi-Prep</i>).....	35
2.4.7	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.5	Transfektion von RINm5F-Zellen.....	36
2.5.1	Linearisierung der Expressionsvektoren.....	36
2.5.2	Liposomale Transfektion von RINm5F-Zellen	37
2.5.3	Selektion einzelner Zellklone	38
2.6	<i>Northern-Blot</i>-Analyse	38
2.6.1	RNA-Isolierung	39
2.6.2	Gelelektrophorese zur Auftrennung der RNA	39
2.6.3	Herstellung <i>DIG</i> markierter <i>antisense</i> RNA-Sequenzen	40
2.6.3.1	Subklonierung in den <i>pBluescript SK+</i> -Vektor	42
2.6.3.2	Plasmid-Linearisierung.....	43
2.6.3.3	<i>In vitro</i> RNA-Transkription	43
2.6.4	<i>Northern-Blot</i> -Transfer	44
2.6.5	<i>Northern-Blot</i> -Hybridisierung	45

2.6.5.1	Prähybridisierung	45
2.6.5.2	Hybridisierung.....	46
2.6.5.3	Waschschritte	46
2.6.5.4	Detektion.....	46
2.7	Western-Blot-Analyse.....	48
2.7.1	Herstellung von Gewebeextrakten.....	48
2.7.2	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels BCA-Methode	48
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.7.4	Western-Blot-Transfer	50
2.7.5	Western-Blot-Detektion	51
2.8	Enzymaktivitätsmessungen	52
2.8.1	Aufbereitung der Gewebe für die Aktivitätsmessung der zytoprotektiven Enzyme.....	52
2.8.2	Messung der Superoxiddismutaseaktivitäten	52
2.8.3	Messung der Glutathionperoxidaseaktivität.....	54
2.8.4	Messung der Katalaseaktivität	55
2.9	Inkubationsversuche mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren	56
2.9.1	Inkubationsversuche mit Sauerstoffradikal-Generatoren.....	56
2.9.2	Inkubationsversuche mit NO-Generatoren	57
2.9.3	Exogener Schutz zytoprotektiver Enzyme gegenüber Sauerstoffradikal- oder NO-Generatoren.....	58
2.9.4	Koinkubation von Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren	58
2.10	MTT-Vitalitätstest	59
2.11	Inkubationsversuche mit Zytokinen.....	60
2.11.1	Zytotoxizitätstest nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen.....	60
2.11.2	Western-Blot-Analysen der induzierbaren NO-Synthase nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen.....	60
2.11.3	Bestimmung des akkumulierten Nitrits nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen	61
2.11.4	Messung der Zellproliferationsrate nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen.....	61
2.11.5	Kernfärbung zur Unterscheidung von vitalen, nekrotischen und apoptotischen RINm5F-Zellen nach Inkubation mit Zytokinen.....	62
2.12	Analyse von DNA-Protein-Wechselwirkungen	62
2.13	Statistische Auswertung.....	64
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Charakterisierung zytoprotektiver Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen	65
3.1.1	Northern-Blot-Analysen der zytoprotektiven Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen	65
3.1.1.1	Northern-Blot-Analysen der Überexpression der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase in RINm5F-Zellen.....	66
3.1.1.2	Northern-Blot-Analysen der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD und MnSOD in transfizierten RINm5F-Zellen.....	68
3.1.2	Western-Blot-Analysen der Expression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen.....	71
3.1.2.1	Western-Blot-Analysen der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase in transfizierten RINm5F-Zellen.....	71
3.1.2.2	Western-Blot-Analysen der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD und MnSOD in transfizierten RINm5F-Zellen.....	73
3.1.3	Enzymaktivitätsmessungen zytoprotektiver Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen	76
3.2	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren	79
3.2.1	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen Sauerstoffradikal-Generatoren.....	79
3.2.1.1	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Wasserstoffperoxid.....	79
3.2.1.2	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Hypoxanthin/Xanthinoxidase	82
3.2.1.3	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Menadion.....	84

3.2.1.4	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit N-Butylalloxan.....	86
3.2.2	Inkubation der transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen NO-Generatoren	89
3.2.2.1	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SIN-1	89
3.2.2.2	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Natriumnitroprussid	92
3.2.2.3	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SNAP	94
3.2.2.4	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit DETA/NO.....	96
3.2.2.5	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SPER/NO	98
3.3	Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen	100
3.3.1	Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber Sauerstoffradikal-Generatoren.....	100
3.3.2	Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber NO-Generatoren.....	101
3.4	Kombinierte Inkubation von nicht transfizierten RINm5F-Zellen mit Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren	102
3.5	Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Zytokinen	104
3.5.1	MTT-Vitalitätstest nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Interleukin-1 β	104
3.5.2	MTT-Vitalitätstest nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ	106
3.5.3	Proliferationsuntersuchungen nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ	108
3.5.4	Fluoreszenz-Differentialfärbung von RINm5F-Zellen nach Inkubation mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ	110
3.5.5	Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Inkubation mit Interleukin-1 β oder Wasserstoffperoxid	113
3.5.6	<i>Western-Blot</i> -Analysen der induzierbaren NO-Synthase nach Interleukin-1 β Inkubation	116
3.5.7	Bestimmung akkumulierten Nitrits nach 72 h Inkubation mit Zytokinen.....	118
4	Diskussion.....	120
4.1	Enzymatische Abwehrmechanismen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies in insulinproduzierenden Zellen	120
4.2	Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit Sauerstoffradikal-Generatoren	121
4.3	Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit NO-Generatoren.....	125
4.4	Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit Zytokinen.....	130
5	Literaturverzeichnis	135

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikromol
A	Aktivität
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
<i>ANOVA</i>	<i>analysis of variance</i>
AP-1	aktivierendes Protein-1 (Transkriptionsfaktor)
atm	Atmosphärendruck
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin, 4,4'-dicarbonsäure
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CMV	Zytomegalievirus
cNOS	konstitutiv exprimierte NO-Synthase
COX-1	konstitutiv exprimierte Cyclooxygenase (Isoform I)
COX-2	induzierbare Cyclooxygenase (Isoform II)
<i>cpm</i>	<i>counts per minute</i>
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
Cu/ZnSOD	kupfer- und zinkenthaltende Superoxiddismutase
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidintriphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddTTP	2',3'-Dideoxythymidintriphosphat
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DETA/NO	(Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat
DETAPAC	Diethylentriaminpentaessigsäure
dGTP	2'-Desoxyguanintriphosphat
<i>DIG</i>	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreit
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ebselen	2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on
EC ₅₀	halbmaximale Konzentration
EC-Cu/ZnSOD	extrazelluläre kupfer- und zinkenthaltende Superoxiddismutase
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>ELISA</i>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>EMSA</i>	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	fötales Kälberserum
FeSOD	eisenhaltige Superoxiddismutase
FMN	Flavomononukleotid
g	Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GPx	zytosolische Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	4-(-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HX	Hypoxanthin
IDDM	insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KAT	Katalase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MnSOD	manganenthaltende Superoxiddismutase
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid

Abkürzungsverzeichnis

N	Normal
NAC	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	oxidiertes Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
ng	Nanogramm
NIDDM	nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nNOS	neuronaler NO-Synthase
NP-40	Nonylphenyl-polyethylenglykol
OD	optische Dichte
Orange G	8-(Benzolazo), 7-hydroxy, 1,3-naphthalindisulfonsäure
P	Partialdruck
<i>PAGE</i>	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
pg	Pikogramm
PGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
pK _a	negativer Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
pmol	pikomolar
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidinfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

S	Svedberg-Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
<i>sh ble</i>	Zeocin-bindendes Protein
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SOD	Superoxiddismutase
SPER/NO	(Z)-1- {N-[3-Aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]-amino} -diazen-1-ium-1,2-diolat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(-hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurinat 20 %
U	Unit (Einheit)
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen
Vol.	Volumenanteil
Vol.-%	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsanteile bezogen auf das Gesamtvolumen
XO	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Es sind drei Elektronenzustände des Sauerstoffs bekannt. Im Grundzustand befinden sich zwei Außenelektronen mit parallelem Spin in den zwei π^* -Orbitalen. Eine energiereichere Elektronenanordnung des Sauerstoffs findet sich beim Singulett-Sauerstoff, bei dem sich die zwei Außenelektronen mit antiparallelem Spin entweder gemeinsam in einem π^* -Orbital oder einzeln in zwei π^* -Orbitalen befinden.

Die weiteren Redoxstufen des Sauerstoffs werden durch dessen schrittweise Reduktion erreicht, wobei im ersten Reduktionsschritt das reaktive Superoxidradikal und im zweiten Schritt das Peroxid-Ion gebildet wird. Im letzten Schritt entsteht H_2O als Endprodukt der Sauerstoffreduktion. Obwohl Peroxid-Ionen keine Radikale sind, da sich keine ungepaarten Elektronen in ihrer äußeren Schale befinden (Halliwell & Gutteridge 1995; Southorn & Powis 1988), wird zur Vereinfachung im weiteren Verlauf dieser Dissertation Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu den Sauerstoffradikalen gezählt, wohlwissend, daß laut Definition diese Substanz nicht den Radikalen zugeordnet werden kann. Der oftmals synonym verwendete Begriff der reaktiven Sauerstoffspezies beinhaltet das Wasserstoffperoxid und bezieht sich begrifflich auf die Reaktivität der Sauerstoffradikale und der von ihnen abgeleiteten Verbindungen mit anderen Substanzen.

Erhöhte Sauerstoffkonzentrationen haben aufgrund intrazellulärer Enzymhemmungen und der vermehrten Bildung von reaktiven endogenen Sauerstoffspezies eine toxische Wirkung auf Pflanzen, Tiere und Bakterien (Aerobier). Ein Sauerstoffanteil über 50 Vol.-% der Luft verursacht bei Mensch und Ratte zentralnervöse Störungen, die sich in Kramp fzuständen äußern. Wird der menschliche Organismus einem Sauerstoffpartialdruck von höher als 1 atm über einen Zeitraum von mehr als 6 h ausgesetzt, kommt es zu Schäden der Lungenalveolen (Clark & Lambertsen 1971). Eine Auswahl reaktiver Sauerstoffspezies ist in Tab. 1.1 dargestellt.

Singulett-Sauerstoff	$^1\text{O}_2$
Superoxidradikal	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxylradikal	OH^{\cdot}

Tab. 1.1: Reaktive Sauerstoffspezies

Singulett-Sauerstoff, der selbst kein Radikal ist, kann durch die Reaktion von Hypochlorit mit Wasserstoffperoxid gebildet werden. Desweiteren kann Singulett-Sauerstoff durch eine Photosensibilisierungsreaktion entstehen. Hierbei werden Moleküle wie zum Beispiel Riboflavin, FAD, und Bilirubin durch Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau angeregt. Durch den Rückfall in den Grundzustand wird Singulett-Sauerstoff gebildet. Verschiedene Krankheiten wie zum Beispiel die Porphyrrie führen ebenfalls durch den Defekt des Häm-Stoffwechsels zur Bildung von Singulett-Sauerstoff (Halliwell & Gutteridge 1995).

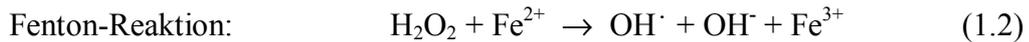
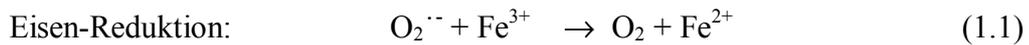
Das **Superoxidradikal** ist nahezu in allen aeroben Zellen präsent. Es wird durch viele intrazelluläre Enzyme, die in Oxidationsreaktionen involviert sind, als intermediärer Metabolit gebildet. Zu den wichtigsten Enzymen gehören Oxidasen (Xanthin-, NADPH-, D-Aminosäure-, Cytochrom-C- und Aldehyd-Oxidase) sowie Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen und Flavin-Dehydrogenasen (Fridovich 1983).

Ein weiterer Bildungsort ist die mitochondriale Atmungskette. Es wird eine univalente Freisetzung des Superoxidradikals durch die NADH-Dehydrogenase im Rahmen des mitochondrialen Elektronentransportes diskutiert (Boveris 1977; Fridovich 1983).

Antioxidationsreaktionen wie von Flavinen, Catecholaminen, reduzierten Häm-Proteinen und Glutathion, Hydrochinonen sowie Ferredoxin stellen ebenfalls eine endogene Quelle für Superoxidradikale dar.

Das Superoxidradikal unterliegt in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) mit einer Rate von $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fridovich 1983).

Das **Hydroxylradikal (OH^\cdot)** stellt das reaktivste Sauerstoffradikal in biologischen Systemen dar. Es kann mit nahezu allen biologischen Molekülen wie Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten im Organismus reagieren (Halliwell & Gutteridge 1995; Southorn & Powis 1988). Endogen entsteht das Hydroxylradikal über die Haber-Weiss-Reaktion (Albano *et al.* 1987) infolge der Eisen-, aber auch Kupfer-katalysierten Reaktion des Superoxidradikals mit Wasserstoffperoxid (Aruoma *et al.* 1991; Sutton & Winterbourn 1989). Die Elektronenübertragung von Fe^{2+} bzw. Cu^{2+} auf H_2O_2 führt über die Fenton-Reaktion ebenfalls zur Bildung des OH^\cdot -Radikals (Gleichung 1.1 – 1.3).



Die Rolle von Eisen für die Toxifizierung von Sauerstoffradikalen ist nicht zu unterschätzen. Der größte Teil des Eisens im Organismus ist in Form von Speicherproteinen (Ferritin) und Transportproteinen (Transferrin) einem unmittelbaren Zugriff für katalytische O₂-Toxifizierungsreaktionen entzogen. Diese sogenannte Sequestrierung des Körpereisens stellt somit ohne die direkte Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies einen wichtigen antioxidativen Mechanismus dar (Halliwell & Gutteridge 1995). Lediglich ein kleiner Pool nicht-protein-gebundenes Eisen im Komplex mit metallbindenden energiereichen Phosphaten und Citrat ist unter physiologischen Bedingungen für die Initiierung der Fenton-Reaktion verfügbar.

In den meisten biologischen Systemen, besonders in den Mitochondrien, wird **Wasserstoffperoxid** durch die Dismutation von Superoxidradikalen gebildet (Gleichung 1.4).



Die Dismutation kann spontan oder durch spezielle Enzyme, die Superoxiddismutasen, erfolgen. Es gibt aber auch Enzyme, die Wasserstoffperoxid ohne Superoxidintermediate bilden, zu denen die Glykolatoxidase, die D-Aminoxidase und die Ureat-Oxidase zählen (Halliwell & Gutteridge 1995).

1.2 Schutzsubstanzen und -systeme gegen reaktive Sauerstoffspezies

Gegen die toxischen Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies haben alle aerob lebenden Organismen zahlreiche Schutzmechanismen entwickelt. Neben chemischen Antioxidantien sorgen insbesondere radikalaktivierende Enzymsysteme für einen effektiven Schutz.

1.2.1 Chemische Antioxidantien

Zu den chemischen Antioxidantien gehören das Vitamin C, das Vitamin E, das Glutathion, das Transferrin, das Albumin, das Coeruloplasmin, die Harnsäure sowie das Hemopexin und das Haptoglobin.

Die Bedeutung des Vitamin C wird kontrovers beurteilt, denn Vitamin C fördert durch die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) die Eisenaufnahme und dient als Kofaktor für verschiedene Enzyme wie z.B. die Prolinhydroxylase. Weiterhin ist Ascorbinsäure an der Kollagensynthese

beteiligt und kann durch direkte Reaktion mit Superoxid- und Hydroxylradikalen zu Semidehydroascorbat reaktive Sauerstoffspezies entgiften. Auf der anderen Seite kann Ascorbinsäure durch die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid hochreaktive zelltoxische Hydroxylradikale erzeugen.

Von den vier bekannten Tocopherolen ist das α -Tocopherol biologisch am bedeutsamsten. Ein Mangel an Vitamin E erzeugt in Ratten Sterilität, Hämolyse und muskuläre Degeneration. Die Bedeutung des Vitamins E liegt im Schutz gegen die Lipidperoxidation. Dieser Schutz wird durch Reaktion mit dem Singulett-Sauerstoff und dem Hydroxylradikal erreicht. Darüber hinaus muß die Beziehung zu Vitamin C erwähnt werden, da Vitamin C in der Lage ist, das α -Tocopherol-Radikal zum α -Tocopherol zu reduzieren. Als weiteres Antioxidant ist das Glutathion von Bedeutung, da es wie Ascorbinsäure α -Tocopherol regeneriert und zusätzlich für die Funktion der Glutathionperoxidase essentiell ist.

Eine indirekte antioxidative Funktion haben Transferrin und Laktotferrin als eisenbindende Substanzen, die auf diese Weise die Fenton-Reaktion verhindern. Darüber hinaus spielt Coeruloplasmin im Eisenmetabolismus eine Rolle, denn es kann durch seine Ferroxidaseaktivität Fe(II) zu Fe(III) oxidieren und somit die eisenkatalysierte Hydroxylradikalbildung verhindern. Genauso wie Coeruloplasmin können Albumin und Harnsäure Cu-Ionen binden und die kupferabhängige Lipidperoxidation und Hydroxylradikalbildung verhindern. Zur Vollständigkeit sind das Hämoglobin-bindende Protein Haptoglobin und das Häm-bindende Protein Hemopexin zu nennen, die sich mit Hämoglobin oder Häm verbinden, so daß das Hämgebundene Eisen nicht via Fenton-Reaktion unter Bildung von Hydroxylradikalen reagieren kann, sondern schnell aus dem Blutkreislauf entfernt wird.

1.2.2 Zytoprotektive Enzymsysteme

Aufgrund ihrer effektiven Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies nehmen die zytoprotektiven Enzyme eine besondere Stellung im antioxidativen Schutzsystem ein.

Der intrazelluläre Abbau reaktiver Sauerstoffspezies beruht vornehmlich auf den dort lokalisierten Enzymen Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase. Von den Superoxiddismutasen existieren die Isoenzyme Cu/ZnSOD, MnSOD und FeSOD. Von der Cu/ZnSOD existiert eine zytosolische Cu/ZnSOD und eine extrazelluläre Cu/ZnSOD-Isoform. Von der Glutathionperoxidase sind eine zytosolische Glutathionperoxidase sowie eine Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase bekannt. Mehreren Arbeitsgruppen ist es gelungen, zytoprotektive Enzyme zu klonieren. So konnten Furuta *et al.* (1986) eine mRNA

für die Rattenleberkatalase von 2495 bp (kodierender Bereich von 84 – 1667 bp) und Quan *et al.* (1986) die entsprechende humane Sequenz (mRNA-Länge 2279 bp, kodierender Bereich von 68 – 1998 bp) bestimmen. Darüber hinaus gelang es die Superoxiddismutasen (Ho & Crapo 1987a; Ho & Crapo 1987b) und die Glutathionperoxidase (Ho *et al.* 1988) der Ratte zu klonieren. Sie zeigten, daß der kodierende Bereich für die MnSOD von 12 – 680 bp und der kodierende Bereich der Cu/ZnSOD von 94 – 558 bp reichte. Die mRNA-Länge der MnSOD betrug 1438 bp, die der Cu/ZnSOD 650 bp. Die von Beck *et al.* (1987) klonierte 829 bp lange mRNA der humanen MnSOD kodiert in dem Bereich der Basenpaare 67 – 735 für das Protein. Für das Wasserstoffperoxid-abbauende Enzym Glutathionperoxidase konnten Ho *et al.* (1988) einen kodierenden Bereich von 352 – 754 bp und eine mRNA-Länge von 800 bp beschreiben.

1.2.2.1 Superoxiddismutasen

Die Superoxiddismutasen (SOD) wurden namentlich erstmals 1969 von McCord & Fridovich beschrieben. Die für Eukaryoten typischen SOD-Typen (Crapo *et al.* 1992; Keller *et al.* 1991; Marklund 1984) sind die mitochondriale manganhaltige Superoxiddismutase (MnSOD), die zytosolische kupferhaltige Superoxiddismutase (Cu/ZnSOD) und die extrazelluläre kupferhaltige Superoxiddismutase (EC-Cu/ZnSOD). Während die MnSOD fast ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist, kann die Cu/ZnSOD in Peroxisomen und im Zytosol nachgewiesen werden.

Die für die Prokaryoten typischen SOD-Typen sind die MnSOD und die eisenabhängige Superoxiddismutase (FeSOD), die ausschließlich in Prokaryoten vorkommt und deshalb für die nachfolgenden Untersuchungen nicht von Bedeutung ist. Im Gegensatz zur eukaryotischen MnSOD, die tetramer aufgebaut ist, besteht die prokaryotische MnSOD aus zwei Untereinheiten. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ungefähr 23 kDa und enthält ein Mn^{3+} pro Untereinheit (Clare *et al.* 1984).

Während die FeSOD im periplasmatischen Raum lokalisiert ist, befindet sich die MnSOD in der mitochondrialen Matrix der Zellen. Zwischen der MnSOD und der FeSOD besteht hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz eine große Homologie, die zwischen MnSOD und Cu/ZnSOD nicht besteht (McCord 1976).

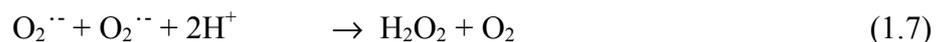
Die zytosolische Cu/ZnSOD ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 32 kDa pro Untereinheit, die je ein Cu^{2+} und ein Zn^{2+} aufweisen. Ein Molekulargewicht von 135 kDa besitzt die tetramere EC-Cu/ZnSOD, die in menschlichem Gewebe gefunden wurde. Die vorherrschende Struktur einer Untereinheit ist ein Zylinder, der aus 8 Peptidketten in einer

antiparallelen β -Struktur gebildet wird. Jede Untereinheit wird durch eine Disulfidbrücke zwischen dem Cys-55 und Cys-144 stabilisiert (Steinman *et al.* 1974). Das Cu/ZnSOD-Enzym ist ungewöhnlich stabil und behält seine Aktivität auch in der Anwesenheit von 9,0 M Harnstoff und 4 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (Forman & Fridovich 1973).

FeSODs wurden zuerst aus *E. coli*-Bakterien isoliert (Yost & Fridovich 1973). Obwohl die FeSOD meistens in Prokaryoten vorkommt, wurde sie auch in drei Pflanzenfamilien nachgewiesen (Salin & Bridges 1981). Bis auf wenige Ausnahmen (*Mycobacterium tuberculosis*) sind alle FeSODs dimer ebenso wie die MnSOD aufgebaut und haben ein Molekulargewicht von ungefähr 23 kDa pro Untereinheit.

Alle Superoxiddismutasen katalysieren die Dismutation des reaktionsfähigen Superoxidradikals, indem sie die Geschwindigkeit der spontanen Dismutation bei physiologischem pH 7,4 um den Faktor 9 erhöhen (Fridovich 1983). In einem zweistufigen Prozeß entsteht dabei Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Auf diese Weise wird der Superoxidgehalt der Zelle kontrolliert und die Konzentration unter 10^{-11} mol/l gehalten (Chance *et al.* 1979; Freeman 1984), so daß die weiterführende Bildung des toxischen Hydroxylradikals über die metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion unterdrückt wird.

SOD-abhängige Dismutation von Superoxidradikalen, modifiziert nach Halliwell & Gutteridge (1995):



Die katalytische Aktivität der Cu/ZnSOD ist auf das Cu^{2+} konzentriert, während das Zn^{2+} eine untergeordnete Rolle spielt und stabilisierende Aufgaben übernimmt (Forman & Fridovich 1973). Als Mechanismus wird eine Ping-Pong-Reaktion vermutet, bei der das Cu^{2+} alternierend reduziert und reoxidiert wird, während die Produkte O_2 und H_2O_2 freigesetzt werden (Gleichung 1.5 – 1.7). Das Enzym reagiert mit einer Rate von ungefähr $2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mit einem Superoxidradikal.

1.2.2.2 Glutathionperoxidasen

Die Glutathionperoxidase wurde 1957 von Mills entdeckt. Es existieren zwei Typen der Glutathionperoxidase, die zytosolische Glutathionperoxidase (Flohe *et al.* 1973; Ursini *et al.* 1982) und die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase, beide enthalten Selen in einem Proteinkomplex. Die zytosolische Glutathionperoxidase ist ein tetrameres Enzym und enthält 4

Atome Selen pro Molekül. Sie besitzt ein Molekulargewicht von 84 kDa und besteht aus 178 Aminosäuren pro Untereinheit. Jede Untereinheit ist aus einem zentralen Kern aufgebaut, der aus zwei parallelen und antiparallelen Strängen besteht, die von 4 α -Helices umgeben sind (Ladenstein *et al.* 1979). Die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase ist ein monomeres selenhaltiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 19,7 kDa.

Die zytosolische Glutathionperoxidase reduziert im Zytosol zelltoxisches H_2O_2 unter Oxidation von Glutathion zu Wasser. Die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase katalysiert die Inaktivierung von Lipidhydroperoxiden in Membranen und Lipoproteinen und schützt auf diese Weise zelluläre Membranen vor oxidativen Schäden (Pushpa Rekha *et al.* 1995).

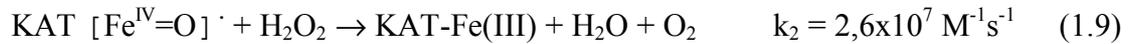
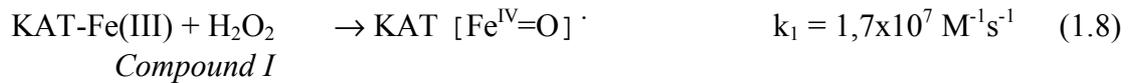
Für die Regenerierung des verbrauchten Glutathions mittels NADPH ist die Glutathion-Reduktase, ein Flavoprotein, verantwortlich. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, das Schlüsselenzym des Pentose-Phosphat-Weges, sorgt für die Bereitstellung der benötigten Reduktionsäquivalente NADPH. Neben H_2O_2 können auch Peroxide von freien Fettsäuren und Steroidhydroperoxide als Substrat in einer hydrophilen Mikroumgebung dienen (Grossmann & Wendel 1983). Durch das große Spektrum zahlreicher Substrate gewinnt das Enzym Glutathionperoxidase eine zentrale Bedeutung bei oxidativem Streß. Die Glutathionperoxidase ist zu 70 % im Zytosol und zu 30 % in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Chance *et al.* 1979). Die Aktivität der Glutathionperoxidase wird durch Selen beeinflusst, das ein essentieller Bestandteil der Glutathionperoxidase ist (Sunde 1990). Ein Selenmangel reduziert *in vivo* und *in vitro* die Glutathionperoxidaseaktivität, was zu Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies führen kann (Leibovitz *et al.* 1990).

Die Glutathionperoxidasen inaktivieren aufgrund ihrer hohen Affinität zu H_2O_2 niedrige Wasserstoffperoxidkonzentrationen und durch die Umsetzung von Lipidhydroperoxiden wird die Entstehung von Membranschäden durch Lipidperoxidasereaktionen verhindert.

1.2.2.3 Katalase

Die Katalase ist in allen aeroben Zellen gegenwärtig; sie ist ein tetrameres Molekül, bei dem jede Untereinheit ein Molekulargewicht von 60 kDa einnimmt und jeweils eine Fe(III) Protoporphyrin-Gruppe im aktiven Zentrum enthält (Ursini *et al.* 1982). Das aktive Zentrum jeder Untereinheit ist durch ein festgebundenes NADPH-Molekül stabilisiert (Diplock 1994). Das Häm-Protein Katalase, das im Organismus meist partikelgebunden in den Peroxisomen vorliegt, reguliert wie die Glutathionperoxidase die intrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration, die zwischen 10^{-9} und 10^{-7} M liegt (Chance *et al.* 1979; Freeman 1984). Das

Enzym Katalase katalysiert die 2-Elektronendisproportionierung von Wasserstoffperoxid nach den folgenden Teilreaktionen (Gleichung 1.8 und 1.9).



Die physiologische Bedeutung der Katalase liegt aufgrund ihrer niedrigen Substrataffinität in der Entgiftung hoher Wasserstoffperoxidkonzentrationen (Freeman 1984).

1.3 NO und reaktive Stickstoffverbindungen

1.3.1 Synthese von NO in Säugetierzellen

In Säugetierzellen katalysieren NO-Synthasen die sequentielle Oxidation von L-Arginin zu NO und Citrullin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH. Aufgrund ihrer Expressionsart werden die NO-Synthase-Isoformen in die zwei Gruppen der konstitutiv exprimierten (cNOS) und induzierbaren (iNOS) NO-Synthasen unterteilt (Griffith & Stuehr 1995). Entsprechend ihrer Expression in zwei verschiedenen Geweben werden die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen in eine neuronale (nNOS oder NOS I) und eine endotheliale (eNOS oder NOS III) Isoform weiter unterschieden. Die Expression der iNOS wurde zuerst für aktivierte Makrophagen beschrieben, mittlerweile ist ihre Expression für mehrere Gewebetypen nachgewiesen worden, u.a. für Hepatozyten, glatte Muskelzellen und Mesangialzellen (Xie & Nathan 1994).

Für pankreatische B-Zellen der Ratte wurde die iNOS von Karlsen *et al.* (1995) kloniert. Die Homologie der Aminosäuresequenz betrug im Vergleich zu den in anderen Geweben der Ratte exprimierten iNOS-Enzymen fast 100 %.

Trotz eines für beide konstitutive Isoformen gleichen Expressionsverhaltens unterscheiden sich die beiden Isoformen in ihrer Struktur erheblich. Während die neuronale NO-Synthase ein 161 kDa Protein ist, das aus einer 10 kb mRNA-Spezies gebildet wird (Bredt *et al.* 1991), beträgt die mRNA-Länge der eNOS nur 4,7 kb und das translatierte Protein weist eine Größe von 133 kDa auf (Lamas *et al.* 1992). Die Homologie beider Enzyme auf Proteinebene beträgt annähernd 60 %. Die induzierbare NO-Synthase ist ein 131 kDa Protein, das aus einer 4,4 kb mRNA gebildet wird (Charles *et al.* 1993). Im Vergleich zu der Gruppe der konstitutiv exprimierten Isoformen beträgt die Homologie der Aminosäuresequenz nur 50 %. In ihrer Struktur ist bei allen drei Isoformen in ihrer C-terminalen Region (sie enthält auch die

Kofaktoren-Bindungsstelle) eine 30 %ige Homologie zu der Cytochrom-P450-Reduktase zu finden. Die in der C-terminalen Region lokalisierte Reduktasedomäne enthält Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH, die N-terminale Oxidasedomäne enthält eine gebundene Häm-Gruppe und eine Bindungsstelle für Tetrahydrobiopterin (Marletta 1993). Die Regulation der Enzymaktivität beider konstitutiven Isoformen erfolgt durch Calcium und Calmodulin. In die Zelle einströmendes Calcium verstärkt die Bindung von Calmodulin an das Protein und erhöht so die Aktivität des schon vorhandenen Proteins. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Calmodulin an die iNOS haben veränderte intrazelluläre Calciumspiegel nur eine sehr geringe Auswirkung auf die Enzymaktivität. Vielmehr wird die durch die iNOS vermittelte NO-Produktion als Antwort auf zahlreiche Entzündungsstimuli auf transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert. Alle drei NOS-Isoformen weisen eine vergleichbare spezifische Aktivität von $1\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ auf (Feelisch & Stamler 1996). Die oft zitierte hohe NO-Syntheserate der iNOS beruht vielmehr auf dem unter induzierenden Bedingungen hohen Expressionsniveau von bis zu 1 % des gesamten Proteingehalts einer Zelle (Nathan 1992).

1.3.2 Reaktivität von NO und reaktiven Stickstoffverbindungen

NO (Stickstoffmonoxid) ist ein ungeladenes Molekül mit einem Stickstoffatom der Oxidationsstufe +2 und einem ungepaarten Elektron auf seiner äußeren Elektronenschale. Somit kann NO als Radikal aufgefaßt werden. Neben seiner sehr guten Diffusionsfähigkeit (aufgrund des unpolaren, ungeladenen Molekülaufbaus ist es auch membrangängig) ist seine in wäßriger Lösung nur schwache Löslichkeit (ca. $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ und einem P_{NO} von 1 atm) und die im Gegensatz zu N_2O_3 und N_2O_5 außerordentlich schwache Neigung zu Hydrierungsreaktionen für seine biologische Wirksamkeit von großer Bedeutung. Da die meisten biologischen Verbindungen aufgefüllte Valenzelektronenschalen besitzen, ist die direkte Reaktion von NO mit diesen Strukturen nahezu ausgeschlossen (Beckman & Koppenol 1996). Außerordentlich schnell ablaufende Reaktionen sind hingegen mit Molekülen, die ebenfalls ungepaarte Elektronen aufweisen möglich (freie Radikale, komplexierte Metalle). Eine schematische Übersicht mit den von NO in biologischen Systemen möglichen Reaktionen ist in der nachfolgenden Abb. 1.1 gegeben.

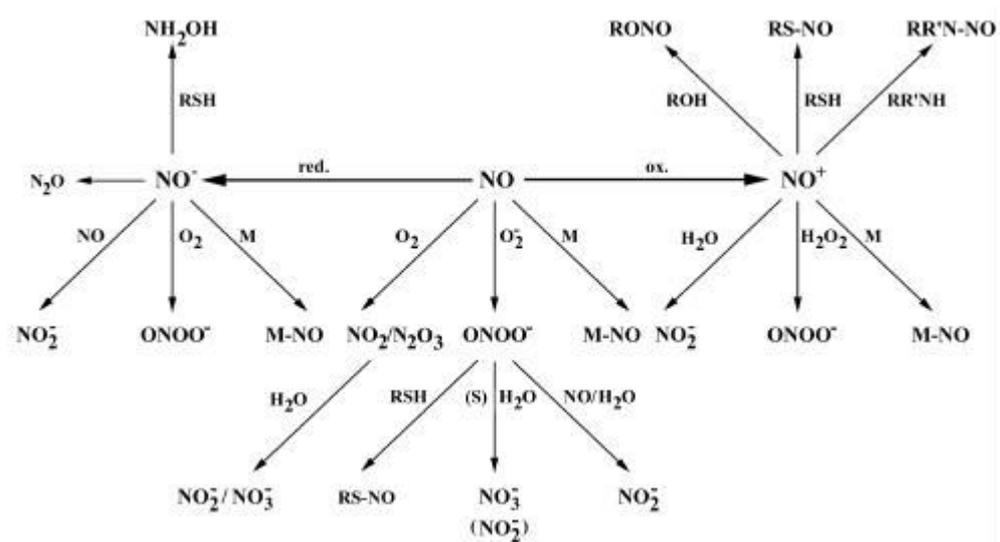


Abb. 1.1: Übersicht der Reaktionsmöglichkeiten von NO in biologischen Systemen nach Feelisch & Stamler (1996)

Die Reduktion von NO zum Nitroxylanion (NO⁻) ist thermodynamisch aufgrund des Reduktionspotentials von +0,25 V bevorzugt. NO⁻ kann weiter zu N₂O reagieren (durch Dimerisierung und Dehydratation) oder reagiert nach den in Abb. 1.1 dargestellten Reaktionswegen mit unterschiedlichen biologischen Strukturen. Die Oxidationsreaktion von NO mit Sauerstoff, Superoxidradikalen und Metallen zum NO⁺-Kation verläuft unter physiologischen Bedingungen sehr schnell. Obwohl NO⁺ mit zahlreichen biologischen Strukturen reagieren kann, werden die nukleophilen Zentren von Aminen und Thiolen bevorzugt. (Feelisch & Stamler 1996).

Von besonderer pathophysiologischer Bedeutung ist die Reaktion von NO mit Superoxidradikalen. Mit einer Reaktionskonstante von 3,9 – 6,7 x10⁹ M⁻¹s⁻¹ verläuft die Reaktion so schnell, daß sie annähernd diffusionslimitiert ist (Huie & Padmaja 1993). Das mit dem Begriff Peroxynitrit bezeichnete Produkt ist ein äquimolares Gemisch aus dem Peroxynitrit-Anion (ONOO⁻) und seiner konjugierten Säure, der Peroxynitritsäure (ONOOH). Während das Anion stabil ist, zerfällt die durch Protonierung (pK_a = 6,8) erhaltene Säure mit einer Halbwertszeit von ca. 1 sec (pH 7,4, 37 °C) zu potentiell zytotoxischen Reaktionsprodukten (Beckman *et al.* 1990). Sowohl intramolekulare Umlagerungsreaktionen zu Nitrat als auch der homolytische Zerfall zum Hydroxyl- und Stickstoffdioxidradikal nach Gleichung 1.10 ist möglich.



Die Reaktionen von Peroxynitrit sind aufgrund seiner starken Reaktivität vielfältig. So wurde die Oxidierung von SH-Gruppen (Radi *et al.* 1991a), die Lipidperoxidation von Membranen (Radi *et al.* 1991b) und die Nitrierung von Tyrosinen zu Nitrotyrosinen beobachtet (Ischiropoulos *et al.* 1992).

Die Reaktion von NO mit komplexierten Metallatomen, insbesondere mit eisenhaltigen Häm-Gruppen, ist für eine biologische Aktivität von großer Bedeutung, kann aber auch zu Inaktivierungen von metallhaltigen Enzymen führen, wie es für die mitochondriale Aconitase und die Komplexe I und II der Atmungskette beschrieben ist (Henry *et al.* 1993).

1.3.3 Schutzmechanismen gegen NO und reaktive Stickstoffverbindungen

Anders als gegen Sauerstoffradikale und reaktive Sauerstoffspezies verfügen eukaryotische Zellen über keine direkten enzymatischen Schutzsysteme gegen NO bzw. gegen die von ihm abgeleiteten reaktiven Stickstoffverbindungen. Indirekter Schutz ist durch das Verhindern von Sekundärreaktionen möglich, indem z.B. reaktive Sauerstoffradikale inaktiviert werden, oder durch das Abfangen von NO durch Reaktionen, bei denen nicht-reaktive Reaktionsprodukte entstehen. Beispiele hierfür sind die Nitrosylierungen von Hämoglobin, die Oxidation zu Nitrit/Nitrat oder die Bildung von S-Nitrosothiolen.

Eine effektive Verhinderung der Peroxynitrit-Bildung ist aufgrund der hohen Reaktionskonstante von NO mit $O_2^{\cdot -}$ (siehe 1.3.2) durch die Dismutation der Superoxidradikale nur zu erreichen, wenn die Superoxiddismutasekonzentration genauso hoch oder höher ist als die Radikalkonzentration und die Superoxiddismutase in unmittelbarer Nähe zum Ort der Radikalgenerierung lokalisiert ist (Darley-Usmar *et al.* 1995).

1.4 Pathophysiologie von reaktiven Sauerstoffspezies und NO

1.4.1 Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Hydroxylradikale, sind potentiell schädlich, weil sie mit einem breiten Spektrum an Biomolekülen reagieren können (Cross *et al.* 1987; Mehrotra *et al.* 1991; Trush & Kensler 1991). Sie verursachen Schäden durch Lipidperoxidation, oxidative Veränderungen von Proteinen und DNA-Schäden. Die DNA wird durch die Oxidation ihrer Basen (Halliwell & Aruoma 1991; Trush & Kensler 1991) sowie durch die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen geschädigt (Halliwell & Aruoma 1991; Imlay & Linn 1988). Die DNA-Strangbrüche aktivieren die Poly-ADP-Ribose-Polymerase, welche bei DNA-Reparaturmechanismen eine bedeutende Rolle spielt (Junod *et al.* 1989; Schraufstatter *et al.*

1986). Die Folge dieser Aktivierung ist jedoch eine Verminderung des zellulären NAD- und ATP-Gehaltes, was durch hohen ATP- und NAD-Verbrauch zum Zelltod führt.

Bei der Lipidperoxidation entstehen durch die Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf ungesättigte Fettsäuren Lipidperoxide. Diese reagieren in der Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen unter der Bildung von toxischen Verbindungen, wie zum Beispiel Malonaldehyd, das seinerseits die Aminogruppen von Proteinen angreift. Zusätzliche Folge der Lipidperoxidation ist die Inaktivierung von Membranrezeptor-Proteinen, Schädigung von Membranproteinen, sowie eine Verschlechterung der Membranfluidität (Halliwell & Gutteridge 1995).

Weiterhin können die reaktiven Sauerstoffspezies Proteine aktivieren und inaktivieren. Es werden durch aktivierte neutrophile Granulozyten infolge der Sauerstoffradikalfreisetzung Enzyme inaktiviert. So wird die Glutamat-Synthase durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus aktivierten neutrophilen Granulozyten inaktiviert (Oliver 1987). Alternativ wird die Guanylat-Cyclase durch die Oxidation ihrer Sulfhydryl-Gruppen mit Wasserstoffperoxid aktiviert (White *et al.* 1976). Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit der Glucokinase gegenüber oxidativen Angriffen, wie zum Beispiel durch Alloxan, das die Glucokinase durch Oxidation von SH-Gruppen inhibiert, zu erwähnen (Lenzen & Panten 1988).

Freie Radikale besitzen im Organismus neben pathophysiologischen auch physiologische Funktionen und nehmen an einer Vielzahl biologischer Prozesse teil. Sauerstoffradikale fungieren in biochemischen Prozessen auch als regulatorische Moleküle. Aktivierte phagozytäre Zellen (Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie die meisten Makrophagentypen) produzieren Superoxidradikale mit der NADPH-Oxidase im Rahmen einer bakteriellen Abwehr (Rice Evans & Burdon 1993). Ein weiterer Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten ist die Myeloperoxidase, die H_2O_2 zur Oxidation von Chloridionen unter Bildung von hypochloriger Säure verwendet. Hypochlorige Säure ist ein potentes antibakterielles Agens (Weiss 1989). Darüber hinaus modulieren reaktive Sauerstoffspezies Signaltransduktionsprozesse, wie sie für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 beschrieben werden (siehe auch Diskussion).

1.4.2 Wirkung von NO und reaktiven Stickstoffverbindungen

Obwohl NO nicht als klassischer interzellulärer Signalmediator, der sezerniert wird und an einen membranständigen Rezeptor bindet, aufgefaßt werden darf, sind für NO zahlreiche physiologische Signalfunktionen nachgewiesen worden. Als die drei Hauptbereiche, in denen NO Signalfunktionen ausübt, lassen sich das kardiovaskuläre System (Regulation des Blutdrucks), das Zentrale Nervensystem (Steuerung der Durchblutung einzelner Gehirnbereiche und Modulation der Neurotransmitterausschüttung) und das Immunsystem (NO als Teil des Entzündungsprozesses gegenüber Bakterien, Viren und Tumorzellen) anführen. Für *E. coli*-Bakterien konnte eine Induktion multipler Gengruppen durch NO nachgewiesen werden. Die in der oxidativen Stressantwort beteiligten Proteine (MnSOD, Katalase, Glutathion-Reduktase und Endonuklease IV) unterliegen dabei der durch die SoxR- und OxyR-Regulatoren ausgeübten Transkriptionskontrolle und erhöhen so die Resistenz von Bakterien gegenüber dem von Makrophagen produzierten NO (Hidalgo *et al.* 1997). Solche NO-kontrollierten Transkriptionsprozesse konnten für eukaryotische Zellen nicht nachgewiesen werden.

Die Pathophysiologie von NO ist wie die von Sauerstoffradikalen durch seine Reaktivität gekennzeichnet. Enzyminhibitionen, Lipidperoxidationen und DNA-Strangbrüche sind dabei die wichtigsten beobachteten Zellschädigungen.

1.4.3 Diabetes mellitus und der Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies, NO und Zytokinen

Der Diabetes mellitus ist durch erhöhte Nüchternblutzuckerwerte und postprandiale Blutzuckerwerte klinisch-chemisch definiert, hat jedoch von der Ätiologie her verschiedene Ursachen (Bennet 1983; Keen 1982). Vom Typus werden der jugendliche insulinpflichtige Typ I Diabetes mellitus, früher als IDDM bezeichnet (Eisenbarth 1986), und der nicht insulinpflichtige Altersdiabetes (Typ II), früher als NIDDM bezeichnet, unterschieden (Turner *et al.* 1992). Eine aktuelle Übersicht über die Klassifikations- und Diagnosekriterien des Diabetes mellitus ist bei Kerner (1998) gegeben. Während der jugendliche Diabetes mellitus als Autoimmunerkrankung (Bach 1994) zu einer progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen führt, bleiben diese im Altersdiabetes zum größten Teil intakt. Es sind vielmehr Sekretionsdefekte, die in Kombination mit Insulinwirkungsstörungen, der sogenannten Insulinresistenz, zu Störungen der Glucosetoleranz führen.

Die Zerstörung der B-Zellen im Autoimmundiabetes wird durch Aktivierung von toxischen Lymphozyten mediiert (Benoist & Mathis 1997), die in Folge Zytokine, NO und freie

Sauerstoffradikale wie Superoxidradikale freisetzen (Mandrup Poulsen *et al.* 1990). Epidemiologische Studien belegten zudem, daß Umwelteinflüsse wie Virusinfektionen, Ernährung und Toxine diesen Zerstörungsprozeß nicht unerheblich mitbestimmen (Yoon *et al.* 1987; Yoon 1990). Das „Kopenhagener Modell“ nach Nerup *et al.* (1994) faßt die wichtigsten Prozesse der Pathogenese des Typ I Diabetes zusammen (siehe Abb. 1.2).

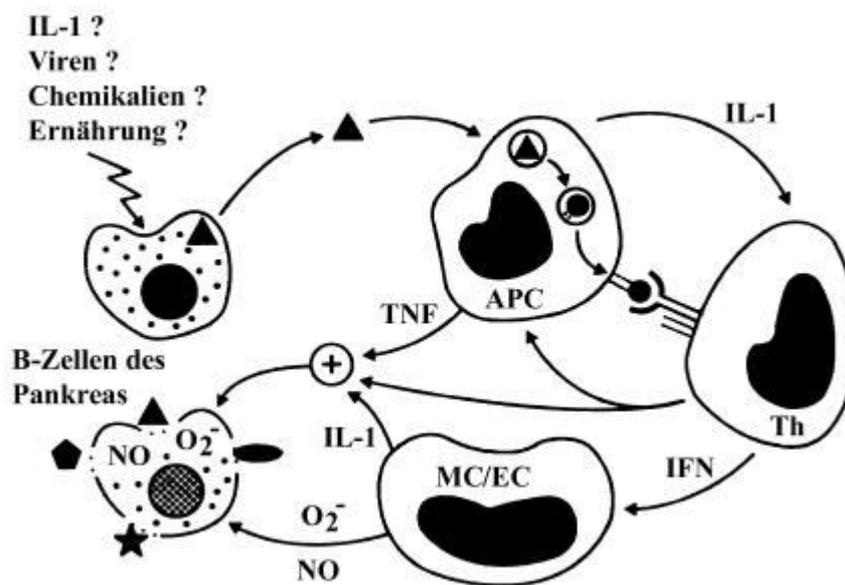


Abb. 1.2: „Kopenhagener Modell“ der Pathogenese des Typ I Diabetes mellitus (nach Nerup *et al.* 1994)

In der initialen Phase werden die B-Zellen des Pankreas durch zur Zeit nicht näher bekannte äußere Einflüsse (z.B. virale Infektion oder Nahrungsbestandteile) zerstört. Die dabei freigesetzten B-zellspezifischen Proteine werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und präsentiert.

In einer zweiten Phase (Verstärkungsphase) werden durch die aktivierten APCs Zytokine (IL-1 β und TNF- α) sezerniert. Gleichzeitig werden die von APCs präsentierten Antigene durch spezifische T-Helferzellen (Th) erkannt. Die Aktivierung der T-Helferzellen stimuliert die Sekretion von Zytokinen, von denen insbesondere das IFN- γ die Expression von MHC II-Molekülen induziert. Zusätzlich wird die Sekretion von IL-1 β und TNF- α durch die APCs in einer IFN- γ -bedingten Feed-Back-Stimulierung verstärkt. Als Folge der hohen lokalen Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ wird die Zerstörung von B-Zellen des Pankreas durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und NO aus Makrophagen (MC), Endothelzellen (EC) und B-Zellen des Pankreas potenziert. Das Ergebnis dieser Vorgänge ist die Selbstverstärkung des eingeleiteten Autoimmunprozesses bis zur völligen Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen.

Weitere Bedeutung bei der Zerstörung der pankreatischen B-Zellen hat auch ihre funktionelle Integrität. So konnte in Tiermodellen des Autoimmundiabetes gezeigt werden, daß eine metabolische Fehlfunktion der B-Zellen des Pankreas (bedingt durch erste lokale Infiltrationen der Pankreasinseln) in frühen Stadien der Diabetesentwicklung den Prozeß der Autoimmunzerstörung durch Freisetzung zellulärer Antigene wie der Glutamatdecarboxylase beschleunigt (Homo-Delarche & Boitard 1996).

Die Zerstörung der B-Zellen des Pankreas verläuft chronisch über Monate und sogar Jahre bis die Restfunktion des endokrinen Pankreas vollkommen erloschen ist. Freie Sauerstoffradikale sowie NO spielen in der Pathogenese der B-Zellzerstörung eine entscheidende Rolle (Suarez Pinzon *et al.* 1994). Diese freien Radikale werden einerseits extrazellulär durch aktivierte mononukleäre Zellen freigesetzt, andererseits entstehen sie im Signalprozeß von freigesetzten Entzündungsmediatoren in der B-Zelle des Pankreas. Zytokine wie das Interleukin-1 β (IL-1 β), Interferon- γ (IFN- γ) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wirken als typische Vertreter der Entzündungsmediatoren zytostatisch oder gar zytotoxisch auf B-Zellen des Pankreas (Sandler *et al.* 1991). Unabhängig vom auslösenden Antigen des Autoimmunprozesses wirken diese löslichen Signalpeptide über spezifische Rezeptoren in der B-Zellplasmamembran in pikomolaren Konzentrationen.

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B löst die Aktivierung von Genen in den B-Zellen des Pankreas aus, die auf die zelluläre Funktion schützend oder zerstörend wirken. So werden auf der einen Seite Hitzeschockproteine und die Hämoxygenase Typ I aktiviert (Welsh *et al.* 1995), die Proteine mit Hilfe ihrer Chaperonwirkung schützen bzw. katalytisch wirksames Fe²⁺ inaktivieren. Andererseits ist die Induktion der NO-Synthase (iNOS) eines der am besten erforschten Phänomene der Zytokinwirkung auf insulinproduzierende Zellen. Als Folge wurden schwere Organellendefekte und die Induktion apoptotischer Prozesse beschrieben (Ankarcona *et al.* 1994; Buttke & Sandstrom 1994). Mit der Zytokinstimulation von pankreatischen B-Zellen ist auch ein Anstieg von freien Sauerstoffradikalen verbunden. Diese sind in vergleichbarem Ausmaß an der Zerstörung von zellulären Strukturen beteiligt mit der Folge der DNA-Schädigung (Rabinovitch *et al.* 1994), der Inaktivierung von Proteinen sowie der Schädigung der Plasmamembran durch Lipidperoxidation (Welsh & Sandler 1992). Signalübertragende Funktionen von Sauerstoffradikalen werden derzeit noch diskutiert (siehe auch 4.4). Die Zerstörung der B-Zelle durch freie Sauerstoffradikale stellt ein labiles Gleichgewicht zwischen der Menge und der Art von freien Sauerstoffradikalen sowie den Abwehrmechanismen einer Zelle dar. Wie unter 1.2.2 beschrieben, zählen die zytoprotektiven Superoxiddismutasen, die Katalase und die Glutathionperoxidasen zu den effektivsten Inaktivatoren von Sauerstoffradikalen. Obwohl die Toxizität von Sauerstoffradikalen schon seit mehr als 30 Jahren für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich gemacht wird, ist eine abschließende Charakterisierung der zum Zelltod führenden Sauerstoffradikalschäden in den B-Zellen des Pankreas bisher nicht erfolgt. Bei weiteren Untersuchungen müssen neuere Studien berücksichtigt werden, die belegen, daß ein hohes Aktivitätsniveau zytoprotektiver Enzyme nicht gleichbedeutend mit einem guten Schutz der Zelle vor Sauerstoffradikalen ist. Es

ist vielmehr das Verhältnis aus Superoxid- und Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen, das die Empfindlichkeit eines zellulären Systems gegenüber Sauerstoffradikalen bestimmt. Die Überexpression der Cu/ZnSOD in Endothelzellen von transgenen Mäusen belegt eindrucksvoll eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen, die freie Sauerstoffradikale generieren (Amstad *et al.* 1991). Die chemische Reaktion von H_2O_2 zum Hydroxylradikal in der metallkatalysierten Fenton-Reaktion gilt als ein hochbewerteter Faktor für die Schädigung von Zellen. Dieser funktionelle Aspekt der Sauerstoffradikal-Toxizität hat für die Zerstörung der B-Zellen des Pankreas besondere Bedeutung. Die Empfindlichkeit gegenüber Noxen, die freie Sauerstoffradikale generieren, ist seit Jahren hinreichend bekannt. Die selektiv B-zelltoxische Substanz Alloxan ist das Paradebeispiel für die Induktion eines chemischen Diabetes mellitus (Asayama *et al.* 1984). Alloxan generiert freie Sauerstoffradikale in Redoxzyklen, was zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt (Lenzen & Munday 1991; Munday *et al.* 1993). Der Schutz durch extrazellulär applizierte Katalase und Superoxiddismutase gegenüber Alloxan betont die Bedeutung der zytoprotektiven Enzyme für den Schutz der B-Zellen des Pankreas (Fischer & Hamburger 1980).

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die verschiedenen zytoprotektiven Enzyme in insulinsezernierenden RINm5F-Gewebekulturzellen zur Überexpression zu bringen und so den Abwehrstatus der Zelle zu verbessern. Nachfolgende Inkubationsversuche mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren sowie den B-zelltoxischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ sollen den Umfang und die Art des Schutzes gegenüber diesen Noxen aufzeigen. Die Befunde sollen dazu beitragen, die Rolle von zytoprotektiven Enzymen für die Funktion des Zellschutzes von B-Zellen des Pankreas besser zu verstehen und Perspektiven für die gentherapeutische Veränderung der Expression zu entwickeln.

1.5 Fragestellung

Das Ziel der Untersuchungen war es, die Expression der zytoprotektiven Enzyme Katalase, Glutathionperoxidase, Cu/ZnSOD und MnSOD in insulinproduzierenden RINm5F-Gewebe- kulturzellen durch stabile Überexpression zu erhöhen. Durch Versuche mit chemischen sauerstoffradikalgenerierenden Substanzen und NO-Donatoren sowie mit B-zelltoxischen Zytokinen sollten mögliche Schutzeffekte der verschiedenen Überexpressionen untersucht und eine Beteiligung von Sauerstoffradikalen an der durch Zytokine medierte Zellschädigung aufgezeigt werden.

Im einzelnen waren folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Welche Bedeutung besitzen zytoprotektive Enzyme für den Schutz von insulin- produzierenden Zellen vor der toxischen Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies und NO ?
- 2) Wie werden freie Sauerstoffradikale in insulinproduzierenden Zellen in Abhängigkeit von
 - a) der Sauerstoffradikalspezies
 - b) der Konzentration und Expositionszeit
 - c) dem Ort der Generierunginaktiviert ?
- 3) Welches sind die limitierenden Schritte für die Inaktivierung von freien Radikalen in insulinproduzierenden Zellen ?
- 4) Können zytoprotektive Enzyme die synergistische Schädigung von insulinproduzierenden Zellen durch Sauerstoffradikale und NO effektiv verhindern ?
- 5) Können zytoprotektive Enzyme durch Sauerstoffradikale mediierte Schäden insulin- produzierender Zellen nach Zytokinexposition verhindern ?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Material	Bezugsquelle
[α - ³² P]-dATP	Hartmann, Braunschweig
[γ - ³³ P]-dATP	Hartmann, Braunschweig
0,24 – 9,5 kb RNA-Längenstandard	GIBCO BRL, Eggenheim
1 kb DNA-Längenstandard	GIBCO BRL, Eggenheim
10 kDa Protein Molekulargewichtsmarker	GIBCO BRL, Eggenheim
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 37, 5:1	GIBCO BRL, Eggenheim
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Boehringer, Mannheim
6-Aminohexansäure	Sigma, München
Acrylamid Lösung 40 %	GIBCO BRL, Eggenheim
Agarose, <i>low melting</i> -Qualität	FMC, Rockland, USA
Agarose, Standard-DNA-Qualität	Bio-Rad, München
Albumin (Fraktion V)	Miles, Elkhart, USA
alkalische Phosphatase (CIAP)	Boehringer, Mannheim
Alloxan	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	GIBCO BRL, Eggenheim
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, peroxidase markiert	Dianova, Hamburg
Bakto-Tryptone	GIBCO BRL, Eggenheim
Bakto-Yeast-Extrakt	GIBCO BRL, Eggenheim
Bathocuproine Disulfonsäure	Sigma, München
BCA-Fertigreagenz	Pierce, Rockford, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, München
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
cDNA der humanen Katalase	ATTC, Rockville, USA
cDNA der humanen MnSOD	Dr. Bell, Chicago, USA
cDNA der Ratten Cu/ZnSOD	Dr. Ho, Detroit, USA
cDNA der Ratten Glutathionperoxidase	Dr. Ho, Detroit, USA

cDNA der Ratten Katalase	Dr. Furuta, Nagano Japan
cDNA der Ratten MnSOD	Dr.Ho, Detroit, USA
<i>Cell Proliferation ELISA System</i>	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cu/Zn-Superoxiddismutase aus Rindererythrozyten	Boehringer, Mannheim
Deoxynukleosidtriphosphate	Promega, Mannheim
DETA/NO	Dr. Kröncke, Universität Düsseldorf
Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC)	Sigma, München
<i>DIG Lumineszenz Detektions System</i>	Boehringer, Mannheim
D-Mannit	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma, München
DTT	Sigma, München
<i>ECL-Chemilumineszenz Detektions System</i>	Amersham Buchler, Braunschweig
EDTA	Sigma, München
EGTA	Baker, Deventer, Niederlande
Eisessig	Merck, Darmstadt
Elektroporationsküvetten, 2 mm Elektrodenabstand	Bio-Rad, München
Entwickler <i>LX 24</i>	Kodak, Rochester, USA
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Filterpapiere	Schleicher&Schuell, Dassel
Fixierer <i>AL 4</i>	Kodak, Rochester USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO BRL, Eggenheim
<i>Gel Shift Assay System</i>	Promega, Mannheim
Geneticin (G418)	GIBCO BRL, Eggenheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Sigma, München
Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten	Sigma, München
Glutathionreduktase aus Bäckerhefe	Sigma, München
Glycerol	GIBCO BRL, Eggenheim
Glycin	Merck, Darmstadt

Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Fluka, Buchs, Schweiz
Harnstoff	GIBCO BRL, Eggenheim
Hefe t-RNA	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	GIBCO BRL, Eggenheim
HEPES	Sigma, München
Herings-DNA	Boehringer, Mannheim
HOE33342-Farbstoff	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>Hybond N-Blotting-Membran</i>	Amersham Buchler, Braunschweig
<i>Hypercassette-Autoradiographie-Kassetten</i>	Amersham Buchler, Braunschweig
<i>Hyperfilm β-max 30x40 cm</i>	Amersham Buchler, Braunschweig
<i>Hyperfilm-MP 18x24</i>	Amersham Buchler, Braunschweig
Hypoxanthin	Sigma, München
<i>Immobilon-P Transfer (PVDF-Membran)</i>	Millipore, Eschborn
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Katalase aus Rinderleber	Sigma, München
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Lipofectamin Transfektionsreagenz	GIBCO BRL, Eggenheim
Luria Agar	GIBCO BRL, Eggenheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Menadion	Sigma, München
Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Nestle, Frankfurt
MTT	Serva, Heidelberg
N-(1-Naphthyl)ethylen-diamindihydrochlorid	Sigma, München
N ω -Nitro-L-Arginin	Sigma, München
NADPH	Boehringer, Mannheim

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Riedel-de Häen, Seelze
Natriumcyanid	Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-Laurylsarcosin	Sigma, München
Natriumnitrit	Sigma, München
Natriumnitroprussid	Sigma, München
Natriumselenit	Sigma, München
Natriumthiosulfat	Sigma, München
N-Butylalloxan	Dr. Munday, Hamilton, Neuseeland
NF- κ B p50-Untereinheit, rekombinant	Promega, Mannheim
Nitrobluetetrazolium (NBT)	Sigma, München
NP-40	Sigma, München
Nukleosidtriphosphate	Promega, Mannheim
Oligonukleotide für Sequenzierzwecke	GIBCO BRL, Eggenheim
Orange G	Sigma, München
<i>pBluescript SK+</i> -Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
<i>pcDNA3</i> -Expressionsvektor	Invitrogen, Leek, Niederlande
<i>pcDNA3Zeo</i> -Expressionsvektor	Dr. M. Marget, Universität Kiel
Phenol	Merck, Darmstadt
Plastiklaborartikel	Sarstedt, Nürnberg
PMSF	Sigma, München
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, München
Propidiumjodid	Sigma, München
PVP	Sigma, München
QIAGEN- <i>Maxi-Prep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
Rhodanese	Sigma, München

RNase/DNase-frei	Boehringer, Mannheim
<i>RNasin</i> Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
RPMI-1640 Medium	GIBCO BRL, Eggenheim
Salzsäure	Riedel-de Häen, Seelze
SDS	Sigma, München
Select Pepton 140	GIBCO BRL, Eggenheim
<i>Sephadex-G25</i> -Säulen	Pharmacia, Freiburg
<i>Sequenase</i> DNA Sequencing Kit, Version 2.0	Amersham Buchler, Braunschweig
<i>Serdolit MB-2</i> Mischbettionenaustauscher	Serva, Heidelberg
SIN-1	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt
SNAP	Sigma, München
Soforbildfilm Typ 667	Polaroid, Cambridge, USA
SPER/NO	Dr. Kröncke, Universität Düsseldorf
Spritzenvorfilter, steril, 0,2 µm Porengröße	Schleicher&Schuell, Dassel
Streptomycin/Penicillin	GIBCO BRL, Eggenheim
Sucrose	GIBCO BRL, Eggenheim
Sulfanilamid	Sigma, München
T3/7-RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	GIBCO BRL, Eggenheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
TEMED	GIBCO BRL, Eggenheim
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	Merck, Darmstadt
Xanthin	Sigma, München
Xanthinoxidase	Sigma, München
Zellkulturgefäße (steriles Einwegmaterial)	Nunc, Wiesbaden
Zeocin	Invitrogen, Leek, Niederlande
Zytokine, rekombinant (IL-1β, TNF-α, IFN-γ)	Promocell, Heidelberg

2.2 Kultivierung der RINm5F-Zellen

Die für diese Untersuchungen verwendete RINm5F-Zellkulturlinie ist eine insulinsezernierende permanente Zellkulturlinie. Gazdar *et al.* gelang es 1980 durch hochdosierte Ganzkörper-Röntgenbestrahlung von Ratten, einen transplantierbaren Inselzelltumor zu induzieren und durch serielle Transplantation in Ratten aufrechtzuerhalten. Der Subklon RINm wurde durch Heterotransplantation in thymuslose Nacktmäuse gewonnen (Bhathena *et al.* 1982). Eine weitere Vereinzelnung dieses Klons brachte die RINm5F-Zelllinie mit stabiler Insulinsekretion hervor.

RINm5F-Zellen wurden adhärent wachsend in 10 mM glucosehaltigem RPMI-1640 Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert war, kultiviert. Zur Verhinderung von bakteriellen Kontaminationen wurde dem Medium zusätzlich Penicillin (10 U/ml) und Streptomycin (10 µg/ml) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im Zellkulturinkubator. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden sterile Einwegprodukte verwendet.

Für alle Untersuchungen wurden RINm5F-Zellen der Passagen 60 bis 85 verwendet. Die Zellen wurden zur Erhaltung in 75 cm³ Zellkulturflaschen kultiviert, wobei das Medium jeweils nach 72 h erneuert wurde. Nach Überschreiten der Passagenzahl 85 wurden Zellen einer niedrigeren Passage aufgetaut und ausgesät. Ein unverändertes Expressionsmuster der verschiedenen zytoprotektiven Enzyme während der Versuchsreihen wurde durch regelmäßige Messungen der Enzymaktivitäten sichergestellt (siehe 2.8).

2.2.1 Zellpassagierung

Die Kultivierung der Erhaltungskulturen erfolgte in 75 cm³ Zellkulturflaschen. Die Passagierung der transfizierten und nicht transfizierten RINm5F-Zellen wurde wöchentlich durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS überspült.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert.

Die Zellen wurden anschließend mit 3 ml der Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 %/0,1 %) überschichtet und für 3 min bei 37 °C inkubiert.

EDTA-Stammlösung:

2,0 % (w/v)	Na ₂ EDTA
-------------	----------------------

In sterilem PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei)

Nach dem Auflösen des Na₂EDTA wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Lösung autoklaviert und zu 5 ml aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Lösung dient der Herstellung von Trypsin-EDTA-Lösung.

Trypsin-EDTA-Lösung:

10 ml	0,25 % (w/v) Trypsin-Stammlösung
5 ml	2 % (w/v) EDTA-Stammlösung

Mit PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) *ad* 100 ml. Die Endkonzentration betrug 0,025 % (w/v) Trypsin und 0,1 % (w/v) EDTA. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen unterstützt. Anschließend wurde das Trypsin mit 5 ml FCS-haltigem RPMI-1640 Medium inaktiviert. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 1000 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in RPMI-1640 Medium gründlich resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellzahl, wie unter 2.2.3 beschrieben, bestimmt. Das notwendige Volumen für die Einsaat der gewünschten Zellzahl wurde berechnet und diese Zellsuspension wurde in vorbereitete Zellkulturgefäße überführt. Für die Erhaltungskultur wurden 10⁵ Zellen/75 cm³ Zellkulturflasche ausgesät. Für die einzelnen Versuchsreihen wurde die Anzahl der ausgesäten Zellen den unterschiedlich großen Zellkulturgefäßen angepaßt (siehe 2.9 und 2.11).

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen RINm5F-Zellen

Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und am Passagierungstag mit PBS überspült, abtrypsiniert und bei 1000 g pelletiert. Die Resuspendierung erfolgte im Anschluß in vorgekühltem RPMI-1640 Medium, das mit 30 % (v/v) FCS und 10 % (v/v)

DMSO versetzt war. Anschließend wurde je 1 ml der Zellsuspension (entsprechend $1,5 \times 10^6$ Zellen) in vorbereitete Kryoröhrchen aliquotiert, das dann schrittweise abgekühlt wurde: 2 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ und für die Langzeitlagerung wurde die gefrorene Zellsuspension in flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) überführt.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte im vorgewärmten Wasserbad ($37\text{ }^\circ\text{C}$) innerhalb kürzester Zeit (ca. 1 min). Nach anschließender Zentrifugation (5 min bei 1000 g) wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch Zugabe von frischem Medium vorsichtig resuspendiert und in die Kulturflasche überführt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und dem Medium der transfizierten Zelllinien wurde das jeweilige Antibiotikum zugesetzt (siehe 2.5.3).

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer

Die Bestimmung der Zellkonzentration einer Suspension erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer). Diese Methode beruht auf der mikroskopischen Zellzählung in einem definierten Volumen der Zellsuspension. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 16 Quadraten, wobei jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm^2 hat. Bei einer Tiefe von $0,1\text{ mm}$ ergibt sich ein Volumen von $0,1\text{ }\mu\text{l}$. Die Multiplikation des berechneten Mittelwerts mit 10^4 ergibt somit die Zellzahl/ml. Für die Berechnung der Gesamtzellzahl wurde das Volumen der Zellsuspension mit der Zellzahl/ml multipliziert (Lindl & Bauer 1994).

2.3 Transformation von *E. coli*-Bakterien mit Nukleinsäuren

Für die schnelle Propagierung neu generierter Plasmidkonstrukte war die Transformation von *E. coli*-Bakterien nötig.

2.3.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die für eine effiziente Transformation von *E. coli*-Bakterien mit Nukleinsäuren erforderliche Desintegration der Bakterienmembran wurde durch Elektroporation erreicht. Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes kann bei Zeitkonstanten (Maß für die Dauer der Porenbildung) von 4 - 5 ms die Membran desintegriert werden, ohne daß die Bakterien absterben, die Aufnahme von Fremd-DNA aber ermöglicht wird. Die hierfür verwendeten Bakterien stammen aus einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur. Durch sequentielle Waschschriffe wurden die Bakterien aus dem Kulturmedium in ein Medium mit geringem elektrischen Leitwert überführt.

400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer dichtbewachsenen *E. coli*-XL 1 Blue Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 – 4 h in einem Rundschüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, bis eine OD_{600 nm} von 0,7 erreicht wurde. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis gekühlt ehe die Bakterien pelletiert wurden (15 min bei 4 °C und 4000 g). Die Resuspendierung des Bakterienpellets erfolgte in 400 ml 10 %igem (v/v) Glycerol. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 200 ml 10 %iger (v/v) Glycerollösung aufgenommen und nach zwei zusätzlichen Waschschritten (Zentrifugation, Resuspension in 10 ml 10 %iger (v/v) Glycerollösung und Zentrifugation, Resuspension in 1 ml 10 %iger Glycerollösung) waren die Bakterien in 1 ml 10 %iger (v/v) Glycerollösung konzentriert. Die Lagerung der in 60 µl Aliquots aufgeteilten Bakteriensuspension erfolgte bei -70 °C.

2.3.2 Elektroporation

Nach langsamem Auftauen wurden 40 µl einer Suspension elektrokompenter *E. coli*-Bakterien in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Biorad) überführt. Jeweils 1 ng aufgereinigtes Plasmid bzw. 1 µl eines Ligationsansatzes (1/20, entsprechend 50 ng DNA) wurde gut mit den elektrokompenten Bakterien durchmischt und für 4 – 5 ms einer elektrischen Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien in 0,5 ml SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu gewährleisten.

SOC-Medium (pH 7,0):

20 g	Bakto-Tryptone
5 g	Bakto-Yeast-Extrakt
5 g	NaCl

Die Substanzen wurden in 950 ml ddH₂O gelöst. Anschließend wurden 2,5 mmol KCl dazugegeben, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Vor dem Gebrauch wurde das Medium durch Zusatz von MgCl₂ und Glucose (Endkonzentration 5 mM und 20 mM) komplettiert.

Nach der einstündigen Inkubation wurden 20 - 100 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Der Zusatz der Antibiotika Ampicillin bzw. Zeocin zum Agarmedium bewirkte, daß nur mit dem Plasmid transformierte Bakterien Kolonien auf dem Agar bilden konnten.

<u>Luria Agar:</u>	<u>low salt Luria Agar (für zeocinhaltigen Agar):</u>
10 g SELECT Pepton 140	10 g SELECT Pepton 140
5 g Hefe Extrakt	5 g Hefe Extrakt
12 g Luria Agar	12 g Luria Agar
10 g NaCl	5 g NaCl
Ampicillin: Endkonzentration 50 µg/ml	Zeocin: Endkonzentration 25 µg/ml
Die angegebenen Komponenten wurden in 1000 ml ddH ₂ O suspendiert und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die flüssige Agarlösung wurde langsam bis auf 50 °C abgekühlt ehe die jeweiligen Antibiotika hinzupipettiert wurden. Für eine 9 cm Petrischale wurden je 20 ml Agarlösung verwendet. Die Agarplatten wurden bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.	

Nach 12 h Bebrüten zeigten sich auf den Agarplatten antibiotikaresistente Klone, von denen bis zu 12 auf das rekombinante Plasmid untersucht wurden. Hierfür wurden die Bakterienkolonien in 2 ml ampicillinhaltiges (50 µg Ampicillin/ml) bzw. zeocinhaltiges *low salt* (25µg Zeocin/ml) LB-Medium überführt.

<u>LB-Medium (pH 7,0):</u>	<u>low salt LB-Medium (pH 7,5):</u>
10 g Bakto-Trytone	10 g Bakto-Trytone
5 g Bakto-Yeast-Extrakt	5 g Bakto-Yeast-Extrakt
10 g NaCl	5 g NaCl
gelöst in 1000 ml ddH ₂ O und anschließende Autoklavierung	

Die Bakterienklone wuchsen für ca. 12 h bei 37 °C und 220 rpm. Durch Plasmid-Isolierung (*Mini-Prep*) und anschließende Restriktionsschnittanalysen wurden die Plasmide überprüft (siehe 2.4.4). Positive Klone wurden mit Glycerol stabilisiert und bei -70 °C aufbewahrt. Dazu wurden 150 µl Glycerol in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 850 µl der Übernachtskultur versetzt und gut gevortext.

2.4 Subklonierung der cDNA-Sequenzen in eukaryotische Expressionsvektoren

Für die Überexpression von Proteinen in eukaryotischen Säugetierzellen werden spezielle eukaryotische Expressionsvektoren benutzt. Diese enthalten neben den zur Propagierung in Bakterien benötigten Elementen (prokaryotischer DNA-Replikationsursprung, prokaryotische Antibiotikaresistenz) auch solche, die die mRNA-Synthese und die nachfolgende Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen ermöglichen. Besonders hervorzuheben sind der Promotor- bzw. Enhancerbereich, der aufgrund seiner DNA-Sequenz als Ansatzpunkt für die RNA-Polymerase dient und so die Transkription der subklonierten cDNA initiiert. Eine der cDNA folgende Polyadenylierungssequenz dient der Terminierung und Stabilisierung der neu

synthetisierten mRNA-Moleküle. Das Vorhandensein eines in eukaryotischen Zellen wirksamen Resistenzgens ermöglicht die Selektion von transfizierten Zellen durch Zusatz entsprechender Antibiotika zum Zellkulturmedium. Die so selektionierten Zellklone haben die Vektor-DNA stabil in das Zellgenom integriert und zeigten so eine über einen Zeitraum von mehreren Monaten konstante Expressionsrate der transfizierten cDNA-Sequenzen.

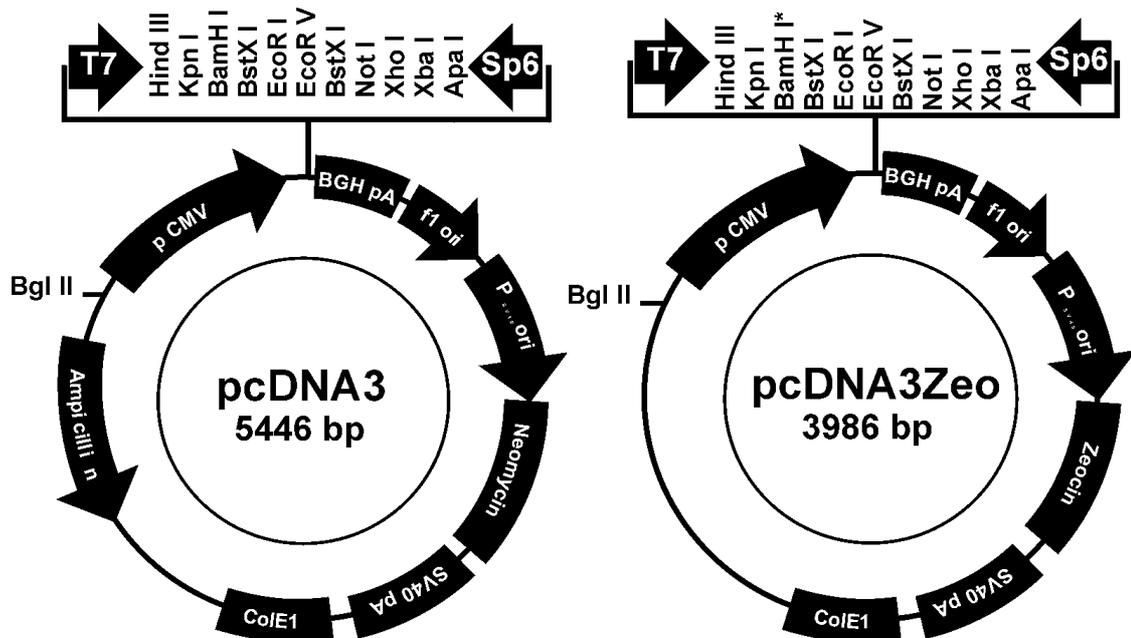


Abb. 2.1: Aufbau der benutzten eukaryotischen Expressionsvektoren *pcDNA3* und *pcDNA3Zeo*

Die einzelnen Elemente der Vektoren sind durch die Kastenelemente hervorgehoben. Die Orientierung der Pfeilspitzen indiziert die Orientierung der einzelnen Elemente. Das Restriktionsenzym *Bgl II* schneidet die *pcDNA3*- und *pcDNA3Zeo*-Vektoren an Position 13. Dieses Restriktionsenzym wurde vor der Transfektion von RINm5F-Zellen zur Linearisierung des Vektors benutzt (siehe 2.5.1). Die durch einen Stern markierte *BamHI*-Restriktionsschnittstelle in der *multiple cloning site* des *pcDNA3Zeo*-Vektors stellt keine singuläre Schnittstelle dar und kann daher nicht als Klonierungsschnittstelle dienen.

Die für diese Arbeit verwendeten Vektoren *pcDNA3* (Invitrogen, Abb. 2.1) und *pcDNA3Zeo* (Dr. M. Marget, Universität Kiel, Abb. 2.1) enthalten den Promotorbereich des humanen Zytomegalievirus, der in insulinproduzierenden Zellen eine sehr hohe, konstitutive Expression ermöglicht (Schnedl *et al.* 1994). Die dem 3'-Ende der cDNA folgende Polyadenylierungssequenz entstammt dem Rinderwachstumshormongen. Durch die Neomycin-Resistenz im *pcDNA3*-Vektor bzw. die Zeocin-Resistenz im *pcDNA3Zeo*-Vektor ist die Generierung von stabil transfizierten Zellklonen möglich.

Das Neomycin-Resistenzgen kodiert eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, die das Antibiotikum Geneticin (G418), ein Aminoglycosid, durch Phosphorylierung inaktiviert. Die Toxizität, die auf der Blockierung der Proteinbiosynthese an den 80 S-Ribosomen beruht, wird

somit verhindert (Kingston 1997). Das Zeocin-Resistenzgen kodiert ein Bleomycin-bindendes Protein (*sh ble*). Die Toxizität des Zeocins beruht auf der Bindung an die DNA und auf dem nachfolgenden Zerschneiden der DNA an der Bindungsstelle. Durch eine vorherige Bindung des Zeocins an das *sh ble*-Protein wird diese Reaktion verhindert (Gatignol *et al.* 1988). Mit der Verwendung dieser zwei Selektionsmarker war die kombinierte Überexpression von zwei unterschiedlichen cDNAs möglich.

2.4.1 Ausgangsvektoren mit den cDNA-Sequenzen der unterschiedlichen zytoprotektiven Enzyme

Die cDNAs der unterschiedlichen zytoprotektiven Enzyme wurden freundlicherweise von unterschiedlichen Forschergruppen zur Verfügung gestellt (siehe 2.1). Weitere Informationen zu den verwendeten Sequenzen (Größe der cDNA, Originalveröffentlichung und die zum Subklonieren benutzten Restriktionsenzyme) sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

cDNA	Literatur	cDNA (kb)	Restriktions-schnittstellen im <i>pcDNA3</i> -Vektor	Restriktions-schnittstellen im <i>pcDNA3Zeo</i> -Vektor	Ausgangsvektor
Humane Katalase	(Quan <i>et al.</i> 1986)	2,3	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>pcD</i>
Humane MnSOD	(Beck <i>et al.</i> 1987)	0,83	<i>EcoRI</i>	-	<i>pBR327</i>
Ratten Cu/ZnSOD	(Ho & Crapo 1987a)	0,65	<i>KpnI/BamHI</i>	-	<i>pUC13RCS</i>
Ratten GPx	(Ho <i>et al.</i> 1988)	0,85	<i>KpnI/BamHI</i>	-	<i>pSK+</i>

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten cDNA-Sequenzen

Die verwendeten cDNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der angegebenen Restriktions-schnittstellen aus dem Ausgangsvektor herausgeschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor *pcDNA3* bzw. *pcDNA3Zeo* subkloniert.

2.4.2 Restriktionsverdau der Ausgangsvektoren

Für die Subklonierung der cDNA-Sequenzen in die eukaryotischen Expressionsvektoren wurden die cDNA-Sequenzen aus den bakteriellen Klonierungsvektoren herausgeschnitten.

Herausschneiden der cDNA aus dem Ursprungsvektor:

je 5 µg	Plasmid-DNA
für Cu/ZnSOD und Glutathionperoxidase:	je 2,5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer L je 1 µl Restriktionsenzym <i>BamHI/KpnI</i> (10 U/µl)
für MnSOD und Katalase:	je 2,5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer H je 1 µl Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> (10 U/µl)
mit ddH ₂ O ad 25 µl; Inkubation für 2 h bei 37 °C	

10x Restriktionsenzym-Puffer L (pH 7,5): 100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTE

10x Restriktionsenzym-Puffer H (pH 7,5): 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 10 mM DTE

Das cDNA-Fragment und der Vektor wurden in einem 0,8 %igen *low melting* DNA-Agarosegel unter Verwendung von TBE-Laufpuffer elektrophoretisch bei einer Spannung von 60 V aufgetrennt (*Horizon 58* Elektrophoresekammer, GIBCO BRL). Zur Anfärbung der DNA-Banden wurde der Agarose nach dem Aufschmelzen 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Agaroselösung zugesetzt. Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 0,1 Vol. Orange G-Puffer gemischt.

TBE Laufpuffer (pH 8,3):

89 mM	Tris/HCl
89 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA

Orange G-Puffer:

50 % (w/v)	Sucrose
1 % (w/v)	Natrium-Laurylsarcosin
0,5 % (w/v)	Orange G

Lösen in 6x TBE-Puffer, Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm)

Als DNA-Längenstandard wurde zusätzlich eine 1 kb DNA-Leiter mit aufgetragen.

Die jeweiligen cDNA-Fragmente wurden unter UV-Illumination aus dem ethidiumbromidgefärbten Gel herausgeschnitten und in einer *in Gel*-Ligaton in den linearisierten und dephosphorylierten *pcDNA3*- bzw. *pcDNA3Zeo*-Vektor subkloniert.

2.4.3 Linearisierung und Dephosphorylierung der Expressionsvektoren

Linearisierung des *pcDNA3*- / *pcDNA3Zeo*-Vektors:

Je 1 µg des *pcDNA3/pcDNA3Zeo*-Vektors wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Ursprungsplasmide geschnitten. Es wurden die gleichen Restriktionsenzyme verwendet, mit denen auch die cDNAs aus dem Ursprungsplasmid herausgeschnitten wurden (siehe 2.4.2).

Der Restriktionsansatz wurde nach Beendigung der Reaktion mit *QIAquick PCR Purification* Säulen (Qiagen) aufgereinigt und in 40 µl ddH₂O eluiert. Zur Steigerung der Subklonierungseffizienz wurden die Enden des linearisierten Vektors durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert.

Dephosphorylierung des linearisierten *pcDNA3/pcDNA3Zeo*-Vektors:

40 µl	eluierte, linearisierte Plasmid-DNA
1 µl	CIAP (1U/µl)
5 µl	Dephosphorylierungspuffer (10x)
Mit ddH ₂ O <i>ad</i> 50 µl; Inkubation für 1 h bei 37 °C; Inaktivierung der alkalischen Phosphatase durch 10 min Erhitzen bei 75 °C.	

10x Dephosphorylierungspuffer (pH 8,5): 500 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

Nach erneuter Aufreinigung des dephosphorylierten Vektors mit den *QIAquick PCR Purification* Säulen wurde die DNA mit 20 µl ddH₂O von der Säule eluiert und ein Aliquot wurde in die Ligationsreaktion eingesetzt.

Ligation der cDNAs in den *pcDNA3/pcDNA3Zeo*-Vektor:

2 µl	(ca. 50 ng DNA)	linearisiertes, dephosphoryliertes Plasmid
15 µl	(ca. 100-250 ng DNA)	im Gel eingeschlossenes cDNA-Fragment
1 µl		T4-DNA-Ligase (1U/µl)
2 µl		Ligationspuffer (10x)
Inkubation für 16 h bei 16 °C		

10x Ligationspuffer (pH 7,5): 660 mM Tris/HCl, 50mM MgCl₂, 10 mM DTE, 10 mM ATP

Wie unter 2.3.2 beschrieben wurde ein Aliquot des Ligationsansatzes zur Transformation von *E. coli*-Bakterien verwendet. Die Bakterienkolonien wurden durch Plasmid-Isolierungen und Restriktionsschnittanalysen auf das Vorhandensein der rekombinanten Plasmide überprüft.

2.4.4 Plasmid-Isolierung (*Mini-Prep*)

Das Prinzip der Plasmid-Isolierung beruht auf der alkalischen SDS-Lyse von plasmidhaltigen Bakterien (Birnboim & Doly 1979). Nach anschließender Fällung von Proteinen und hochmolekularer DNA wird die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA durch Isopropanolzusatz präzipitiert.

Zur Durchführung einer Plasmid-Isolierung im *Mini-Prep* Maßstab wurden 1,5 ml einer 2 ml *E. coli*-Übernachtskultur 5 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in eiskalter 100 µl Lösung 1 resuspendiert.

Lösung 1:

50 mM	Glucose
25 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM	EDTA (pH 8,0)
Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm) und Lagerung bei 4°C	

Zu der Suspension wurden 0,5 µl (2,5 U) RNase/DNase-frei pipettiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 und nach weiteren 5 min 150 µl Lösung 3 dazupipettiert.

Lösung 2:

0,2 N	NaOH
1 % (w/v)	Natrium-Laurylsarcosin

Lösung 3:

60 ml	5 M Na-Acetat
11,5 ml	Eisessig
mit ddH ₂ O <i>ad</i> 100 ml	

Nach 5 min Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C wurde der plasmidhaltige Überstand in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und mit 450 µl Isopropanol 10 min präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde schließlich durch Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 12000 g) pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer (pH 8,0):

10 ml	1 M Tris (pH 8,0)
2 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Die vorgelegten Lösungen wurden mit ddH₂O auf 1000 ml Volumen aufgefüllt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Zur exakten Identifikation des isolierten Plasmids wurde bei einem Aliquot mit Restriktionsenzymen das subklonierte Insert herausgeschnitten und in einem 1 %igem TBE-Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.4.2). Rekombinante Plasmide wurden durch Sequenzanalyse zusätzlich verifiziert.

2.4.5 Sequenzanalyse der Plasmidkonstrukte

Alle verwendeten Plasmidkonstrukte wurden durch Sequenzanalyse nach Sanger bestätigt (Sanger *et al.* 1977). Die bei dieser Methode verwendete modifizierte T7-DNA-Polymerase (*Sequenase*) initiiert, von einem spezifischen komplementären Sequenzierungsprimer ausgehend, die *in vitro* DNA-Synthese. Dabei wird radioaktiv markiertes dATP ($[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dATP}$) in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Im Reaktionsansatz enthaltene spezifische Dideoxynukleotide bewirken einen Abbruch des neu synthetisierten DNA-Strangs, die Termination. Entsprechend ihrer Länge werden die entstehenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Der Sequenziervorgang kann in folgende Schritte unterteilt werden:

Denaturierung: Die Plasmid-DNA (3 μg in 50 μl TE-Puffer) wurde unter Zusatz von 5 μl 2 M NaOH/2 mM EDTA für 30 min bei 37 °C denaturiert und anschließend mit 5 μl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) neutralisiert. Mit 200 μl 100 %igem (v/v) Ethanol wurde die DNA bei -70 °C für 30 min gefällt und bei 12000 g und 4 °C für 15 min pelletiert, um schließlich mit 100 μl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet zu werden.

Primerhybridisierung: Die denaturierte DNA wurde in 7 μl ddH₂O gelöst, mit 1 μl Primerlösung (0,8 μM) und 2 μl *Sequenase* Reaktionspuffer (5x *Sequenase* Reaktionspuffer: 200 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl) versetzt und für 2 min bei 65 °C inkubiert. Folgende Sequenzierprimer wurden verwendet:

T7-Promotor- <i>Forward</i> -Primer	(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')
pcDNA3-BGH- <i>Reverse</i> -Primer	(5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3')

(für die Sequenzierungen der *pcDNA3/pcDNA3Zeo*-Konstrukte)

Universal M13-*Forward*-Primer(-40)(5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3')

(für die Sequenzierungen der *pBluescript SK*-Konstrukte)

DNA-Synthese/-Markierung:

Für die Markierung wurden 2 μl des 5x *Labeling Mixes* (5x *Labeling Mix*: 7,5 μM dGTP, 7,5 μM dCTP, 7,5 μM dTTP, 7,5 μM dATP) mit 8 μl ddH₂O verdünnt. Zu den 10 μl hybridisierter DNA wurden folgende Lösungen pipettiert und für 2 - 5 min bei RT inkubiert:

1 µl	DTT (0,1 M)
2 µl	verdünnter <i>Labeling Mix</i>
0,5 µl	[γ - ³³ P]-dATP
2 µl	<i>Sequenase</i> -Lösung (1 U/µl)

Termination: Jeweils 2,5 µl des entsprechenden Termination Mixes (ddA, ddG, ddC, ddT Termination Mix) wurden in 4 Eppendorf Reaktionsgefäßen bei 37 °C vorgewärmt und mit jeweils 3,5 µl des Markierungsansatzes gemischt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 5 min bei 37 °C durch Zusatz von 4 µl *Stop Solution* (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Bromphenolblau, 0,05 % (v/v) Xylencyanol).

<i>ddG Termination Mix:</i>	80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddGTP; 50 mM NaCl
<i>ddA Termination Mix:</i>	80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddATP; 50 mM NaCl
<i>ddT Termination Mix:</i>	80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddTTP; 50 mM NaCl
<i>ddC Termination Mix:</i>	80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddCTP; 50 mM NaCl

Polyacrylamidgel-Elektrophorese: Durch 2minütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die Reaktionsprodukte denaturiert, um anschließend in einem 8 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Modell S2, GIBCO BRL) bei 1800 V, 45 mA und 60 W aufgetrennt zu werden.

<u>Denaturierendes 8 %iges Polyacrylamidgel:</u>	
10 ml	10x TBE-Puffer
7,6 g	Acrylamid
0,3 g	Bisacrylamid
42 g	Harnstoff
25 µl	TEMED
1 ml	Ammoniumpersulfat (10 %) (w/v)
mit ddH ₂ O <i>ad</i> 100 ml	

Der Harnstoff wurde durch eine *Soak* Lösung (10% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol) in 20 min aus dem Gel herausgelöst. Das Gel wurde auf Filterpapier übertragen und unter Vakuum für 2 h bei 80 °C getrocknet.

Autoradiographie: Das getrocknete Gel wurde in einer Autoradiographiekassette für 14 h auf einem Autoradiografiefilm (*Hyperfilm β-max*) bei RT exponiert.

2.4.6 Plasmid-Isolierung (*Maxi-Prep*)

Von allen verifizierten Plasmidkonstrukten wurden Plasmid-Isolierungen im *Maxi-Prep* Maßstab durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden in 250 ml LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (50 µg/ml) bzw. von Zeocin (25 µg/ml) 12 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator 16 h vermehrt.

Die Isolation der hochreinen Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte nach der Qiagen *Maxi-Prep*-Methode. Wie unter 2.4.4 beschrieben, wurden die Bakterien hierbei auch durch eine alkalische SDS-Lyse aufgeschlossen. Eine sich anschließende Ionenaustauschchromatographie trennt die freigesetzte Plasmid-DNA hochrein ab.

Die Bakteriensuspension einer Übernachtskultur wurde in Zentrifugenbehältern 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 4000 g pelletiert. Der erhaltene Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 10 ml Qiagen P1-Lösung (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNase, pH 8,0) resuspendiert. Nach Überführung in ein 50 ml Röhrchen wurde eine alkalische SDS-Lyse durch Zusatz von 10 ml Qiagen P2-Lösung (200 mM NaOH, 1 % (w/v) Natrium-Laurylsulfat) durchgeführt. Das Lysat wurde für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zusatz von 10 ml der neutralisierenden Qiagen P3-Lösung (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde anschließend eine Fällung von Proteinen und hochmolekularer DNA erreicht. Der Fällungsansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert, um eine optimale Präzipitation zu erzielen. Durch Zentrifugation bei 10000 g (20 min, 4 °C) wurden ausgefällte Proteine und denaturierte bakterielle DNA pelletiert. Die Säulenmatrix einer *QIAGEN-tip 500* Säule wurde zwischenzeitlich mit 10 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 1,5 % (v/v) Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X, pH 7,0) äquilibriert und der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde auf die Säule appliziert. Die Durchflußrate von 1 - 3 ml/min wurde durch die Schwerkraft gewährleistet. Anschließend wurde die Säulenmatrix zweimal mit 30 ml QC-Lösung (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Das Plasmid wurde nach den Waschsritten mit 15 ml des auf 37 °C vorgewärmten QF-Puffers (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % (v/v) Ethanol, pH 8,5) von der Säulenmatrix eluiert.

Die Plasmid-DNA wurde aus dem Eluat durch Zusatz von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10000 g (25 min/4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde durch Überspülen mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Je nach Pelletgröße wurde die Plasmid-DNA in 200-500 µl TE-Puffer aufgenommen und quantifiziert.

2.4.7 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm quantifiziert (*Lambda Bio* Spektralphotometer, Perkin Elmer; Quarzküvette, Hellma). 1 OD entspricht unter Berücksichtigung einer 1:1000 Verdünnung einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA und 40 µg/µl einsträngiger RNA. Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann zusätzlich der Gehalt an verunreinigenden Proteinen innerhalb einer Probe bestimmt werden, so daß das Verhältnis zwischen 260 nm/280 nm Aufschluß über die Reinheit der Nukleinsäuren gibt. Bei Plasmid-Isolierungen unter Verwendung der Qiagen Säulen wurden Ratio-Werte von 1,7 - 1,9 erreicht. Die isolierten RNA-Proben (siehe 2.6.1) wiesen Ratio-Werte zwischen 1,6 und 1,8 auf und können somit ebenfalls als hochreine Präparationen bezeichnet werden.

2.5 Transfektion von RINm5F-Zellen

Für die durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden RINm5F-Insulinomazellen mit den Expressionsvektoren stabil transfiziert. Zur Erleichterung der Plasmidintegration in das Zellgenom, wurden die Expressionsvektoren vor der Transfektion durch einen Restriktionsschnitt in solchen Plasmidbereichen linearisiert, die die Proteinexpression nicht beeinflussen (siehe Abb. 2.1). Nach dem liposomalen Gentransfer wurden durch den Zusatz der Antibiotika G418 oder Zeocin zum Zellkulturmedium einzelne Zellklone herausselektiert, die das jeweilige Plasmidkonstrukt stabil in ihr Genom integriert haben. Einige Klone wurden getrennt vermehrt und durch nachfolgende *Northern-Blot*- und *Western-Blot*-Analysen sowie Enzymaktivitätsmessungen charakterisiert.

2.5.1 Linearisierung der Expressionsvektoren

Die durch Sequenzanalyse verifizierte und mit der *Maxi-Prep* Plasmid-Isolierung aufgereinigte Vektor-DNA wurde durch einen Restriktionsschnitt mit *BglIII* linearisiert.

Linearisierung der Expressionsvektoren:

Je 2 µg	Expressionsvektor
Für <i>pcDNA3</i> und <i>pcDNA3Zeo</i> :	je 5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer M je 1 µl Restriktionsenzym <i>BglIII</i> (10 U/µl)
mit ddH ₂ O ad 50 µl; Inkubation für bei 2 h bei 37 °C; Linearisierung der Vektoren unmittelbar vor dem CMV Promotor (siehe Abb. 2.1)	

10x Restriktionsenzym-Puffer M (pH 7,5): 100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 mM DTE)

Nach abgeschlossener Reaktion wurde der linearisierte Vektor mit den *QIAquick PCR Purification* Säulen aufgereinigt und die DNA in 20 µl ddH₂O eluiert.

2.5.2 Liposomale Transfektion von RINm5F-Zellen

Für die Erleichterung des Transfers der Expressionsvektoren in den Zellkern wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamin* verwendet. Diese Mischung aus drei Teilen des polykationischen Lipids N-[2-(2,5-bis(aminopropyl)amino)-1-oxypentyl]aminoethyl]-N,N-dimethyl-2,3-bis(9-octadecenyloxy)-1-propanaminium-trifluoroacetat und einem Teil des neutralen Lipids Dioleoylphosphatidylethanolamin bindet DNA. Verbleibende positive Ladungen des DNA/Liposomen-Komplexes werden bevorzugt von negativ geladenen Zelloberflächenmolekülen gebunden, so daß der Lipid/DNA-Komplex durch die Membran geschleust wird. Diese Art der Transfektion bietet gegenüber Calciumpräzipitation, DEAE-Dextran, kationischen Reagenzien und der Elektroporation den Vorteil einer zwischen 5 - 100fach gesteigerten Effizienz bei verminderter Zelltoxizität (Felgner *et al.* 1987).

Für die Transfektion wurden 24 h vor der Transfektion 10⁶ Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät, die unmittelbar vor der Transfektion mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 1200 µl serumfreiem Medium überschichtet wurden.

Ausbildung des Liposomen-DNA-Komplexes:

je 2 µg	Expressionsvektor in 100 µl serumfreiem Medium lösen, vortexen
je 12 µl	<i>Lipofectamin</i> mit 100 µl serumfreiem Medium mischen, vortexen

Beide Lösungen wurden zusammen in einem Eppendorfgefäß gut durchmischt und 20 min bei RT inkubiert; die Lösung wurde anschließend gleichmäßig über dem Zellrasen verteilt. Nach 6 h Inkubation der Zellen unter Standardzellkulturbedingungen wurde der *Lipofectamin*-haltige Mediumüberstand abgezogen und die Zellen wurden für weitere 24 h mit serumhaltigen Medium kultiviert.

Zu Kontrollzwecken wurden zwei zusätzliche Transfektionen durchgeführt. Bei einer Transfektionsreaktion wurde nur der Expressionsvektor ohne zusätzliches Insert verwendet (*mock* Transfektion) und bei einer Negativkontrolle wurde nur das Transfektionsreagenz ohne Vektor-DNA verwendet. Beide Reaktionen dienten zur Kontrolle der Transfektion und der nachfolgenden Selektionsphase.

Für die Doppeltransfektionen (KAT/GPx und KAT/Cu/ZnSOD) wurden die charakterisierten Glutathionperoxidase und Cu/ZnSOD Einzeltransfektanten verwendet und in einem zweiten Transfektionsvorgang mit dem *pcDNA3Zeo-KAT*-Plasmid transfiziert. Als Selektionsantibiotikum diente dabei Zeocin (siehe 2.5.3).

2.5.3 Selektion einzelner Zellklone

Dem Zellkulturmedium wurde 24 h nach der Transfektion das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

<u>Geneticin-Lösung (G418):</u>	<u>Zeocin-Lösung:</u>
Stammlösung: 25 mg/ml in PBS	Stammlösung: 10 mg/ml ddH ₂ O
Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm), Lagerung bei 4 °C, Zusatz zum Zellkulturmedium im Verhältnis 1:100 (Endkonzentration G418: 250 µg/ml, Zeocin: 100 µg/ml)	

Die Negativkontrolle diente zur Überprüfung der Selektionseffizienz. Nur wenn diese Zellen durch den Antibiotikazusatz vollständig abstarben, wurden Zellklone, die sich bei den Vektortransfektionen ausbildeten, für weitere Untersuchungen verwendet. Während des Selektionszeitraums (ca. 14 Tage) wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt und abgelöste Zellen wurden vorsichtig heruntergewaschen. Bis zu 24 einzelne Zellkolonien wurden nach dem vollständigem Absterben der Kontrollzellen auf *24well*-Platten vereinzelt und weiterkultiviert.

Der Zusatz von 250 µg Geneticin/ml bzw. 100 µg Zeocin/ml zum Zellkulturmedium der transfizierten Zellen wurde auch nach Ablauf der Selektionsphase beibehalten und diente der Aufrechterhaltung eines permanenten Selektionsdrucks. Dieser Zusatz schränkte die Vitalität der stabil transfizierten Zellen nicht ein. Das Kulturmedium der Glutathionperoxidase überexprimierenden RINm5F-Zellen wurde zusätzlich noch mit 10 nM Na₂SeO₃ supplementiert, da Selen als Hauptelement des katalytischen Zentrums für die Fertigstellung eines funktionstüchtigen GPx-Moleküls essentiell ist. Die Konzentration von Selen in 10 % FCS-supplementiertem Kulturmedium war für die vollständige Translation der Glutathionperoxidase mRNA-Transkripte zu gering. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit anderen Glutathionperoxidase überexprimierenden Zellsystemen gemacht (Chu *et al.* 1990). Die verwendete Konzentration von 10 nM Na₂SeO₃ schränkte die Vitalität der GPx-Zellen nicht ein (die Vitalität der mit Selen supplementierten Zellen im MTT-Test betrug >95% im Vergleich zu den nicht mit Selen supplementierten Zellen).

2.6 Northern-Blot-Analyse

Die *Northern-Blot*-Analyse als Methode zur Überprüfung der Expression eines Gens auf mRNA-Ebene umfaßt die Auftrennung der RNA-Proben in einem denaturierenden Agarosegel, den Transfer auf eine Membran sowie die Hybridisierung mit spezifischen Gensonden.

2.6.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA nach der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi 1987) wurden konfluent gewachsene RINm5F-Zellen (ca. $1 - 2 \times 10^7/9$ cm Gewebekulturschale) mit PBS gewaschen und noch in der Gewebekulturschale durch Zugabe von 3 ml GTC-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in ein steriles 13 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zu Vergleichszwecken wurde zusätzlich RNA aus Leber und Lunge isoliert. Dafür wurde ca. 500 mg Gewebe in 3 ml GTC-Puffer mit einem Ultraturrax (IKA T25) bei höchster Drehzahl homogenisiert.

GTC-Puffer:

4 M	GTC
0,5 % (v/v)	Natrium-Laurylsarcosin
0,1 M	β -Mercaptoethanol
in 25 mM Natriumcitrat-Lösung (pH 7,0); der Puffer wurde durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 μ m) filtriert und bei RT gelagert.	

Das GTC-Homogenat wurde mit 300 μ l 2 M Natriumacetatlösung (pH 4) angesäuert, mit 3 ml wassergesättigtem Phenol und 600 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (v/v; 49:1) gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Wassergesättigtes Phenol:

Phenol wurde im Wasserbad bei 60 °C geschmolzen und bis zur Sättigung (Ausbildung einer wäßrigen Phase) mit ddH₂O versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zur Phasentrennung wurde die Suspension für 20 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Die RNA-haltige wäßrige Phase wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, für 24 h bei -20 °C mit 3 ml Isopropanol präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation bei 10000 g (4 °C, 20 min) pelletiert. Für einen weiteren Präzipitationsschritt wurde das RNA-Pellet mit 1,5 ml GTC-Puffer gelöst und 1,5 ml Isopropanol versetzt. Das nach 3 h Präzipitation bei -20 °C und anschließender Zentrifugation gewonnene RNA-Pellet wurde zweimal mit 250 μ l Ethanol überspült und nach 10 min Lufttrocknen in ddH₂O gelöst. Ein Aliquot wurde zur photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 2.4.7) weiter in ddH₂O verdünnt, während die restliche RNA bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert wurde.

2.6.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung der RNA

Zur Auftrennung der Gesamt-RNA wurden denaturierende 1 %ige (w/v) MOPS-Agarosegele unter Zusatz von 5 % Formaldehyd hergestellt.

MOPS-Laufpuffer (pH 7,0):

20 mM	MOPS
5 mM	Natriumacetat
1 mM	EDTA

Die Auftrennung der RNA erfolgte mit MOPS-Laufpuffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (*Horizon 11-14*, GIBCO BRL) bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die elektrophoretische Trennung wurde beendet, als die Bromphenolblau-Lauffront das Gelende erreicht hatte (ca. 3 h). Für die Analyse der Genexpression wurden 10 µg RNA pro Bahn geladen. Die jeweiligen RNA Mengen wurden vor dem Auftragen mit 1 Vol. Probenauftrage-Puffer vermischt und 15 min bei 65 °C denaturiert.

Probenauftrage-Puffer:

52 % (v/v)	deionisiertes Formamid
17 % (v/v)	37 %iges Formaldehyd
10 % (v/v)	10x MOPS-Puffer (pH 7,0)
7 % (v/v)	ddH ₂ O
7 % (v/v)	Glycerol
6 % (v/v)	10 %ige wäßrige Bromphenolblau-Lösung
1 % (v/v)	Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml)

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurden die 28 S und 18 S ribosomalen Banden unter UV-Illumination auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Jedes Agarosegel wurde durch Anfertigen einer Polaroid-Fotographie (*Polaroid MP 4+Instant* Kamera System) dokumentiert.

2.6.3 Herstellung *DIG* markierter *antisense* RNA-Sequenzen

Die Markierung der spezifischen *antisense* RNA-Gensonden erfolgte durch *DIG*-11-UTP. In einer an Phagenpromotoren initiierten *in vitro* Transkription wird durch von RNA-Polymerasen digoxigeninmarkiertes Uridintriphosphat (*DIG*-UTP) in die neu synthetisierte *antisense* RNA eingebaut (Melton *et al.* 1984), so daß ca. 4 – 5 % aller eingebauten Nukleotide des RNA-Stranges aus *DIG*-UTP bestehen. Mit Hilfe des nichtradioaktiven *DIG*-Lumineszenz-Nukleinsäure-Detektions-Systems können die markierten Sonden spezifisch detektiert werden. Ein gegen das Hapten-Digoxigenin gerichteter und mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper (*Anti-DIG*-Antikörper) dephosphoryliert das Chemilumineszenzsubstrat *Lumigen CSPD* und bildet so in einem alkalischen Milieu instabilen

Singulett-Sauerstoff. Das während des Zerfalls entstehende Licht, wird durch lichtempfindliche Autoradiographiefilme detektiert.

Die Markierung der *antisense* RNA mit Hilfe des *DIG*-Detektions-Systems zeigt gegenüber anderen Systemen folgende Vorteile:

1. Alle erzeugten *antisense* RNA-Stränge haben durch „*run offs*“ bis zur Restriktionsschnittstelle eine einheitliche, definierte Länge
2. Sie sind einzelsträngig und besitzen daher eine hohe Spezifität gegenüber der zu detektierenden mRNA.

Gegenüber der radioaktiven Markierung hat die *DIG*-Markierung außerdem den Vorteil der längeren Lagerung markierter Nukleotidstränge ohne den Verlust der Detektierbarkeit. Die Sensitivitätsgrenze dieser Markierungsmethode liegt bei 0,03 pg homologer DNA und 0,5 pg homologer RNA. Sie liegt damit im gleichen Sensitivitätsbereich wie radioaktive Verfahren, vermeidet jedoch den Einsatz von Radioaktivität.

Für die Synthese von cRNA-Gensonden mußten die cDNAs der Ratten Cu/ZnSOD, der Ratten Katalase und der Ratten MnSOD aus den Ausgangsvektoren *pUC13-RCS*, *pBR322-PMJ1010* und *pSP65-RMS* in den *pBluescript SK+*-Vektor subkloniert werden, der eine *in vitro* Transkription von RNA erlaubt. Die Subklonierung der cDNA-Sequenzen erfolgte dabei nach den in Kapitel 2.4.1 aufgeführten Bedingungen. Es wurden folgende cDNAs für die Synthese von Gensonden benutzt:

cDNA	Literatur	cDNA (kb)	Restriktions-Schnittstelle	Ausgangsvektor
Ratten Cu/ZnSOD	(Ho & Crapo 1987a)	0,65	<i>EcoRI</i>	<i>pUC13-RCS</i>
Ratten GPx	(Ho <i>et al.</i> 1988)	0,85		<i>pSK+-GPx</i>
Ratten Katalase	(Furuta <i>et al.</i> 1986)	1,2	<i>PstI</i>	<i>pBR322-PMJ1010</i>
Ratten MnSOD	(Ho & Crapo 1987b)	1,4	<i>EcoRI</i>	<i>pSP65-RMS</i>

Tab. 2.2 Übersicht der benutzten Gensonden-Konstrukte

Für die Konstruktion der *antisense*-Gensonden wurden die in der Tabelle angegebenen cDNA-Sequenzen mit den angegebenen Restriktionsenzymen aus dem Ausgangsvektor herausgeschnitten und in den *pBluescript SK+*-Vektor subkloniert. Die Ratten Glutathionperoxidase war bereits in den *pBluescript SK+*-Vektor subkloniert und konnte daher ohne weitere Subklonierungsschritte für die Herstellung der Gensonden verwendet werden.

2.6.3.1 Subklonierung in den *pBluescript SK+*-Vektor

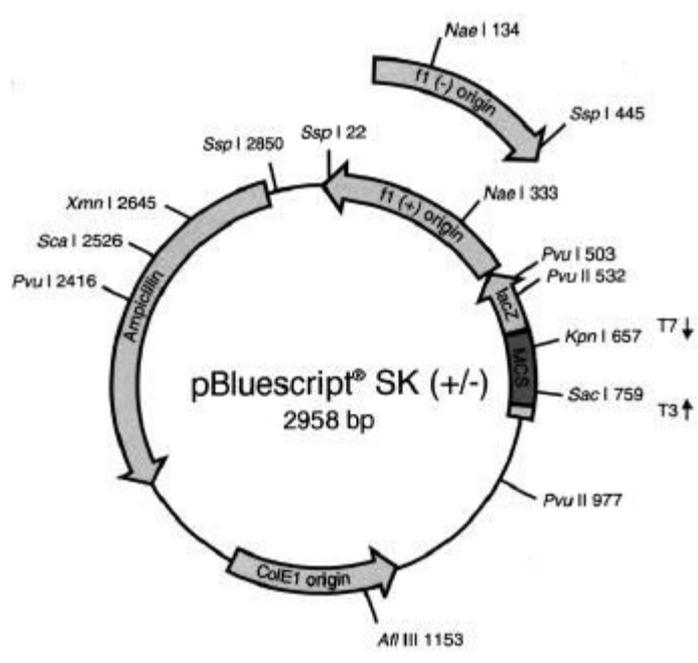


Abb. 2.2 Aufbau des zur *in vitro* Transkription verwendeten *pBluescript SK+*-Klonierungsvektors

Die einzelnen Elemente des Vektors sind durch die Kastenelemente hervorgehoben. Die T7- und T3-RNA-Promotoren beiderseits der *multiple cloning site* (MCS) wurden für die *in vitro*-Transkription verwendet.

Die zu subklonierenden cDNAs wurden durch Restriktionsenzyme aus den Ausgangsvektoren herausgeschnitten.

Herausschneiden der cDNA aus dem Ursprungsvektor:

je 3 µg	Plasmid-DNA
für MnSOD, Cu/ZnSOD:	2,5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer H, 1 µl Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> (10 U/µl)
für Katalase:	2,5 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer H 1 µl Restriktionsenzym <i>PstI</i> (10 U/µl)
mit ddH ₂ O ad 25 µl; Inkubation für bei 2 h bei 37 °C	

10x Restriktionsenzym-Puffer H (pH 7,5): 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 10 mM DTE

Nach dem Restriktionsschnitt erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igem *low melting* DNA-Agarosegel unter Verwendung von TBE-Laufpuffer. Die jeweiligen cDNA-Fragmente wurden in einer *in Gel*-Ligaton in den linearisierten und dephosphorylierten *pBluescript SK+*-Vektor subkloniert (genaue Reaktionsbedingungen siehe 2.4.1). Die Verifizierung der Konstrukte erfolgte zuerst durch Restriktionsschnittanalysen und zuletzt durch Sequenzanalyse unter Verwendung des Universal M13-*Forward* (-40)-Primers (siehe 2.4.5).

2.6.3.2 Plasmid-Linearisierung

Für die Herstellung von spezifischen Digoxigenin (*DIG*) markierten RNA-Gensonden für die *Northern-Blot*-Hybridisierung mußten die Plasmide durch geeignete Restriktionsenzyme linearisiert werden, so daß ein Transkriptionsabbruch am 3'-terminalen Ende der neu synthetisierten *antisense*-cRNA gewährleistet war. Die Transkription nicht-kodierender Plasmidsequenzen konnte so verhindert werden. Die Transkription wurde jeweils von den T3/T7-Phagenpromotoren nach Zusatz der spezifischen RNA-Polymerasen initiiert.

Plasmid-Linearisierung:

je 5 µg	Plasmid
Für MnSOD, Cu/ZnSOD und Katalase:	10 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer H 3 µl Restriktionsenzym <i>XhoI</i> (10 U/µl)
Für Glutathionperoxidase (GPx):	10 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer B 3 µl Restriktionsenzym <i>BamHI</i> (10 U/µl)
mit ddH ₂ O <i>ad</i> 100 µl	

10x Restriktionsenzym-Puffer B (pH 8,0): 100 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Mercaptoethanol

10x Restriktionsenzym-Puffer H (pH 7,5): 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 10 mM DTE

Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch anschließendes Erhitzen auf 95 °C (5 min) abgestoppt. Die Effizienz des Restriktionsverdaus wurde durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots in einem 1 %igen (w/v) TBE-Agarosegel kontrolliert.

2.6.3.3 *In vitro* RNA-Transkription

Die Orientierung der cDNAs in den Vektoren erlaubte die Synthese der *antisense* cRNA unter Verwendung der T3-RNA-Polymerase für die Katalase, MnSOD und Cu/ZnSOD sowie der T7-RNA-Polymerase für die Glutathionperoxidase.

Transkriptionsansatz:

2 µl	10x Transkriptions-Puffer
je 2 µl	ATP, CTP, GTP (jeweils 10 mM)
2 µl	UTP (6,5 mmol/l)-DIG-UTP (3,5 mM)-Lösung
2 µl	T3/7 RNA-Polymerase (20 U/µl)
0,5 µl	Ribonuklease-Inhibitor <i>RNasin</i> (20 U/µl)
1 µg	linearisiertes Plasmid
mit ddH ₂ O <i>ad</i> 20 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß inkubiert, bis die Plasmid-DNA durch Zusatz von 2 µl DNase I (RNase frei, 10 U/µl) 15 min bei 37 °C verdaut wurde. Die so erhaltenen RNA-Stränge wurden durch Ethanolfällung aufgereinigt.

Ethanolfällung:

0,1 Vol.	3 M Natriumacetat (pH 5,2)
2,5 Vol.	Ethanol
4 µl	Hefe t-RNA als Fällungshilfe

Nach gründlicher Durchmischung wurde die cRNA 12 h bei -20 °C gefällt. Die anschließend durch Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C (30 min) pelletierte RNA wurde mit Ethanol vorsichtig gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Die Gensonden wurden bei -70 °C aufbewahrt. Durch Auftrennung eines Aliquots in einem 1 %igen (w/v) RNA-Agarosegel (siehe 2.6.2) wurde die Vollständigkeit der Synthese anhand eines mitlaufenden RNA-Längenstandards überprüft.

2.6.4 Northern-Blot-Transfer

Die im Agarosegel aufgetrennte Gesamt-RNA wurde mit dem Vakuum-*Blotting*-System *VacuGene XL* von Pharmacia auf die amphoter geladene *Hybond N*-Nylonmembran übertragen. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde in die *Blotting*-Apparatur eingesetzt und das Agarosegel wurde luftblasenfrei aufgelegt. Ein durch eine Vakuumpumpe erzeugter Unterdruck von ca. 40 - 50 mbar sorgte für den Transfer der RNA. Während des gesamten *Blotting*-Prozesses von ca. 2 h wurde das Agarosegel mit 20x SSC-Lösung überschichtet.

20x SSC-Lösung (pH 7,0):

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat

Nach Beendigung des Transfervorganges wurde die Membran in 2xSSC-Lösung gewaschen, um eventuell auf der Membran befindliche Agarosepartikel zu entfernen. Die durch den Vakuumsog auf die Membran transferierte RNA wurde für 30 sec durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm auf der Membranoberseite fixiert.

2.6.5 Northern-Blot-Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wurden mit Hilfe der markierten *antisense* RNA-Gensonden die spezifischen mRNAs der zytosolischen Cu/ZnSOD, mitochondrialen MnSOD, zytosolischen Glutathionperoxidase und Katalase detektiert. Der Gesamtvorgang der Hybridisierung kann in die Schritte Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschschritte und Detektion untergliedert werden.

2.6.5.1 Prähybridisierung

Die Membran wurde in einem Folienschlauch nach Zugabe von vorgewärmter Prähybridisierungslösung luftblasenfrei eingeschweißt. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 h bei 68 °C im Schüttelwasserbad.

20x SSPE-Lösung (pH 7,4):

0,2 M	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
4 M	NaCl
0,02 M	EDTA

Die Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

100x Denhardt-Lösung:

2 % (w/v)	Ficoll 400
2 % (w/v)	PVP
2 % (w/v)	BSA

Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm)

Deionisiertes Formamid:

500 ml Formamid wurden für 3 – 4 h mit 50 g Mischbettionenaustauscher (*Serdolit MB 2*, Serva) deionisiert bis ein pH-Wert von < 4 erreicht wurde.

Prähybridisierungslösung:

25 % (v/v)	20x SSPE-Lösung
50 % (v/v)	deionisiertes Formamid
10 % (v/v)	100x Dehnhardt-Lösung
5 % (v/v)	20 %ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung
10 % (v/v)	ddH ₂ O

Zugabe von 250 µl Herings-DNA (10 µg/µl), die zuvor 10 min bei 95 °C denaturiert wurde.

2.6.5.2 Hybridisierung

Die spezifische Gensonde wurde nach erfolgter Prähybridisierung in einer Endkonzentration von 150 ng/ml hinzupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte für 12 h bei 68 °C im Schüttelwasserbad.

2.6.5.3 Waschschrte

Da für eine fehlerfreie Detektion und zum Ausschluß von unspezifischen Fehlhybridisierungen stringente Waschvorgänge erforderlich sind, wurde in den der Hybridisierung folgenden Waschschrten überschüssige Gensonde bzw. unspezifisch gebundene Gensonde entfernt. Die von der Hybridisierungslösung abgetropfte Membran wurde zweimal 15 min in Waschpuffer 1 und anschließend 30 min in Waschpuffer 2 bei 68 °C gewaschen.

Waschpuffer 1:

10 % (v/v)	20x SSPE-Lösung
0,5 % (v/v)	20 %ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung

Waschpuffer 2:

0,5 % (v/v)	20x SSPE-Lösung
0,5 % (v/v)	20 %ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung

2.6.5.4 Detektion

In einem spezifischen Immunoassay wurden die *DIG*-markierten RNA-Hybride unter Verwendung eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-*DIG*-Antikörpers detektiert

und durch Chemilumineszenzreaktion auf einem Autoradiographiefilm sichtbar gemacht. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach dem Waschen erfolgte eine Äquilibrierung der Membran in alkalischem Puffer 3, bevor sie für 30 min zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Puffer 2 inkubiert wurde.

Puffer 1 (pH 7,5):

100 mM	Maleinsäure
150 mM	NaCl

Puffer 2:

Puffer 1 unter Zusatz von 10 % (v/v) Blockierungsreagenz

Puffer 3:

Puffer 1 unter Zusatz von 0,3 % (v/v) Tween 20

Die blockierte Membran wurde für 30 min mit dem in Puffer 2 auf eine Endkonzentration von 0,075 U/ml verdünnten Anti-DIG-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 20 min in Puffer 3 gewaschen, kurz mit Puffer 4 äquilibriert und für 5 min mit 1 ml 1:100 in Puffer 4 verdünnter Lumigen-CSPD-Lösung im Dunkeln inkubiert. Das Dioxetan CSPD ist ein Substrat der alkalischen Phosphatase und wird nach Dephosphorylierung zu einem metastabilen Phenolatanion, das unter Lichtemission (477 nm) zerfällt.

Puffer 4 (pH 9,5):

100 mM	Tris/HCl
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂

Die Membran wurde mit einem *Blotting*-Papier von überschüssiger Flüssigkeit befreit, feucht in Frischhaltefolie eingeschweißt, für 15 min bei 37 °C inkubiert, um dann in einer Filmkassette auf einem Autoradiographiefilm (*Hyperfilm MP*) detektiert zu werden. Die Expositionszeiten von 20 –180 min wurden so gewählt, daß die Filmschwärzungen im linearen Bereich lagen und Überexpositionen so ausgeschlossen waren. Zur Entwicklung der Autoradiogramme wurden die Standardfotochemikalien *LX 24*-Entwickler und *AL 4*-Fixierer von Kodak verwendet.

2.7 *Western-Blot-Analyse*

2.7.1 Herstellung von Gewebeextrakten

Für die Durchführung der *Western-Blot*-Analysen und der Enzymaktivitätsmessungen wurden konfluent gewachsene RINm5F-Zellen (ca. $1 - 2 \times 10^7$) mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 250 μ l Homogenisationspuffer aufgenommen. Durch dreimal 20sekündiges Beschallen mit Ultraschall (Braun *SONIC 125*, 80 W) wurden die auf Eis gekühlten Zellen aufgeschlossen. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich Leber und Lunge homogenisiert. Dafür wurden ca. 500 mg Gewebe in 2 ml Homogenisationsmedium manuell mit einer Schere zerkleinert und in einem Potter mit Teflonpistill (B. Braun, Melsungen) homogenisiert.

Homogenisationsmedium (pH 7,4):

70 mM	Sucrose
210 mM	D-Mannit
1 mM	EGTA
20 mM	HEPES

Zur Abtrennung von Zellkernen, Organellenbruchstücken und nicht vollständig aufgeschlossenen Zellen wurden die Homogenate für 10 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mittels BCA-Methode bestimmt.

2.7.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels BCA-Methode

Der Gesamtproteingehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm mittels BCA-Test bestimmt. Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test reduzieren Proteine in der ersten Teilreaktion Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung zu Cu^+ -Ionen (Biuret Reaktion). Dabei ist die Menge der Cu^+ -Ionen dem Gehalt an Protein direkt proportional. Im zweiten Schritt bildet jeweils ein Cu^+ -Ion mit zwei Bichincholindicarbonsäuremolekülen einen violetten Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Als Standard dienen BSA-Lösungen (in 0,9 %iger NaCl-Lösung) der Konzentrationen 0, 100, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 μ g BSA/ml Lösung. 20 μ l der jeweiligen Standardlösungen wurden mit 200 μ l des BCA-Färbereagens versetzt.

BCA-Färbereagenz:

49 Vol.	BCA-Fertigreagenz
1 Vol.	4 %ige (w/v) CuSO ₄ -Lösung

Von den Gewebeextrakten wurden jeweils 1-5 µl mit 200 µl BCA-Färbereagenz versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Dunkeln wurden die Standard- und Probelösungen als Dreifachwerte in der Mikrotiterplatte im Mikroplattenphotometer (Anthos *ht III*) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Sowohl die BSA-Lösung als auch das Färbereagenz wurde für jede Meßreihe frisch angesetzt. Unter Verwendung der Extinktionen der Standardlösungen wurden die Konzentrationen der Proben berechnet.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinextrakte wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche, vertikale Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente das von Laemmli (1970) beschriebene Tris-Glycin-SDS-Puffersystem. Das 10 %ige (w/v) Polyacrylamid-Trenngel wurde von einem 5 %igen (w/v) Polyacrylamid-Sammelgel überschichtet.

Elektrodenpuffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

10 % (w/v) Polyacrylamid-Trenngel:

1,5 ml	Bisacrylamid 37,5:1
1,2 ml	1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)
1,2 ml	0,5 %ige (w/v) SDS-Lösung
2,1 ml	ddH ₂ O

5 % (w/v) Polyacrylamid-Sammelgel:

248 µl	Bisacrylamid 37,5:1
0,4 ml	0,625 M Tris/HCl (pH 6,8)
0,4 ml	0,5 %ige (w/v) SDS-Lösung
952 µl	ddH ₂ O

Die Polymerisation des 10 %igen (w/v) Polyacrylamid-Trenngels wurde mit 5 µl TEMED und 30 µl 10 %iger (w/v) Ammoniumpersulfatlösung gestartet, die des 5 %igen (w/v) Polyacryl-

amid-Sammelgels mit 2 µl TEMED und 10 µl 10 %iger (w/v) Ammoniumpersulfatlösung. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit 2 ml Butanol überschichtet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit dem DTT- und SDS-haltigen Probenpuffer versetzt, anschließend für 2 min bei 95 °C denaturiert und aufgetragen.

2x Probenpuffer (pH 6,8):

100 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
4 % (w/v)	SDS
20 % (w/v)	Glycerol
2 M	DTT
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm)	

Die Auftrennung erfolgte in einer Minigel-Vertikalelektrophorese-Apparatur (Biometra *Minigel Twin*) bei RT. Die elektrische Spannung wurde, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, bei 20 V gehalten und wurde dann auf 60 V erhöht. Nachdem die Lauffront das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgte durch einen mitlaufenden Molekulargewichtsmarker (10 kDa Protein-Leiter).

2.7.4 Western-Blot-Transfer

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch *Semidry Blotting* (Biorad, *Semidry Blotter*) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems auf eine PVDF-Membran (*Immobilon-P Transfer*) transferiert (Westermeier 1990). Die PVDF-Membran wurde zuvor 1 – 2 min mit Methanol benetzt, anschließend in ddH₂O gewaschen und in Anodenpuffer 2 äquilibriert.

Anodenpuffer 1:

0,3 M	Tris
0,01 % (w/v)	Natriumazid
20 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer 2:

25 mM	Tris
0,01 % (w/v)	Natriumazid
20 % (v/v)	Methanol

Kathodenpuffer:

40 mM	6-Aminohexansäure
0,01 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Natriumazid
20 % (v/v)	Methanol

Der Transfer erfolgte bei 140 mA und 30 V für 1 h. Die Effizienz des Transfers wurde durch 3 minütiges Färben der PVDF-Membran mit Ponceau S-Lösung (10 %ige (v/v) Lösung des Konzentrats) überprüft. Die Positionen der Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden für spätere Vergleiche auf der Membran markiert. Die Membran wurde anschließend vorsichtig mit PBS entfärbt.

2.7.5 Western-Blot-Detektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 1 h bei 37 °C in 20 ml Blockierungsreagenz inkubiert.

Blockierungsreagenz:

5 % (w/v)	Magermilchpulver
0,05 % (v/v)	Tween 20
in PBS Puffer	

Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min in Tween 20-Waschlösung (0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS Puffer) gewaschen. Die anschließende Detektion der auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper (Verdünnung und Inkubationszeitraum siehe Übersicht der verwendeten Antikörper).

<u>Verwendete Antikörper:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>	<u>Verdünnung/Inkubationszeit:</u>
--------------------------------------	-----------------------------	---

Katalase	Rockland, Gilbertsville, USA	1:10000 / 4 h bei RT
Cu/ZnSOD	Dr. M.D. Asayama, Japan	1:10000 / 4 h bei RT
MnSOD	Dr. M.D. Asayama, Japan	1:10000 / 4 h bei RT
Glutathionperoxidase	Dr. M.D. Asayama, Japan	1:10000 / 4 h bei RT
Induzierbare NO-Synthase	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	1:500 / 4 h bei RT

Verdünnungen in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20

Die Membran wurde danach dreimal für 10 min mit der Waschlösung gewaschen und mit einem peroxidase markierten Anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (1:16000 in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20) für 1 h bei RT inkubiert. Mit den Reagenzien des *ECL*-Systems konnte die jeweilige Proteinexpression spezifisch durch Chemilumineszenzdetektion auf einem Autoradiographiefilm (*Hyperfilm MP*) dokumentiert werden. Die Expositionszeiten lagen zwischen 5 sec und 1 min.

2.8 Enzymaktivitätsmessungen

2.8.1 Aufbereitung der Gewebe für die Aktivitätsmessung der zytoprotektiven Enzyme

Für die Aktivitätsmessungen zytoprotektiver Enzyme wurden die RINm5F-Zellen abtrypsinisiert, in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) gewaschen und bei 1000 g anzentrifugiert. Lebergewebe und Pankreasinseln der Ratte wurden in eiskaltem 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) blutleer gewaschen. Im Verhältnis 1:3 wurden die verschiedenen Gewebe in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) aufgenommen und mit einem Potter (B. Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wurde dreimal für 15 sec mit einem Ultraschallgerät (Braun *SONIC 125*) bei 80 W auf Eis beschallt. Das beschallte Homogenat wurde danach in einer Ultrazentrifuge bei 35000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein Eppendorfgesäß überführt und für die Enzymmessungen bei -20 °C gelagert.

0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8):

30,8 ml	1 M K ₂ HPO ₄
19,3 ml	1 M KH ₂ PO ₄
mit ddH ₂ O ad 1000 ml	

Durch exakte Titration mit der 1 M KH₂ PO₄-Lösung wurde der pH-Wert der Lösung eingestellt.

Die der Enzymaktivitätsmessung vorausgehende Proteinbestimmung wurde nach der BCA-Methode durchgeführt (siehe 2.7.2).

2.8.2 Messung der Superoxiddismutaseaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten der Superoxiddismutasen (Oberley & Spitz 1984) beruht auf der Inhibierung der durch Superoxidradikale verursachten Reduktion von NBT zu Formazan. Superoxidradikale werden im Reaktionsansatz durch das Xanthin/Xanthinoxidase-

System generiert. Für die Unterscheidung der MnSOD von der Cu/ZnSOD wurde zusätzlich NaCN als Inhibitor der Cu/ZnSOD verwendet. Anhand einer Eichkurve konnte die Aktivität der Superoxiddismutasen bei 560 nm als Funktion der Zeit bestimmt werden.

Für die Messung der MnSOD / Cu/ZnSOD Enzymaktivitäten wurde folgender Reaktionspuffer verwendet:

SOD-Reaktionspuffer:

1,0 mM	DETAPAC
1,1 U	Katalase
56 µM	NBT
100 µM	Xanthin
50 µM	Bathocuproin Disulfonsäure
0,13 mg/ml	BSA

Dieser Reaktionspuffer wurde zur Messung der Cu/ZnSOD Enzymaktivität verwendet. Für die Messung der MnSOD Enzymaktivität mußte der Reaktionspuffer zusätzlich noch mit NaCN (Endkonzentration 5 mM) versetzt werden.

Der Reaktionspuffer wurde gut durchmischt und konnte in braunen Glasflaschen bei 4 °C bis zu 48 h aufbewahrt werden.

Für die Erstellung einer Eichgeraden wurden je 800 µl des Reaktionspuffers in sechs 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Zu den ersten vier Gefäßen wurden zusätzlich je 100 µl einer 5 ng, 20 ng, 50 ng oder 100 ng enthaltenden reinen SOD-Lösung (in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer) pipettiert. Die beiden anderen Reaktionsansätze waren SOD-frei und wurden mit cyanidhaltigem bzw. cyanidfreiem Kaliumphosphatpuffer versetzt. Die sechs Ansätze wurden dann für 45 min bei 25 °C inkubiert, um dann in 6 Einmalküvetten des Spektralphotometers überführt zu werden. 100 µl der Xanthinoxidaselösung (0,01 U/ml in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer mit 1,34 mM DETAPAC) wurden zu den sechs Küvetten pipettiert, gut durchmischt und die Absorption bei 560 nm als Funktion der Zeit gemessen (UV/VIS Spektrometer *Lambda 12*, Perkin Elmer). Nachdem die Eichkurve auf der oben beschriebenen Weise erstellt wurde, wurden sämtliche Proben in entsprechender Verdünnung mit und ohne Cyanid gemessen. Die Werte der Proben wurden den entsprechenden Werten der Standardkurve zugeordnet, um dann die Menge an SOD zu bestimmen. Die Standardkurve wurde computergestützt durch das Graphikprogramm *GraphPad Prism* erstellt. Eine Unit (U) der Aktivität wurde als die Menge an Protein definiert, die eine halbmaximale Hemmung der Reaktion bewirkte.

2.8.3 Messung der Glutathionperoxidaseaktivität

Die gekoppelte indirekte Messung der Glutathionperoxidaseaktivität basiert auf einer spektralphotometrischen NADPH Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 365 nm (Günzler & Flohe 1985). Bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch die Glutathionperoxidase wird Glutathion oxidiert. Das NADPH wird bei der Reduktion des Glutathions durch die Glutathionreduktase zu NADP oxidiert. Zu Beginn der Messung wurden 700 µl der Reaktionslösung mit 100 µl Probelösung (1:10 Verdünnung in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer) oder Standardlösung versetzt und für 10 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Durch das in der Reaktionslösung enthaltene NaN₃ wurde eventuell in der Lösung enthaltene Katalase inaktiviert.

Reaktionslösung für die Glutathionperoxidaseaktivitätsmessung:

2,4 U/ml	Glutathionreduktase
10 mM	reduziertes Glutathion
1 mM	NaN ₃
1 mM	EDTA
gelöst in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8)	

Danach wurden 100 µl einer 1,5 mM NADPH-Lösung (in 0,1 % (w/v) NaHCO₃) dem Reaktionsmix zupipettiert, gevortext und bei 365 nm der Wasserstoffperoxid-unabhängige Abfall an NADPH gemessen. Wurde eine Abnahme an NADPH beobachtet, so wurde diese für die spätere Auswertung berücksichtigt. Hiernach wurden 100 µl einer 1,5 mM Wasserstoffperoxidlösung dem Reaktionsmix zupipettiert, gut durchmischt und 5 min bei 365 nm gemessen. Durch die Messung des NADPH-Abfalls läßt sich die Aktivität der Glutathionperoxidase und die spezifische Aktivität in U/mg Protein ausrechnen:

$$\text{Aktivität (A)} = 0,868 (\Delta[\text{NADPH}]/[\text{GSH}]_0 \times t)(V_i/V_s)$$

V_i = Volumen des Inkubationsmixes, V_s = Volumen der Enzymprobe

$$\text{U/mg Protein} = \frac{A_{\text{Probe}}}{\frac{A_{\text{Std}}}{\text{mg Protein/ml}}} \times \text{U/ml}_{\text{Std}}$$

A_{Std} = Aktivität des Standards

Die eingesetzte Proteinmenge wurde zuvor nach der BCA-Methode bestimmt.

2.8.4 Messung der Katalaseaktivität

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, den durch Katalase bedingten Konzentrationsabfall einer 19 mM Wasserstoffperoxidlösung photometrisch bei 240 nm zu bestimmen, um dann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten die spezifische Katalaseaktivität zu bestimmen (Claiborne 1985).

Vor jeder Messung wurde die exakte Konzentration der 30 %igen H₂O₂-Stammlösung neu bestimmt. Dies geschah, indem 100 µl der 30 %igen H₂O₂-Stammlösung mit 80 ml ddH₂O verdünnt wurden. Diese Verdünnung wurde in einer Quarzküvette bei 240 nm gegen ddH₂O gemessen. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ und unter Berücksichtigung der Verdünnung ließ sich die Konzentration der 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz genau bestimmen. Ausgehend von der 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung wurde eine 19 mM Wasserstoffperoxidlösung durch Verdünnen mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) hergestellt.

0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0):

30,8 ml	1 M K ₂ HPO ₄
19,3 ml	1 M KH ₂ PO ₄
mit ddH ₂ O <i>ad</i> 1000 ml	

Der pH-Wert wurde durch Titration mit 1 M KH₂PO₄ eingestellt. Die Lösung konnte bis zur Verwendung in braunen Glasflaschen mehrere Stunden kühl gelagert werden.

In das auf 25 °C temperierte Photometer wurden jeweils 1 ml der 19 mM Wasserstoffperoxidlösung in eine Meß- und Referenzküvette aus Quarz pipettiert. Durch die Nullwerteneinstellung am Photometer wurde kontrolliert, ob die Wasserstoffperoxidkonzentration in den beiden Küvetten konstant blieb oder ein Zerfall durch mögliche Verunreinigungen in den Küvetten eintrat. War die Stabilität der 19 mM Wasserstoffperoxidlösung gewährleistet, wurden 1 - 10 µl aus den aufgetauten 35000 g Zellüberständen in die Meßküvette pipettiert und gut durchmischt. Die Messung wurde gestartet und der Verlauf der Reaktion verfolgt. Aus dem linearen Abfall der Wasserstoffperoxidkonzentration ließ sich die Katalaseaktivität nach folgender Formel in U/mg Protein berechnen.

$$\text{spezifische Katalase Aktivität (U/mg Protein)} = \frac{\Delta A_{\substack{\text{min}^{-1} \\ 240 \text{ nm}}} \times 1000}{43,6 \times \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Reaktionsmix}}}$$

43,6 = molarer Extinktionskoeffizient von Wasserstoffperoxid in M⁻¹ cm⁻¹

2.9 Inkubationsversuche mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren

Die Resistenz der transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber freien Sauerstoffradikalen und NO wurde durch die Inkubation mit verschiedenen Radikal-generierenden Substanzen getestet. Jeweils 50000 transfizierte oder nicht transfizierte RINm5F-Zellen wurden mit 100 μ l Zellkulturmedium pro *well* in *96well*-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen konnten für 18 h an der Gefäßoberfläche anwachsen, bis das Medium abgesaugt und gegen das mit der Testkomponente versetzte Inkubationsmedium ersetzt wurde (Kulturvolumen 100 μ l). Alle Inkubationen erfolgten bei 37 °C. Als Testsubstanzen wurden jeweils mehrere unterschiedliche chemische Verbindungen verwendet, deren B-Zell-Toxizität in anderen Studien untersucht wurde (Eizirik *et al.* 1996a; Kröncke *et al.* 1993). Gleichzeitig unterschieden sich die Verbindungen hinsichtlich ihrer Mechanismen und der Kinetik der Radikalgenerierung (wie in der Diskussion weiter erläutert).

2.9.1 Inkubationsversuche mit Sauerstoffradikal-Generatoren

Wasserstoffperoxid (H₂O₂): Für die Prüfung der Resistenz gegenüber H₂O₂ wurden die Zellen für 2 h mit unterschiedlichen H₂O₂ Konzentrationen in HEPES (20 mM) gepuffertem Krebs-Ringer Bicarbonat Medium mit 5 mM Glucose inkubiert (Konzentrationsbereich von 0 bis 10000 μ M). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von H₂O₂ wurde auf eine Verlängerung der Versuchszeit wie bei den anderen Sauerstoffradikal-Generatoren verzichtet.

Im Anschluß an die Inkubation wurde die Inkubationslösung entfernt und es erfolgte eine weitere Inkubation der RINm5F-Zellen für 18 h mit RPMI-1640 Zellkulturmedium, bevor der MTT-Test durchgeführt wurde.

Krebs-Ringer Stammlösung (10x konzentriert):

1,15 M	NaCl
47 mM	KCl
25,6 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
12 mM	KH ₂ PO ₄
12 mM	MgSO ₄ · 7H ₂ O

5 mM glucosehaltiges Krebs-Ringer Bicarbonat/HEPES Medium:

20 mM	HEPES
20 mM	NaHCO ₃
5 mM	Glucose
10% (v/v)	10x KRB-Stammlösung

mit ddH₂O *ad* 100 ml, Einstellung des pH-Wertes mit 2 N NaOH auf 7,4, Zugabe von 0,1 % (w/v) BSA und anschließende Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm), Lagerung bei 4 °C bis zu einer Woche.

Hypoxanthin/Xanthinoxidase (HX/XO): RINm5F-Zellen wurden für 18 h in 10 % FCS-haltigem RPMI-1640 Medium mit einem Reaktionsgemisch aus HX und XO inkubiert (Konzentrationsbereich der Xanthinoxidase von 0 bis 6 mU/ml). Das Verhältnis zwischen Xanthinoxidase und dem Substrat Hypoxanthin wurde konstant bei 1 mU XO/0,05 mM HX gehalten, so daß die Reaktion ohne Substratmangel ablaufen konnte (Halliwell & Gutteridge 1995). Aufgrund der langen Inkubationszeit von 18 h konnte nur 10 % FCS-haltiges RPMI-1640 Medium verwendet werden.

Menadion (2-Methyl-1,4-naphtholquinon): RINm5F-Zellen wurden für 18 h in 10 % FCS-haltigem RPMI-1640 Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Menadion inkubiert (Konzentrationsbereich 0 – 50 µM).

N-Butylalloxan: Aufgrund der extrem niedrigen Halbwertszeit von 106 sec für N-Butylalloxan bei pH 7,4 und 37 °C (Munday *et al.* 1993), wurde es als 10 mM Stammlösung in eiskalter 0,05 N HCl-Lösung angesetzt, bevor es in entsprechender Verdünnung direkt zu den Zellen pipettiert wurde (Konzentrationsbereich von 0 – 5 mM). 15 min vor der Inkubation der Zellen wurde das glucosehaltige RPMI-1640 Medium abgesaugt und gegen glucosefreies KRB-Medium (20 mM HEPES), in dem auch die Inkubation erfolgte, getauscht. Der Austausch des glucosehaltigen Mediums gegen glucosefreies Medium war nötig, da Glucose die Zytotoxizität von Alloxan und seinen Derivaten reduziert bzw. ganz verhindert (Lenzen & Panten 1988). Nach 2 h wurde die N-Butylalloxan-haltige Testlösung abgezogen und es erfolgte eine 18stündige Folgeinkubation in RPMI-1640 Medium.

2.9.2 Inkubationsversuche mit NO-Generatoren

SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin): RINm5F-Zellen wurden für 18 h in 10 % FCS-haltigem RPMI-1640 Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an SNAP inkubiert (Konzentrationsbereich 0 – 1,6 mM).

Natriumnitroprussid (Natriumpentacyanonitrosylferrat (II)): RINm5F-Zellen wurden wie bei SNAP für 18 h in RPMI-1640 Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Natriumnitroprussid Konzentrationen inkubiert (Konzentrationsbereich 0 – 2,0 mM). Zusätzlich wurde das Medium mit Natriumthiosulfat (5 mM) und Rhodanese (80 U/ml) versetzt, um das freigesetzte Cyanid während des Natriumnitroprussidzerfalls zu inaktivieren (Fehsel *et al.* 1993).

SIN-1 (3-Morpholinocydonimin): RINm5F-Zellen wurden für 2 h in KRB-Medium (20 mM HEPES) mit unterschiedlichen Konzentrationen an SIN-1 inkubiert (Konzentrationsbereich 0 – 3,5 mM).

DETA/NO ((Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1,1,2-diolat) und SPER/NO ((Z)-1-[N-[3-Aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]amino]-diazene-1,1,2-diolat): RINm5F-Zellen wurden für 18 h in 10 % FCS-haltigem RPMI-1640 Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an DETA/NO oder SPER/NO inkubiert (Konzentrationsbereich DETA/NO: 0 – 5 mM, SPER/NO: 0 – 0,1 mM).

2.9.3 Exogener Schutz zytoprotektiver Enzyme gegenüber Sauerstoffradikal- oder NO-Generatoren

In zusätzlichen Inkubationsversuchen sollte der Ort der Radikalgenerierung (intrazellulär/extrazellulär) durch Zugabe von zytoprotektiven Enzymen zum Inkubationsmedium aufgeklärt werden. Dafür wurden nicht transfizierte RINm5-Zellen mit den Sauerstoffradikal-generierenden Substanzen H₂O₂ (100 µM), Xanthinoxidase/Hypoxanthin (0.2 mM/ 4 mU/ml), Menadion (20 mM), N-Butylalloxan (5 mM) oder den NO-generierenden Substanzen SNAP (1,6 mM), Natriumnitroprussid (1,6 mM, zusätzlich 5 mM Natriumthiosulfat und 80 U/ml Rhodanese), SIN-1 (3,5 mM), DETA/NO (5 mM) oder SPER/NO (0,75 mM) inkubiert. Zusätzlich zu den Testsubstanzen wurde dem Kulturvolumen 6 U Cu/ZnSOD und/oder 0,6 U Katalase zugesetzt. Kontrollexperimente mit abgekochten Enzymlösungen wurden parallel dazu durchgeführt (die Inaktivierung wurde durch Messung der Enzymaktivitäten bestätigt).

2.9.4 Koinkubation von Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren

Für die Untersuchung einer überadditiven Schädigung durch die gleichzeitige Einwirkung von Sauerstoffradikalen und NO auf RINm5F-Zellen wurden nicht transfizierte RINm5F-Zellen mit einer nur schwach toxischen Konzentration von SIN-1 (1 mM) oder SNAP (0.4 mM) und gleichzeitig mit einer ebenfalls sublytischen Konzentration H₂O₂ (40 µM) oder Hypoxanthin/Xanthinoxidase (50 µM/1 mU) für 18 h inkubiert.

2.10 MTT-Vitalitätstest

Für die Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der verwendeten Radikal-Generatoren wurde der von Mosmann (1983) beschriebene MTT-Test benutzt. Dieser Vitalitätstest beruht auf der Aktivitätsmessung mitochondrialer Dehydrogenasen. Dabei wird der Tetrazoliumring des schwach gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromids (MTT) durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen. Der entstehende dunkelblaue Formazanfarbstoff ist in wässriger Lösung unlöslich und lagert sich daher in den Zellen ab. Durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels (DMSO) können sowohl die Zellen lysiert als auch das Formazan in Lösung gebracht werden. Die Intensität dieser Lösung kann spektralphotometrisch ausgewertet werden. Eine geringe Farbintensität entspricht einer geringen Anzahl intakter Mitochondrien. Unterschiede in der Extinktion können sowohl durch unterschiedliche Zellproliferationsraten oder Zellzahlen als auch durch eine Schädigung der Zelle mit der damit verbundenen Funktionsbeeinträchtigung des Mitochondriums verursacht werden. Die Durchführung des MTT-Tests erfolgte nach Inkubation mit der Testsubstanz in der *96well*-Zellkulturplatte. Wurden RINm5F-Zellen nur 2 h mit der Testsubstanz inkubiert, schloß sich eine 16stündige Inkubationszeit in RPMI-1640 Medium an.

MTT-Stammlösung (10x konzentriert):

50 mg MTT in 10 ml PBS lösen, Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm), Lagerung bei 4 °C

Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 100 µl MTT-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die MTT-Stammlösung wurde unmittelbar vor Durchführung des MTT-Tests im Verhältnis 1:10 mit glucosehaltigem KRB-Medium verdünnt. Die Inkubation wurde nach Erreichen einer ausreichenden MTT-Färbung unterbrochen und die MTT-Lösung vollständig entfernt. Die Zellen wurden anschließend durch 100 µl DMSO lysiert, was auch das Lösen des MTT-Präzipitats bewirkte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) im Mikroplattenphotometer (Anthos *ht III*). Die Berechnungen der Vitalität bezogen sich jeweils auf unbehandelte Zellen und wurden versuchsintern als 100% gesetzt.

2.11 Inkubationsversuche mit Zytokinen

Im Gegensatz zu den chemischen Radikal-Generatoren besitzen Zytokine keine akut toxische Wirkung, sondern ihre zelltoxische Wirkung beruht auf spezifischen Signaltransduktionswegen. Innerhalb dieser Signalkaskaden sind unterschiedliche Aktivierungsschritte notwendig (z.B. Phosphorylierungen, Transkribierungen oder Translationen), so daß Zytokin-medierte Zellschädigungen nur nach längeren Inkubationszeiträumen zu beobachten sind.

2.11.1 Zytotoxizitätstest nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Für die 72stündige Inkubation mit Zytokinen wurden 24 h vor Inkubationsbeginn 6000 RINm5F-Zellen/well auf einer 96well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Inkubation erfolgte mit humanem Interleukin 1- β (IL-1 β), humanem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Ratten Interferon- γ (IFN- γ) in 120 μ l Kulturvolumen. Für die durchgeführten Versuche wurde entweder nur IL-1 β (60, 300 oder 600 U/ml) oder eine Mischung aller drei Zytokine (60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α , 14 U/ml IFN- γ) verwendet (TNF- α und IFN- γ potenzieren die schädigende Wirkung von IL-1 β (Cetkovic Cvrnje & Eizirik 1994)). Nach 72 h Inkubation wurde der Medienüberstand für die Nitrit-Messung entfernt (siehe 2.11.3) und der sich anschließende MTT-Vitalitätstest wurde wie unter 2.10 beschrieben durchgeführt.

Die Spezifität der durch Zytokine medierten Zellschädigungen durch die Induktion der iNOS und die dadurch ermöglichte Produktion von NO wurde in einem weiteren Inkubations-experiment untersucht. Dafür enthielt das mit Zytokinen versetzte Inkubationsmedium zusätzlich 5 mM N ω -Nitro-L-Arginin, einen spezifischen Inhibitor der NO-Synthasen.

2.11.2 Western-Blot-Analysen der induzierbaren NO-Synthase nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Zur Untersuchung der iNOS-Induktion, einem zentralen Ereignis der durch Zytokine medierten B-Zellzerstörung (Eizirik *et al.* 1996b), wurden $3,5 \times 10^5$ RINm5F-Zellen in einer 3,5 cm Zellkulturschale ausgesät und für 6 h mit unterschiedlich konzentrierten Interleukin-1 β Lösungen (2,2 ml Volumen) inkubiert. Die Zellen wurden am Ende der Inkubation gesammelt und wie in den Abschnitten 2.7.1 bis 2.7.5 beschrieben für die *Western-Blot*-Analysen aufgearbeitet.

2.11.3 Bestimmung des akkumulierten Nitrits nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Die Effizienz der iNOS-Induktion und die aus ihr resultierende NO-Produktion wurde durch Messung des akkumulierten Nitrits (NO_2^-) nach Ablauf der 72 h Inkubation nachgewiesen. NO reagiert in wässriger Lösung und in Anwesenheit von Sauerstoff zu NO_2^- und Nitrat (NO_3^-). Obwohl mit der Messung des akkumulierten Nitrits das entstandene NO nicht vollständig erfaßt wird, so bietet die NO_2^- -Messung bei gleichen Inkubationsbedingungen einen geeigneten Parameter für die Bildung von NO. Für die Messungen wurden 50 μl Medienüberstand mit einem gleichen Volumenanteil Griess-Reagenz (1 Vol. einer 0,1 %igen N-(1-Naphthyl) ethyldiamindihydrochloridlösung und 1 Vol. einer in 0,1 M HCl angesetzter 1%igen Sulfanilamidlösung) für 10 min bei RT in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Als Standard wurde eine Natriumnitrit-Lösung verwendet (Konzentrationsbereich 0 – 0,6 μM). Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm im Mikroplattenphotometer (Anthos *ht III*).

2.11.4 Messung der Zellproliferationsrate nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Mit Hilfe des MTT-Tests ist es nicht möglich, zwischen Zellschädigung und nachfolgendem Zelltod oder Inhibierung der Proliferationsrate zu unterscheiden. Durch Messung des Einbaus von markierten Nukleotiden kann hingegen spezifisch die Proliferationsrate einer Zellpopulation quantifiziert werden. Der verwendete *Cell Proliferation ELISA System* beruht auf dem Einbau von 5-Brom-2'-Deoxyuridin und dessen Detektion mittels eines monoklonalen Antikörpers in einem sich anschließenden *ELISA*.

Für den Versuch wurden 6000 RINm5F-Zellen/*well* in einer 96well-Zellkulturplatte ausgesät und 24 h später mit dem Zytokingemisch inkubiert (120 μl Kulturvolumen). Zum Inkubationsstartpunkt, nach 24 h, 48 h oder 72 h Inkubation, wurde jeweils die Proliferationsrate bestimmt. Dafür wurden 10 μl *BrdU-Labeling* Lösung (10 μM BrdU in RPMI-1640 Medium) zu dem Inkubationsmedium pipettiert und für 2 h inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in den *wells* mit 200 μl *FixDenat* für 30 min bei RT fixiert. Es folgte das Detektieren des BrdUs durch Inkubation mit einem Peroxidase markierten monoklonalen Anti-BrdU-Antikörper (90 min bei RT), das Entfernen von unspezifisch gebundenem Antikörper durch dreimaliges Waschen und die abschließende Peroxidase-Substratreaktion mit Auslösen der kolorimetrischen Farbreaktion. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 340 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) im Mikroplattenphotometer (Anthos *ht III*).

2.11.5 Kernfärbung zur Unterscheidung von vitalen, nekrotischen und apoptotischen RINm5F-Zellen nach Inkubation mit Zytokinen

10^5 RINm5F-Zellen wurden auf Glasdeckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mit 2 ml Zytokin-haltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Zu Beginn der Inkubation sowie nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die im Überstand und auf der Glasoberfläche befindlichen Zellen mit einem Gemisch aus Propidiumjodid (20 μ g PI/ml in PBS) und HOE33342 (250 μ M in PBS) angefärbt. Durch diese Differentialfärbung konnte eine Unterscheidung in nekrotische (rote Anfärbung des Zytoplasmas durch PI), apoptotische (blaue Kernfärbung durch HOE33342 bei gleichzeitiger Kondensation des Kernchromatins) und vitale Zellen (blaue Kernfärbung durch HOE33342, bei unbeeinträchtigter Kernmorphologie) getroffen werden (Delaney *et al.* 1997). Die Auszählung folgte am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung spezifischer Filtersätze.

2.12 Analyse von DNA-Protein-Wechselwirkungen

Eine Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit spezifischen DNA-Bindungssequenzen kann durch den *electrophoretic mobility shift assay (EMSA)* dargestellt werden. Dafür werden zelluläre Extrakte (zur Steigerung der Spezifität meistens Kernextrakte) mit radioaktiv endmarkierten spezifischen Oligonukleotiden inkubiert und in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Vorhandensein von DNA-bindenden Proteinen wird durch eine Retardierung des Protein-DNA-Komplexes im Vergleich zu Oligonukleotiden angezeigt. Untersucht wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch H_2O_2 oder IL-1 β . Benutzt wurde hierfür das *Gel Shift Assay System* von Promega.

Präparation von Kernextrakten: $15 \times 10^6 - 25 \times 10^6$ RINm5F-Zellen (ca. 1 - 2 vollbewachsenen 10 cm Gewebekulturschalen) wurden für einen Zeitraum von 5 – 15 min mit 50 μ M H_2O_2 oder 60 U/ml IL-1 β in glucosehaltigem KRB-Medium inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit eiskaltem PBS abgeschabt und 5 min bei 750 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 μ l hypoosmotischem Puffer A aufgenommen und kurz gevortext.

Puffer A:

10 mM	HEPES-KOH (pH 7,9)
1,5 mM	MgCl ₂
10 mM	KCl
0,5 mM	DTT
0,2 mM	PMSF
0,5 % (v/v)	NP-40

Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurde erneut gevortext und durch 20 sec Zentrifugation bei 10000 g wurden die Zellkerne pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 2 Vol. (50 - 100 µl) eiskaltem Puffer B, in dem die Zellkerne unter gelegentlichem Schütteln 20 min auf Eis inkubiert wurden.

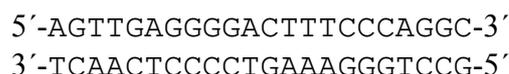
Puffer B:

20 mM	HEPES-KOH (pH 7,9)
1,5 mM	MgCl ₂
420 mM	NaCl
0,2 mM	DTT
0,2 mM	PMSF
0,2 mM	EDTA
25 % (v/v)	Glycerol

Nicht aufgebrochene Kerne sowie Kernmembranen wurden durch 2 min Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g von den im Überstand enthaltenen nukleären Proteinen abgetrennt. Die Kernextrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung in 10 µl Aliquots bei -70 °C gelagert. Die Konzentration der Kernextrakte wurde mit der BCA-Methode unter Verwendung eines BSA-Standards ermittelt.

Radioaktive Endmarkierung der Oligonukleotide:

Das doppelsträngige Oligonukleotid mit spezifischem NF-κB Bindungsmotiv



wurde mittels T4-Polynukleotidkinase mit [α -³²P]-dATP radioaktiv endmarkiert.

Radioaktive Endmarkierung:

1,75 pmol	NF-κB bindendes Oligonukleotid
1 µl	10x T4-Polynukleotidkinasepuffer
1 µl	[α- ³² P]-dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U)

mit ddH₂O *ad* 10 µl; Inkubation bei 37 °C für 10 min; Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung; Auffüllen des Reaktionsansatzes mit 89 µl TE-Puffer

10x T4-Polynukleotidkinasepuffer: 700 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde durch Gelfiltration mit TE-äquilibrierten *Sephadex-G-25*-Säulen von der nicht inkorporierten Radioaktivität abgetrennt. Pro 1 µl Oligonukleotidlösung wurden ca. 10 – 15x10⁵ *cpm* gemessen.

Gelretardation: Je Reaktionsansatz wurden 0,28 pmol NF-κB bindendes Oligonukleotid mit 250-300 ng Kernproteine für 30 min bei RT inkubiert und anschließend in einem 7%igen nativen Polyacrylamidgel (37,5:1 Acrylamid: Bisacrylamid; 5 mM Tris, pH 8,3; 38 mM Glycerol) aufgetrennt (Vertikalelektrophoresekammer 15x17, GIBCO BRL).

Zusätzlich zu den untersuchten Kernextrakten wurden Positivkontrollen (rekombinantes humanes NF-κB p50 Protein anstelle der Kernextrakte) und Spezifitätskontrollen (1,75 pmol unmarkiertes NF-κB bindendes Oligonukleotid wurde zusätzlich zu dem radioaktiv markierten Oligonukleotid eingesetzt) durchgeführt. Nur die Negativkontrolle wurde mit 10x *Loadingpuffer* (250 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Glycerol) versetzt, um die Stabilität des Protein-DNA-Komplexes nicht zu reduzieren.

Die Auftrennung erfolgte bei konstant 100 V bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreichte. Das getrocknete Gel wurde auf einem Autoradiographiefilm über Nacht bei –70 °C exponiert.

2.13 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte die Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM. Die Signifikanzprüfung der Daten erfolgte durch einen *Student's t*-Test (zweiseitig) sowie bei multiplen Datenvergleichen durch einen einfaktoriellem *ANOVA*-Test, gefolgt vom *Dunnnett's*-Test für multiple Vergleiche. Die EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression nach der Methode des kleinsten Fehlerquadrates berechnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem *GraphPadPrism* Programm (Graph Pad Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Für das Gleichgewicht zwischen Zellschädigung durch freie Radikale auf der einen und Schutz- bzw. Reparaturmechanismen der Zelle auf der anderen Seite spielen zytoprotektive Enzyme eine entscheidende Rolle. Dies gilt insbesondere für die Zerstörung der B-Zellen des Pankreas im Autoimmundiabetes. Es ist bekannt, daß reaktive Sauerstoffspezies und NO von Makrophagen während der entzündlichen Infiltration der Pankreasinsel freigesetzt werden oder als Folge einer Zytokinstimulation in den B-Zellen gebildet werden (Rabinovitch *et al.* 1996; Suarez Pinzon *et al.* 1994). Die Charakterisierung der zytoprotektiven Enzyme in insulinproduzierenden Zellen im Vergleich zu anderen Organen auf der Ebene der mRNA-Expression, der Enzym-Proteinexpression sowie der Aktivitätsmessungen hat gezeigt, daß B-Zellen des Pankreas einerseits eine sehr geringe Expression zytoprotektiver Enzyme aufweisen und andererseits die Ratio zwischen Superoxid- und Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen stark zugunsten der Superoxiddismutasen verschoben ist (Tiedge *et al.* 1997).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die RINm5F-Insulinomazelllinie als Zellmodell für die Überexpression zytoprotektiver Enzyme gewählt, da die klassischen Befunde zur Pathogenese des Typ I Diabetes mellitus insbesondere an Nagern erstellt wurden und das Expressionsmuster zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen den Zustand nativer pankreatischer Ratten B-Zellen gut widerspiegelt.

3.1 Charakterisierung zytoprotektiver Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen

Die Charakterisierung der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in der RINm5F-Zelllinie erfolgte auf mRNA- und Proteinebene und durch Messung der Enzymaktivitäten. Die Untersuchungen wurden im Vergleich zu den besonders gut zytoprotektiv geschützten Geweben Leber und Lunge durchgeführt.

3.1.1 Northern-Blot-Analysen der zytoprotektiven Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen

Es war das Ziel der Versuche, die Überexpression der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase sowie die Expression der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD (zytosolische Lokalisation) und MnSOD (mitochondriale Lokalisation) in transfizierten RINm5F-Zellen auf Ebene der mRNA zu bestimmen. Die mRNA stellt die unterste Stufe im Transkriptions- und Translationsprozeß dar und wurde in der Selektion der Zellklone als erstes Kriterium untersucht. Die *Northern-Blot*-Analysen wurden

mit spezifischen *antisense* cRNA-Gensonden durchgeführt, wobei zu Referenzzwecken Leber- und Lungengewebe mituntersucht wurde. Die zytoprotektive Enzymausstattung dieser Organe kann als sehr gut betrachtet werden, so daß diese Gewebe als Positivkontrollen der durchgeführten Untersuchungen dienen.

3.1.1.1 *Northern-Blot-Analysen der Überexpression der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase in RINm5F-Zellen*

Der Inaktivierung von H_2O_2 , das intrazellulär durch Redoxprozesse und aus der Superoxid-dismutation entsteht, kommt eine entscheidende Bedeutung für die Protektion der Zelle zu. Die Reaktivität von H_2O_2 mit Zellbestandteilen und seine dadurch bedingte schädigende Wirkung ist relativ gering. Durch die Teilnahme von H_2O_2 an der Fenton-Reaktion, die zur Bildung stark toxischer Hydroxylradikale führt, durch seine für andere reaktive Sauerstoffspezies lange Halbwertszeit und durch seine Membrangängigkeit wirkt sich die intrazelluläre Akkumulation von H_2O_2 aber stark toxisch aus. Zur Beseitigung von H_2O_2 stehen der Zelle zwei unabhängige Enzymssysteme zur Verfügung: Die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase und die Glutathionperoxidasen (zytosolische und membranständige Isoform).

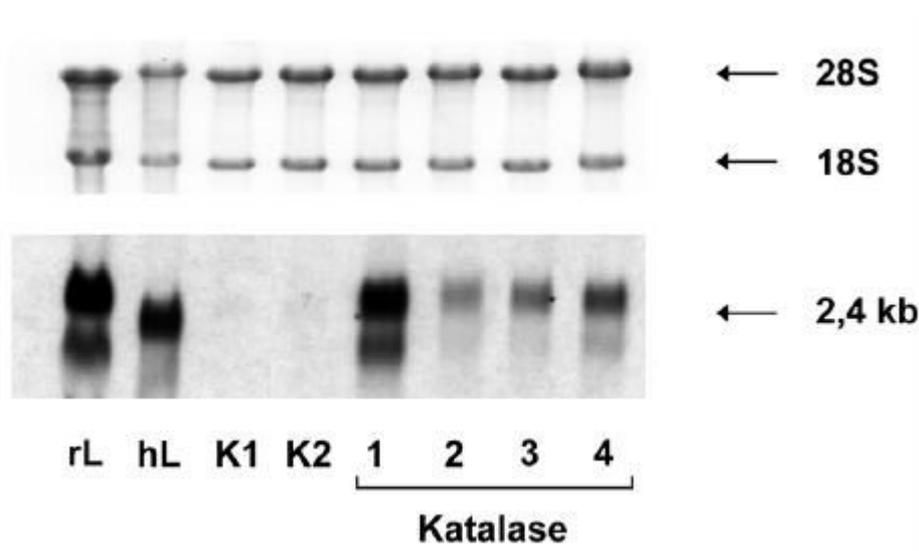


Abb. 3.1: *Northern-Blot-Analyse der Katalase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber der Ratte und des Menschen*

rL = Rattenleber, hL = humane Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-Katalase-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden $10 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer spezifischen *antisense* cRNA-Gensonde, die für die Katalase kodierte, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S ribosomalen Banden des Agarosegels zeigen die gleichmäßige Beladung des Gels. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Durch die Transfektion der RINm5F-Zellen mit der für die menschliche Katalase kodierenden cDNA konnte die Expression der Katalase stark erhöht werden. Während nicht transfizierte RINm5F-Zellen eine an der Nachweisgrenze liegende Katalase-Expression zeigten, wiesen die transfizierten RINm5F-Zellen in den *Northern-Blot*-Untersuchungen eine dem Lebergewebe entsprechende Expressionsstärke auf. Die detektierte Transkriptlänge betrug 2,4 kb. Durch die benutzten Vektorkonstrukte ergab sich bei der Überexpression eine geringe Vergrößerung der Transkriptlänge um ca. 300 bp, die der im Expressionsvektor vorhandenen Polyadenylierungssequenz entspricht. Der Nachweis von zwei unterschiedlich großen Transkripten läßt auf ein nicht vollständiges Spleißen dieser Sequenz schließen. Die zu Kontrollzwecken mit dem pcDNA3-Expressionsvektor ohne cDNA transfizierten Zellen (Abb. 3.1, K2) wiesen hingegen das unverändert niedrige Expressionsniveau der unbehandelten RINm5F-Zellen auf.

Neben der in den Peroxisomen lokalisierten Katalase sind die Glutathionperoxidasen an der Wasserstoffperoxidinaktivierung beteiligt. Es werden zwei Arten von Glutathionperoxidasen unterschieden, die zytosolische Glutathionperoxidase (GPx) und die membrangebundene Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PGPx). Innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich die zytosolische Isoform untersucht und zur Überexpression gebracht. Die zytosolische Glutathionperoxidase wird in der Ratte als singuläre 1,2 kb mRNA-Spezies exprimiert.

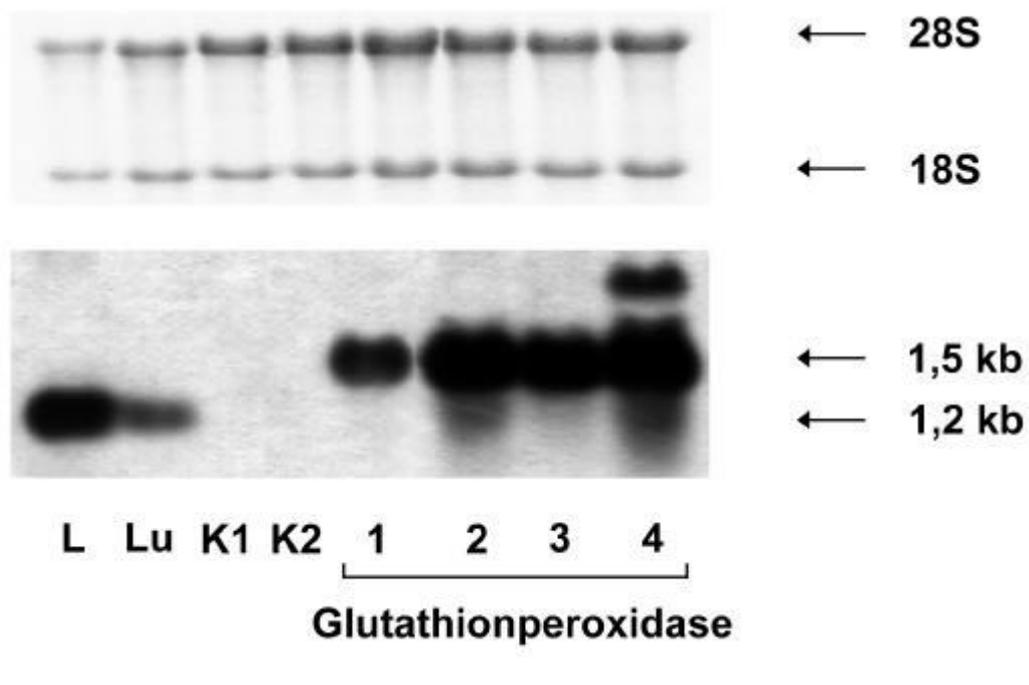


Abb. 3.2: *Northern-Blot*-Analyse der Glutathionperoxidase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber und Lunge der Ratte

L = Leber, Lu = Lunge, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-GPx-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Gesamt-RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer spezifischen *antisense* cRNA-Gensonde, die für die Glutathionperoxidase kodierte, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S ribosomalen Banden des Agarosegels zeigen die gleichmäßige Beladung des Gels. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Aufgrund der sehr geringen Genexpressionsrate der Glutathionperoxidase in RINm5F-Zellen konnten in unbehandelten Zellen mit der angewendeten *Northern-Blot*-Methode keine mRNA-Transkripte detektiert werden. Im Vergleich dazu wurde bei den am stärksten exprimierenden Zellklonen (Abb. 3.2, K2 und K4) eine Überexpression erreicht, deren Expression höher war als die der Leber. Während in den Referenzgeweben Leber und Lunge ein Transkript von 1,2 kb nachweisbar war, betrug die mRNA-Transkriptlänge aufgrund der aus dem pcDNA3-Expressionsvektor stammenden zusätzlichen Polyadenylierungssequenz ca. 1,5 kb.

3.1.1.2 *Northern-Blot*-Analysen der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD und MnSOD in transfizierten RINm5F-Zellen

Trotz ihrer identischen katalytischen Funktion zeigen die Superoxiddismutase-Isoenzyme lediglich eine geringe Homologie in ihrer Genstruktur, so daß von ontogenetisch differenten Enzymproteinen auszugehen ist (Halliwell & Gutteridge 1995).

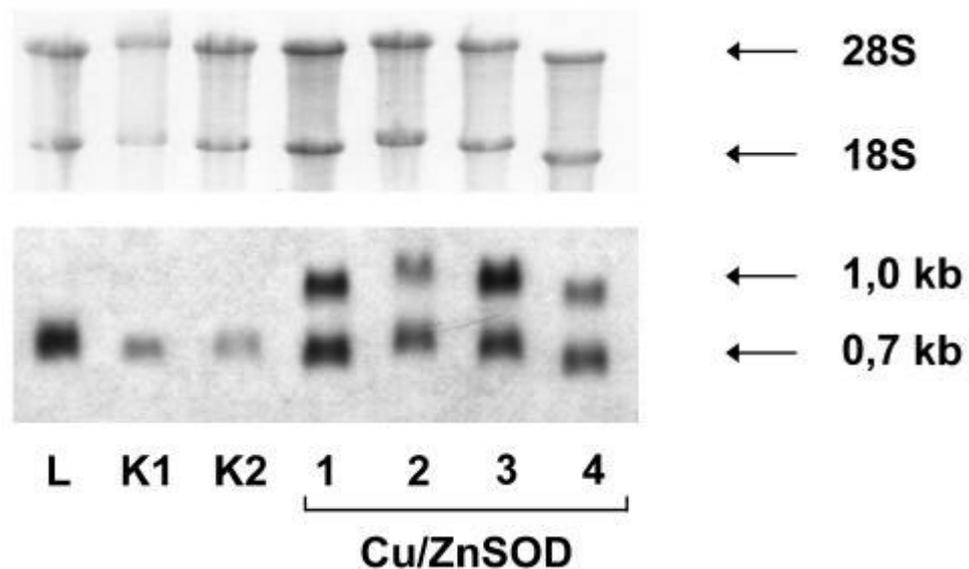


Abb. 3.3: *Northern-Blot-Analyse der Cu/ZnSOD-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber der Ratte*

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-Cu/ZnSOD-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Gesamt-RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer spezifischen *antisense* cRNA-Gensonde, die für die Cu/ZnSOD kodierte, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S ribosomalen Banden des Agarosegels zeigen die gleichmäßige Beladung des Gels. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Im Gegensatz zu den Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen Katalase und GPx konnte die zytosolische Cu/ZnSOD Genexpression in Kontroll-RINm5F-Zellen deutlich detektiert werden. Durch die Transfektion der RINm5F-Zellen mit der im pcDNA3-Expressionsvektor subklonierten Ratten Cu/ZnSOD kodierenden cDNA konnte das Expressionsniveau der RINm5F-Zellen deutlich erhöht werden, so daß die Expressionsstärke der Leber erreicht wurde. In allen untersuchten Zellklonen waren zwei unterschiedliche mRNA-Banden detektierbar: Neben der auch in Leber und nicht transfizierten RINm5F-Zellen detektierbaren 0,7 kb Bande konnte zusätzlich eine ca. 1 kb große zweite Transkriptbande detektiert werden. Auch hier ist die größere zweite Bande durch das Anhängen einer zusätzlichen Polyadenylierungssequenz zu erklären. Die Cu/ZnSOD Genexpression der mit dem pcDNA3-Expressionsvektor ohne cDNA transfizierten Zellen blieb unverändert (Abb. 3.3, K2).

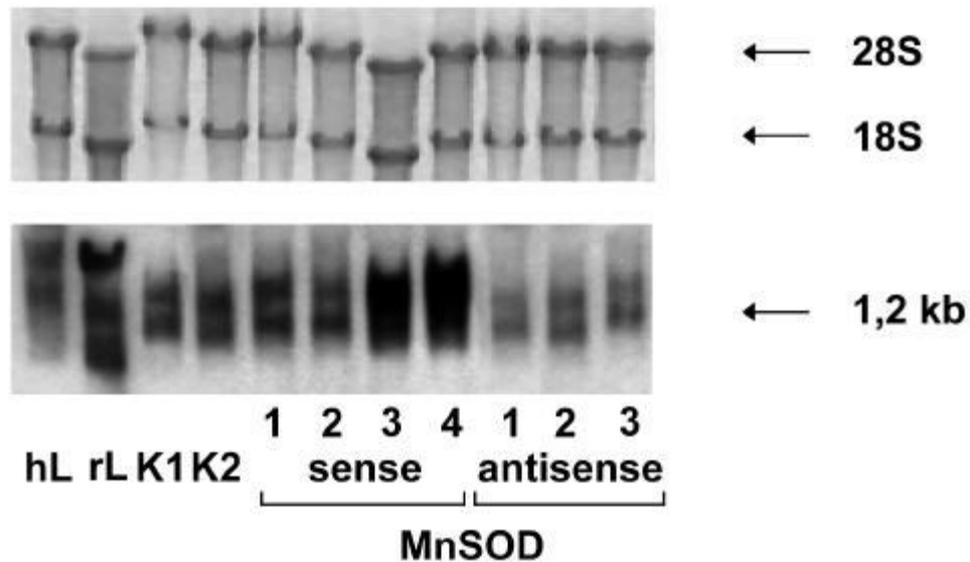


Abb. 3.4: *Northern-Blot*-Analyse der MnSOD von transfizierten RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber des Menschen und der Ratte

hL = humane Leber, rL = Rattenleber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 *sense* = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-MnSOD *sense*-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone, 1-3 *antisense* = 3 unterschiedliche mit dem pcDNA3-MnSOD *antisense*-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Gesamt-RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer spezifischen *antisense* cRNA-Gensonde, die für die MnSOD kodierte, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S ribosomalen Banden des Agarosegels zeigen die gleichmäßige Beladung des Gels. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Genexpression der MnSOD konnte sowohl in der Leber der Ratte als auch in nicht transfizierten RINm5F-Zellen als 1,2 kb Transkript detektiert werden. Die MnSOD überexprimierenden RINm5F-Zellen zeigten eine Bande, die entsprechend der kürzeren mRNA-Länge der humanen MnSOD von ca. 830 bp nur eine Größe von 1,1 kb aufwies (Abb. 3.1, MnSOD *sense* 1 – 4). Durch umgekehrte Subklonierung der humanen MnSOD-cDNA in den Expressionsvektor war die intrazelluläre Transkription eines *antisense* MnSOD-Konstruktes möglich. Durch Interaktion mit den komplementären mRNA-Transkripten der Zelle kommt es zu einer gesteigerten Degradation dieser Hybrid-Moleküle und schließlich zu einer verminderten Proteinexpression. Durch die Transfektion der RINm5F-Zellen mit einem *antisense* MnSOD-Expressionsvektor konnte die Genexpression der MnSOD deutlich reduziert werden (Abb. 3.1, MnSOD *antisense* 1 – 3).

3.1.2 *Western-Blot-Analysen der Expression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen*

In einem weiteren Charakterisierungsschritt wurde die Proteinexpression der unterschiedlichen zytoprotektiven Enzyme in den transfizierten Zellklonen durch *Western-Blot-Analysen* untersucht. Wie bei den durchgeführten *Northern-Blot*-Untersuchungen wurden ebenfalls die besonders gut zytoprotektiv geschützten Gewebe Leber und Lunge sowie nicht transfizierte RINm5F-Zellen zu Vergleichszwecken mitanalysiert.

3.1.2.1 *Western-Blot-Analysen der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase in transfizierten RINm5F-Zellen*

Das Wasserstoffperoxid-inaktivierende Enzym Katalase wird in allen Organen eukaryotischer Organismen exprimiert. Das katalytisch aktive Enzym Katalase besteht aus vier Untereinheiten, von der jede Untereinheit eine Häm-(Fe(III)-Protoporphyrin) Gruppe in ihrem aktiven Zentrum gebunden hat. Die Katalase wurde in der *Western-Blot-Analyse* mit einem spezifischen Antikörper als 60 kDa Proteinbande nachgewiesen.

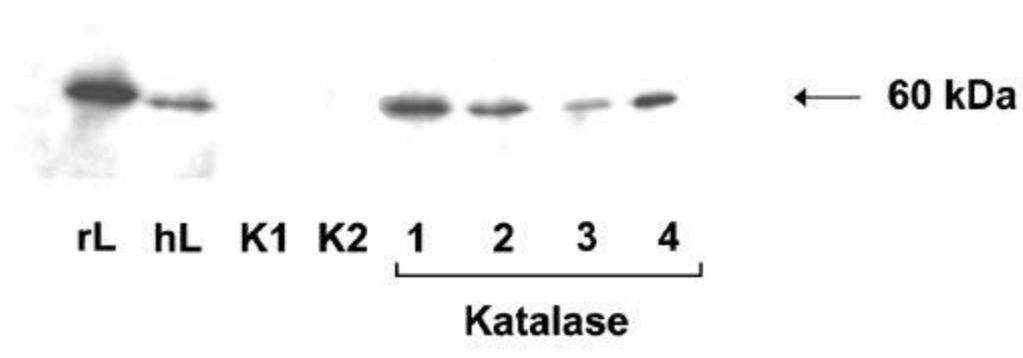


Abb. 3.5: *Western-Blot-Analyse der Katalase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber der Ratte und des Menschen*

rL = Rattenleber, hL = humane Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-Katalase-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen Katalase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Das Katalaseprotein war nach der Transfektion mit dem pcDNA3-Katalase-Expressionsvektor in den überexprimierenden RINm5F-Zellen wie bei den beiden Referenzproben, der humanen Leber und der Rattenleber, deutlich als 60 kDa Bande nachweisbar. Die Expressionsstärke erreichte dabei bei den am stärksten exprimierenden Zellklonen das Niveau der Leber (Abb. 3.5, Katalase 1). Wie bei der durchgeführten *Northern-Blot*-Analyse lag das Expressionsniveau

nicht transfizierter RINm5F-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze und erhöhte sich auch durch Transfektion mit einem pcDNA3-Expressionsvektor allein nicht.

Zusätzlich zu der Katalase inaktiviert die von Mills (1957) entdeckte Glutathionperoxidase Wasserstoffperoxid innerhalb der Zelle. Die zytosolische Glutathionperoxidase ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, von der jede Selen im aktiven Zentrum enthält. Durch Detektion mit einem spezifischen Antikörper konnte die Glutathionperoxidase in der *Western-Blot*-Analyse als 23 kDa Bande nachgewiesen werden.

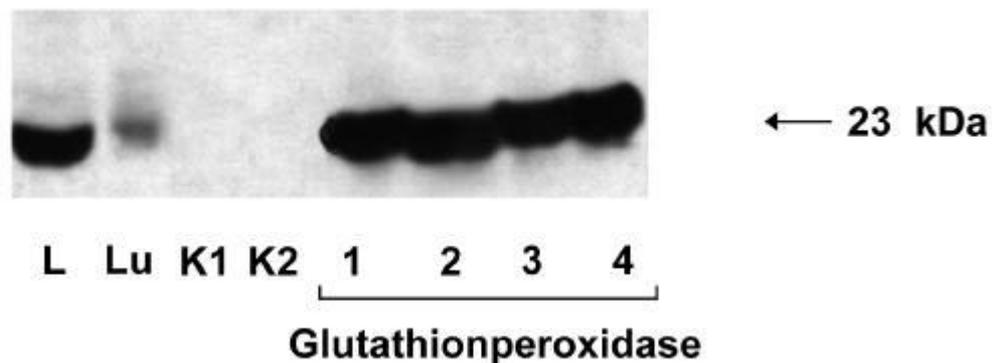


Abb. 3.6: *Western-Blot*-Analyse der Glutathionperoxidase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber und Lunge der Ratte

L = Leber, Lu = Lunge, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-GPx-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Die Proteinextrakte wurden aus RINm5F-Zellen gewonnen, deren Kulturmedium mit Selenit (10 nM) supplementiert wurde. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen Glutathionperoxidase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die zytosolische Glutathionperoxidase war nach der Transfektion mit dem pcDNA3-GPx-Expressionvektor in den überexprimierenden RINm5F-Zellen wie bei den beiden Referenzen, Leber und Lunge der Ratte, deutlich als 23 kDa Bande nachweisbar. Die Expressionsstärke überstieg dabei die der Lunge und bei den am stärksten exprimierenden Zellklonen auch das Niveau der Leber (Abb. 3.6, Glutathionperoxidase 1 und 2). Wie bei der durchgeführten *Northern-Blot*-Analyse lag das Expressionsniveau nicht transfizierter RINm5F-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze und erhöhte sich auch durch Transfektion mit einem pcDNA3-Expressionsvektor allein nicht.

Die in Abb. 3.6 gezeigten Expressionsraten der Glutathionperoxidase in überexprimierenden RINm5F-Zellen konnten nur durch Supplementierung des Zellkulturmediums mit 10 nM Selenit erreicht werden, da der Selengehalt in Zellkulturmedien (Seleniteintrag ist nur durch

den FCS-Zusatz gewährleistet) für die vollständige Translation der GPx-Transkripte nicht ausreicht. Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, konnte ohne Selenit-Zusatz nur eine geringe Expressionsstärke bei den transfizierten RINm5F-Zellen detektiert werden. Nach Selenit-supplementation stieg die Proteinexpression stark an, wobei bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen keine Zunahme der Expression zu beobachten war (Abb. 3.7, K mit und ohne Selenit). Die 10 nM Selenitsupplementation des Zellkulturmediums war für die Glutathionperoxidase überexprimierenden RINm5F-Zellen nicht toxisch. Eine Steigerung der Proteinüberexpression durch eine weitere Erhöhung der Selenitkonzentration im Zellkulturmedium war nicht möglich.

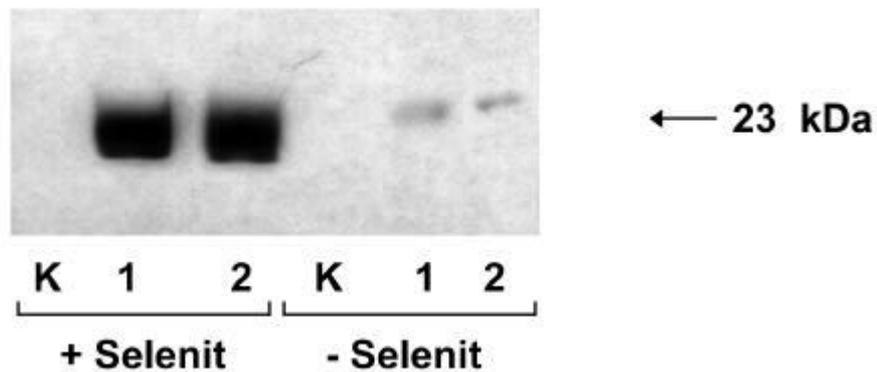


Abb. 3.7: *Western-Blot*-Analyse der Glutathionperoxidase-Überexpression in RINm5F-Zellen in Abhängigkeit von der Selenitsupplementierung des Kulturmediums

K = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, 1-2 = 2 unterschiedliche mit dem pcDNA3-GPx-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Dargestellt ist die Proteinexpression ohne und mit Selenitsupplementation des Kulturmediums (10 nM). Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen Glutathionperoxidase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.1.2.2 *Western-Blot*-Analysen der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD und MnSOD in transfizierten RINm5F-Zellen

Die Cu/ZnSOD ist ein sehr stabiles Protein, das bisher in allen eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Alle Cu/ZnSOD-Proteine, die aus eukaryotischen Zellen isoliert wurden, haben eine Größe von 33 kDa und bestehen aus zwei Untereinheiten, die jeweils ein Cu^{2+} - und ein Zn^{2+} -Ion in ihrem aktiven Zentrum enthalten. In der Rattenleber und in der RINm5F-Zellkulturline wurde die Cu/ZnSOD als 33 kDa Protein nachgewiesen. Im Gegensatz zu den RINm5F-Zellen konnte in der Rattenleber neben der 33 kDa Bande eine zweite, höhermolekulare Proteinbande detektiert werden. Die im folgenden beschriebene *Western-Blot*-Analyse wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die zytoplasmatische Cu/ZnSOD der Ratte durchgeführt.

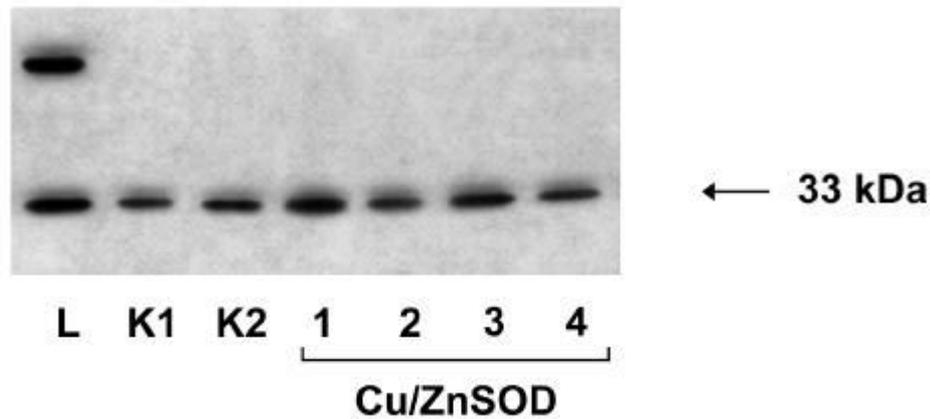


Abb. 3.8: *Western-Blot*-Analyse der Cu/ZnSOD-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber der Ratte

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-Cu/ZnSOD-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen die Cu/ZnSOD gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Durch das relativ hohe Expressionsniveau der nicht transfizierten RINm5F-Zellen konnte nur bei den am stärksten überexprimierenden Zellklonen eine in der *Western-Blot*-Analyse erkennbare Steigerung der Proteinexpression gezeigt werden (Abb. 3.8, Cu/ZnSOD 1 und 3). Diese entsprach in etwa der Expressionsstärke der Leber.

Das zweite Superoxid-inaktivierende Enzym, die MnSOD, ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils ein Mn^{3+} -Ion enthalten. Die MnSOD wurde als 23 kDa Bande nachgewiesen.

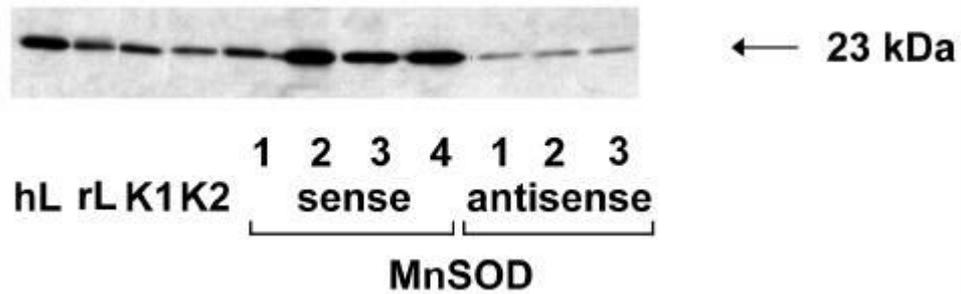


Abb. 3.9: *Western-Blot*-Analyse der MnSOD von transfizierten RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber des Menschen und der Ratte

hL = humane Leber, rL = Rattenleber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = mit dem pcDNA3-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellen, 1-4 *sense* = 4 unterschiedliche mit dem pcDNA3-MnSOD *sense*-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone, 1-3 *antisense* = 3 unterschiedliche mit dem pcDNA3-MnSOD *antisense*-Plasmid transfizierte RINm5F-Zellklone. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen die MnSOD gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die zum Vergleich gleichzeitig untersuchte Rattenleber und die humane Leber zeigten eine stärkere Proteinexpression als nicht transfizierte RINm5F-Zellen. Wie bei der Cu/ZnSOD konnte aber auch bei diesem Superoxid-inaktivierenden Enzym eine deutliche Proteinexpression bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen detektiert werden. Die Transfektion mit dem pcDNA3-MnSOD *sense*-Konstrukt konnte daher nur bei einem Teil der selektierten Klone eine nachweisbar erhöhte Expression bewirken. Die Translationsunterdrückung durch die angewendete *antisense*-Technik (Transfektion mit dem pcDNA3-MnSOD *antisense*-Vektor) ließ sich durch die *Western-Blot*-Analyse eindeutig belegen. Die Proteinexpression dieser Zellen (Abb. 3.9, MnSOD *antisense* 1 - 3) war im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert.

3.1.3 Enzymaktivitätsmessungen zytoprotektiver Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen

Als letzter Schritt in der Charakterisierung der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen wurden nach Genexpressions- und Proteinexpressionsanalysen spezifische Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt. Für alle weiteren Untersuchungen haben die Messungen der Enzymaktivitäten eine besondere Bedeutung: Nur durch eine meßbare Veränderung der intrazellulären Enzymaktivität kann eine veränderte Resistenz gegenüber freien Radikalen erwartet werden. Die Enzymaktivitätsmessungen wurden quantitativ durchgeführt und dienten nach den semiquantitativ durchgeführten *Northern-* und *Western-Blot*-Analysen der abschließenden Beurteilung der Transfektanten.

Historisch gesehen ist die Enzymaktivitätsmessung die am häufigsten beschriebene Methode, um Gewebe hinsichtlich ihrer Ausstattung an zytoprotektiven Enzymen zu charakterisieren. Ebenso vielfältig sind auch die von Halliwell & Gutteridge (1995) reflektierten Meßmethoden. In dieser Arbeit wurden spektralphotometrische Methoden (siehe Materialien und Methoden) für die Aktivitätsmessung der zytoprotektiven Enzyme gewählt, die sowohl eine hohe Zuverlässigkeit als auch eine ausreichende Sensitivität für den Aktivitätsnachweis kleiner Enzymmengen besitzen.

Überexpression	KAT		GPx		Cu/ZnSOD		MnSOD	
	(U/mg Protein)		(U/mg Protein)		(U/mg Protein)		(U/mg Protein)	
Kontrolle	6 ± 1	(4)	0,17 ± 0,03	(4)	70 ± 7	(4)	13 ± 2	(4)
Katalase	564 ± 18	(4)**	0,12 ± 0,01	(4)	99 ± 1	(4)	11 ± 5	(4)
GPx	8 ± 1	(4)	3,90 ± 0,35	(4)**	62 ± 4	(4)	26 ± 4	(4)*
Cu/ZnSOD	9 ± 1	(4)	0,09 ± 0,01	(4)	154 ± 26	(4)**	5 ± 1	(4)
MnSOD <i>sense</i>	5 ± 1	(4)	0,14 ± 0,02	(4)	68 ± 7	(4)	31 ± 4	(4)**
MnSOD <i>antisense</i>	7 ± 1	(4)	0,13 ± 0,01	(4)	53 ± 5	(4)	3 ± 1	(4)
KAT/GPx	212 ± 2	(4)**	4,40 ± 0,29	(4)**	78 ± 3	(4)	12 ± 1	(4)
KAT/Cu/ZnSOD	326 ± 3	(4)**	0,21 ± 0,02	(4)	120 ± 3	(4)*	17 ± 4	(4)
Pankreasinseln	4 ± 1	(4)	0,19 ± 0,01	(6)	50 ± 5	(5)	5 ± 1	(4)
Leber	324 ± 30	(6)	0,76 ± 0,06	(6)	161 ± 12	(6)	21 ± 3	(6)

Tab. 3.1: Enzymaktivitäten zytoprotektiver Enzyme in transfizierten RINm5F-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten RINm5F-Zellen, Leber und Pankreasinseln der Ratte

Die Enzymaktivitäten wurden von jedem Zelltyp aus einem beschallten 35000 g Überstand spektralphotometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der in Klammern angegebenen Zahl an Experimenten. Die Enzymaktivitäten der Pankreasinseln und Leber wurden zu Vergleichszwecken aufgeführt. *p < 0,05, **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnnett's*-Test).

Die zytoprotektiven Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase inaktivieren das durch die Superoxiddismutation und den intrazellulären Stoffwechsel gebildete H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff. Von den Reaktionskonstanten her sind beide Enzyme vergleichbar, ihre Substrataffinitäten unterscheiden sich aber erheblich (siehe Diskussion). Zusätzlich ist die Funktion der Glutathionperoxidase von Kofaktoren abhängig, so daß eine konstante Regenerierung von reduziertem Glutathion durch die Glutathionreduktase gewährleistet werden sein muß.

Die zytoplasmatische Cu/ZnSOD inaktiviert Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, um auf diese Weise die Zellstrukturen vor direkten Schäden zu schützen. Die Bestimmung der SOD-Aktivitäten erfolgte durch eine indirekte Methode, indem die durch das Xanthin/Xanthinoxidase-System induzierte Farbstoffreaktion durch die Dismutation der Superoxidradikale verhindert wurde.

Das zweite Superoxid-inaktivierende Enzym, die mitochondriale MnSOD, ist von großer Bedeutung für die Inaktivierung von freien Radikalen, die im mitochondrialen oxidativen Stoffwechsel entstehen. Die MnSOD-Aktivitäten wurden von den Gesamt-SOD-Aktivitäten nach Hemmung der Cu/ZnSOD durch Cyanid ermittelt.

Die Katalase überexprimierenden Zellen wiesen mit 564 U/mg Protein eine im Vergleich zu den Kontroll-RINm5F-Zellen (6 U/mg Protein) um den Faktor 100 gesteigerte Enzymaktivität auf. Die Katalase-Überexpression der Doppeltransfektanten KAT/GPx und KAT/Cu/ZnSOD war mit 212 bzw. 326 U/mg Protein signifikant erhöht, erreichte aber nicht die Aktivitäten der Einzeltransfektion. Die Höhe der Enzymaktivitätswerte zeigten sich auch im Vergleich zur Leber: Während der KAT/GPx überexprimierende Klon nur ca. 75 % des Leberwertes von 324 U/mg Protein erreichte, besaß der KAT/Cu/ZnSOD überexprimierende Klon gleiche Aktivitäten und die Katalase-Einzeltransfektion übertraf sogar die Enzymaktivitäten der Leber um 75 %.

Die Überexpression der GPx erreichte mit einer Enzymaktivität von 3,9 U/mg Protein bei der Einzel- und 4,4 U bei der KAT/GPx-Doppeltransfektion eine über 20fache Steigerung gegenüber den Kontrollzellen und überstieg auch die in der Leber gemessenen Werte von 0,76 U/mg Protein um den Faktor 5 – 6. Bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen konnte hingegen nur 2 % der Leberenzymaktivitäten gemessen werden. Die Aktivitäten aller weiteren zytoprotektiven Enzyme blieben durch die Katalase-Überexpression unverändert. Mit der Überexpression der GPx erhöhte sich die Aktivität der MnSOD bei der Einzeltransfektion signifikant, die MnSOD-Aktivität der Doppeltransfektion verblieb auf dem Niveau der Kontrolle. Aktivitätsveränderungen anderer zytoprotektiver Enzyme konnten nicht festgestellt werden.

Aufgrund der im Vergleich zur Leber relativ hohen Enzymaktivitäten der Superoxid-inaktivierenden Enzyme Cu/ZnSOD (43 % der Leber) und MnSOD (62 % der Leber) bereits in nicht transfizierten RINm5F-Zellen, erbrachte die Überexpression dieser Enzyme lediglich eine Verdoppelung bis Verdreifachung der Enzymaktivitätswerte. Mit 154 U/mg Protein konnte bei der Cu/ZnSOD Einzeltransfektion eine Verdoppelung der Cu/ZnSOD-Aktivität gegenüber den Kontrollzellen (70 U/mg Protein) detektiert werden. Etwas geringer fiel der Anstieg bei der Doppeltransfektion KAT/Cu/ZnSOD (120 U/mg Protein) aus.

Die Überexpression der MnSOD bewirkte mit einem meßbaren Enzymaktivitätsanstieg von 13 U/mg Protein auf 31 U/mg Protein eine zweieinhalbfache Steigerung. Der Anstieg war statistisch signifikant und hatte keine Auswirkung auf die weiteren zytoprotektiven

Enzymsysteme. Mit der *antisense* MnSOD-Transfektion konnte die Aktivität dieses Enzyms deutlich reduziert werden. Die MnSOD-Aktivität reduzierte sich von 13 U/mg Protein auf 3 U/mg Protein. Diese Reduktion war in der statistischen Überprüfung im einfaktoriellen *ANOVA*-Test und nachfolgendem *Dunnett's*-Test für multiple Vergleiche nicht signifikant.

Für die im folgenden beschriebenen Inkubationsversuche wurden die Zellklone verwendet, deren Enzymaktivitäten in Tab. 3.1 aufgeführt sind. Zur Überprüfung wurden die mit diesen Zellklonen erzielten Ergebnisse durch weitere Untersuchungen an anderen Zellklonen bestätigt, um zellklonspezifische Effekte auszuschließen.

3.2 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren

Mit der Modulation der Aktivität zytoprotektiver Enzyme in insulinproduzierenden Zellen und deren Inkubation mit chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren bietet sich die Möglichkeit, gemeinsame Schädigungswege dieser Noxen, aber auch effektive Schutzmechanismen gegen die durch sie ausgelösten Schäden aufzuzeigen. Untersuchungen mit chemischen Radikal-Generatoren ermöglichen aufgrund ihrer meist gut charakterisierten Radikalgenerierung die Aufklärung ansonsten komplexerer *in vivo* Bedingungen. Zusätzlich ist durch die Verwendung chemischer Radikal-Donatoren auch eine Abgrenzung der nur Radikal-induzierten gegenüber zusätzlich Zytokin-induzierten Zellschäden möglich.

3.2.1 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen Sauerstoffradikal-Generatoren

Freie Sauerstoffradikale sind an der Pathogenese vieler Entzündungsprozesse, Reperfusionsschäden oder Autoimmunerkrankungen beteiligt. Im multifaktoriellen Prozeß des Autoimmundiabetes werden Sauerstoffradikale einerseits durch Pankreasinseln infiltrierende Makrophagen und andererseits in den B-Zellen durch bisher nur unzureichend verstandene Mechanismen gebildet.

3.2.1.1 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Wasserstoffperoxid

Der EC_{50} -Wert für die im MTT-Test ermittelten Zellschädigung von nicht transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber H_2O_2 lag bei 46 μM . Mit der Überexpression von Katalase stieg die Resistenz gegenüber H_2O_2 stark an und wies einen EC_{50} -Wert von 592 μM auf. Lediglich eine kleine, nicht signifikante Verbesserung der Vitalität nach Inkubation mit H_2O_2 wurde durch die GPx-Überexpression erreicht. Der EC_{50} -Wert stieg auf 71 μM an. Die Transfektion sowohl mit

dem Cu/ZnSOD-Vektorkonstrukt als auch mit den MnSOD-Vektoren veränderten die Resistenzen gegenüber H₂O₂ nicht signifikant (Cu/ZnSOD: 52 µM, MnSOD *sense*: 59 µM bzw. 54 µM bei MnSOD *antisense*).

Eine kombinierte Überexpression der beiden Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase erbrachte keine weitere Erhöhung der Resistenz im Vergleich zu den Katalase überexprimierenden Zellen. Lediglich die Überexpression der Cu/ZnSOD zusammen mit Katalase bewirkte eine weitere Erhöhung der Resistenz gegenüber H₂O₂, verbunden mit einem abermals höheren EC₅₀-Wert von 973 µM.

Überexpression	Wasserstoffperoxid (µM)		
Kontrolle	46 ± 1	(6)	
GPx	71 ± 3	(6)	
Katalase	592 ± 37	(6)**	
Cu/ZnSOD	52 ± 2	(6)	
MnSOD <i>sense</i>	59 ± 5	(6)	
MnSOD <i>antisense</i>	54 ± 4	(6)	
KAT/GPx	556 ± 54	(6)**	
KAT/Cu/ZnSOD	973 ± 42	(6)**	

Tab. 3.2: EC₅₀-Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von H₂O₂ gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 2 h mit unterschiedlichen H₂O₂ Konzentrationen in glucosehaltigem KRB-Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und gegen RPMI-1640 Medium ausgetauscht. Nach 16 h wurde die Vitalität im MTT-Test ermittelt. Die EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.10 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus 6 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (ANOVA-Test/Dunnett's-Test).

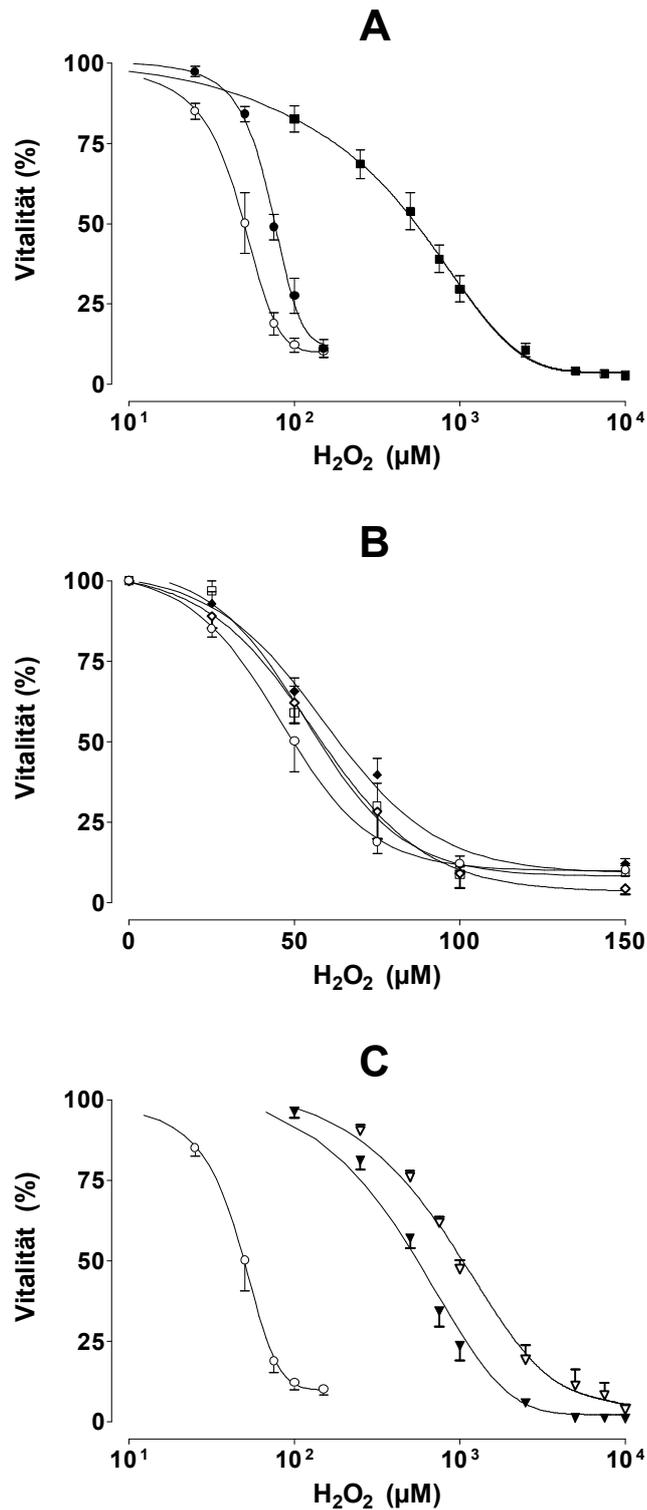


Abb. 3.10: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber H₂O₂ Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.1.2 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Hypoxanthin/Xanthinoxidase

Durch das Hypoxanthin/Xanthinoxidase-System (HX/XO) werden neben H_2O_2 auch Superoxidradikale freigesetzt. In den HX/XO Inkubationsversuchen mit nicht transfizierten RINm5F-Kontrollzellen war eine konzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme im Konzentrationsbereich von 0 – 4 mU/ml Xanthinoxidase zu beobachten (EC_{50} -Wert: 46 mU/ml). Durch Überexpression von GPx oder KAT konnte lediglich eine kleine Steigerung der Resistenz gegenüber HX/XO erreicht werden, die nur im Fall der Katalase-Transfektion signifikant war. Die EC_{50} -Werte betragen 3,2 mU/ml (GPx) bzw. 4,4 mU/ml im Fall der KAT transfizierten Zellen. Die Überexpression beider SOD-Isoenzyme konnte keine gesteigerte Resistenz gegenüber den durch das HX/XO-System induzierten Zellschädigungen bewirken. Im Gegensatz zu diesen nur moderat oder überhaupt nicht schützenden Einzeltransfektanten zeigten beide Doppeltransfektanten einen exzellenten Schutz gegenüber HX/XO. So reduzierte sich die Vitalität der transfizierten RINm5F-Zellen auch nach der Inkubation mit der höchsten verwendeten Konzentration von 6 mU/ml Xanthinoxidase nur um ca. 25 %. Aufgrund dieses außerordentlich effektiven Schutzes war die Ermittlung eines EC_{50} -Werts für die KAT/GPx und KAT/Cu/ZnSOD transfizierten Zellen für die Inkubation mit HX/HO nicht möglich.

Überexpression	Xanthinoxidase (mU/ml)		
Kontrolle	2,5 ±	0,1	(5)
GPx	3,2 ±	0,3	(5)
Katalase	4,4 ±	0,3	(5)**
Cu/ZnSOD	2,3 ±	0,1	(5)
MnSOD <i>sense</i>	3,0 ±	0,2	(5)
MnSOD <i>antisense</i>	3,3 ±	0,3	(5)
KAT/GPx	> 6 ±		(5)**
KAT/Cu/ZnSOD	> 6 ±		(5)**

Tab. 3.3: EC_{50} -Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von Hypoxanthin/Xanthinoxidase gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Hypoxanthin/Xanthinoxidase (HX/XO) in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Das Verhältnis zwischen HX und XO wurde bei konstant 1 mU XO und 0,05 M HX gehalten. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.11 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (ANOVA-Test/Dunnett's-Test).

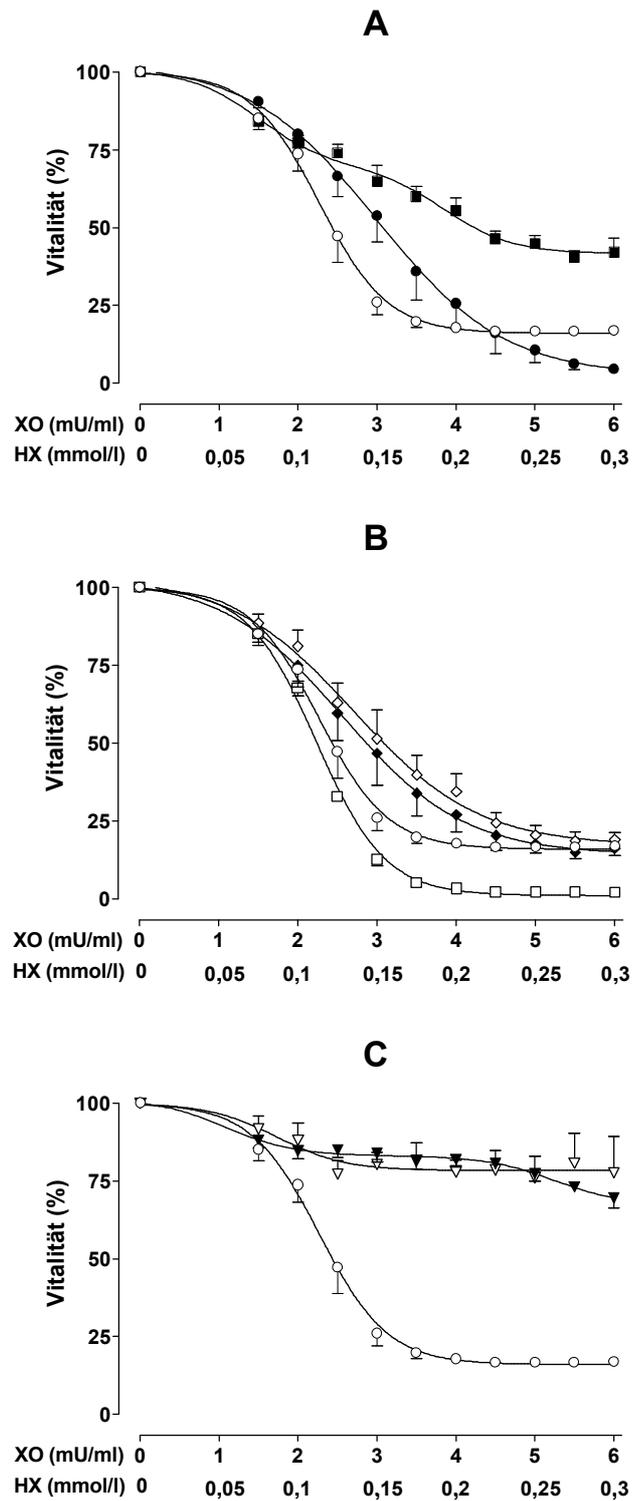


Abb. 3.11: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber Hypoxanthin/Xanthinoxidase Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. **B:** ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. **C:** ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.2.1.3 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Menadion

Der EC_{50} -Wert nicht transfizierter RINm5F-Zellen für Menadion betrug $14,3 \mu\text{M}$. Die Überexpression von GPx steigerte die Resistenz gegenüber Menadion signifikant, so daß der EC_{50} -Wert bei diesen Zellen $25,5 \mu\text{M}$ betrug. Alle anderen durch Einzeltransfektion erzeugten RINm5F-Zellklone zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Resistenz gegenüber Menadion auf. Während der EC_{50} -Wert der Katalase transfizierten Zellen mit $14,8 \mu\text{M}$ und bei beiden MnSOD-Varianten (MnSOD *sense* $13,4 \mu\text{M}$, MnSOD *antisense* $14,4 \mu\text{M}$) unverändert blieb, reduzierte sich dieser bei den Cu/ZnSOD überexprimierenden Zellen auf $10,2 \mu\text{M}$. Die Resistenz der Doppeltransfektante KAT/GPx konnte den bei der Einzeltransfektion gefundenen Schutz nicht steigern, der EC_{50} -Wert von $19,9 \mu\text{M}$ lag sogar unter dem des GPx überexprimierenden Zellklons. Mit der gleichzeitigen Überexpression von Katalase und Cu/ZnSOD konnte hingegen ein hervorragender Schutz mit einem EC_{50} -Wert von $30,2 \mu\text{M}$ erzielt werden.

Überexpression	Menadion (μM)		
Kontrolle	14,3	\pm 0,4	(5)
GPx	25,5	\pm 2,3	(7)**
Katalase	14,8	\pm 0,9	(7)
Cu/ZnSOD	10,2	\pm 0,3	(5)
MnSOD <i>sense</i>	13,4	\pm 0,3	(5)
MnSOD <i>antisense</i>	14,4	\pm 0,3	(5)
KAT/GPx	19,9	\pm 0,5	(5)
KAT/Cu/ZnSOD	30,2	\pm 1,8	(5)**

Tab. 3.4: EC_{50} -Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von Menadion gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Menadion in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.12 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnett's*-Test).

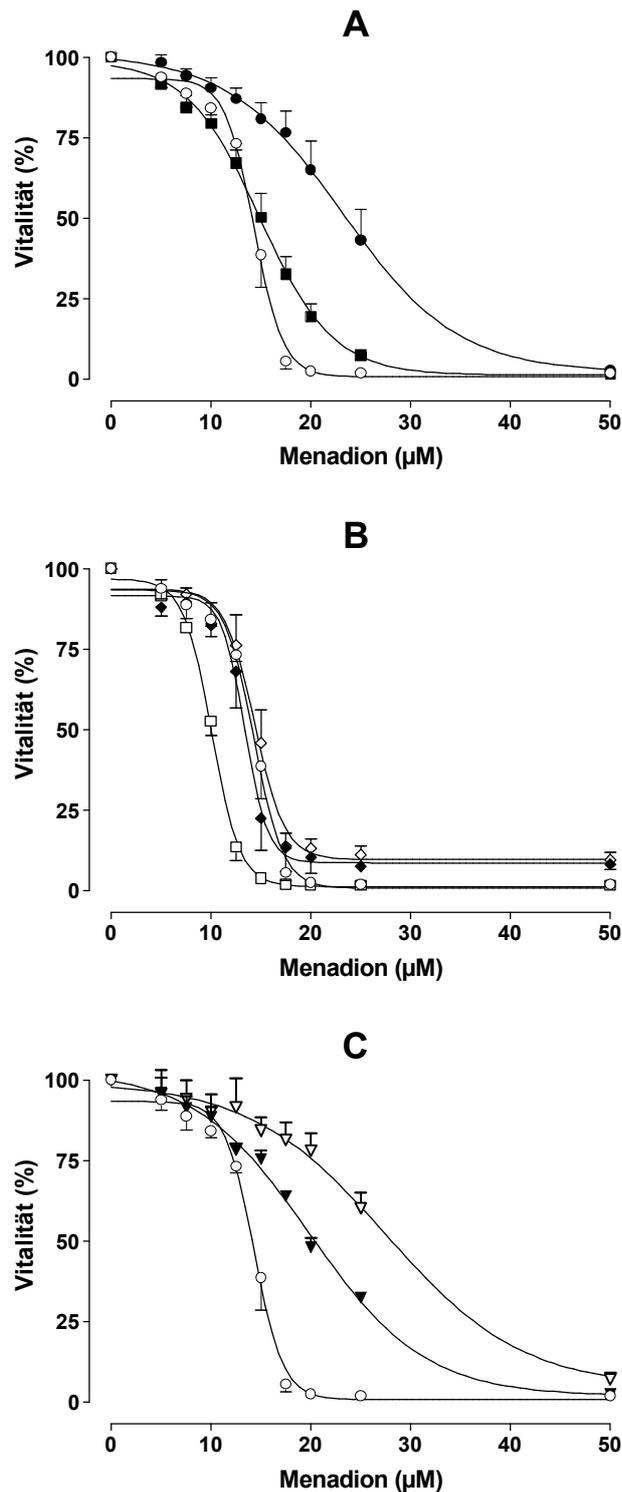


Abb. 3.12: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber Menadion Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 - 7 unabhängigen Experimenten.

3.2.1.4 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit N-Butylalloxan

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Inkubationsversuchen mit allgemeintoxischen Sauerstoffradikal-Generatoren wurden RINm5F-Zellen mit einem Derivat der B-zell-spezifischen Noxe Alloxan inkubiert. Im Gegensatz zu der Ursprungssubstanz Alloxan wirkt das lipophile Derivat N-Butylalloxan auch an der insulinproduzierenden RINm5F-Zelle zytotoxisch. Die Generierung von Sauerstoffradikalen durch Redoxzyklen in Folge des Alloxanzerfalls in wäßriger Lösung gilt in der Literatur als Hauptmechanismus der Toxizität (Asayama *et al.* 1984; Munday 1988).

Nicht transfizierte Kontrollzellen und transfizierte RINm5F-Zellen zeigten im Konzentrationsbereich bis 20 mM fast völlige Resistenz gegenüber Alloxan. Eine signifikante Zellschädigung konnte nicht erreicht werden, so daß die Vitalität bei allen Zellklonen und bei der höchsten Konzentration > 95 % betrug.

Dem stand eine konzentrationsabhängige Zellschädigung nach Inkubation mit N-Butylalloxan (0 – 5 mM) gegenüber, mit einem EC₅₀-Wert für die nicht transfizierten RINm5F-Zellen von 4 mM. Durch keine der Überexpressionen konnte eine Steigerung der Resistenz gegenüber N-Butylalloxan erreicht werden. Während hingegen der EC₅₀-Wert für GPx, Katalase und MnSOD *sense* sich nicht signifikant verringerte, wurde der EC₅₀-Wert der Cu/ZnSOD-Überexpression signifikant auf 2,3 mM reduziert. Durch die gleichzeitige Expression von Katalase und Cu/ZnSOD konnte eine partielle Aufhebung dieser gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber N-Butylalloxan erreicht werden. Mit einem EC₅₀-Wert von 3,1 mM wies auch der KAT/GPx überexprimierende Klon eine ähnliche Empfindlichkeit auf. Als einziger Klon zeigte die MnSOD *antisense* Transfektion mit einem EC₅₀-Wert von 4,7 mM eine Steigerung der Resistenz im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen auf. Dieser Anstieg konnte aber nicht signifikant abgesichert werden.

Überexpression	N-Butylalloxan (mM)		
Kontrolle	4,0 ±	0,1	(4)
GPx	3,9 ±	0,1	(4)
Katalase	3,6 ±	0,3	(4)
Cu/ZnSOD	2,3 ±	0,3	(4)**
MnSOD <i>sense</i>	4,0 ±	0,1	(4)
MnSOD <i>antisense</i>	4,7 ±	0,1	(4)
KAT/GPx	3,1 ±	0,2	(4)*
KAT/Cu/ZnSOD	3,2 ±	0,2	(4)*

Tab. 3.5: EC₅₀-Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von N-Butylalloxan gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen N-Butylalloxan in glucosefreiem KRB-Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und gegen RPMI-1640 Medium ausgetauscht. Nach 16 h wurde die Vitalität im MTT-Test ermittelt. Die EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.13 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. *p < 0,05, **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnett's*-Test).

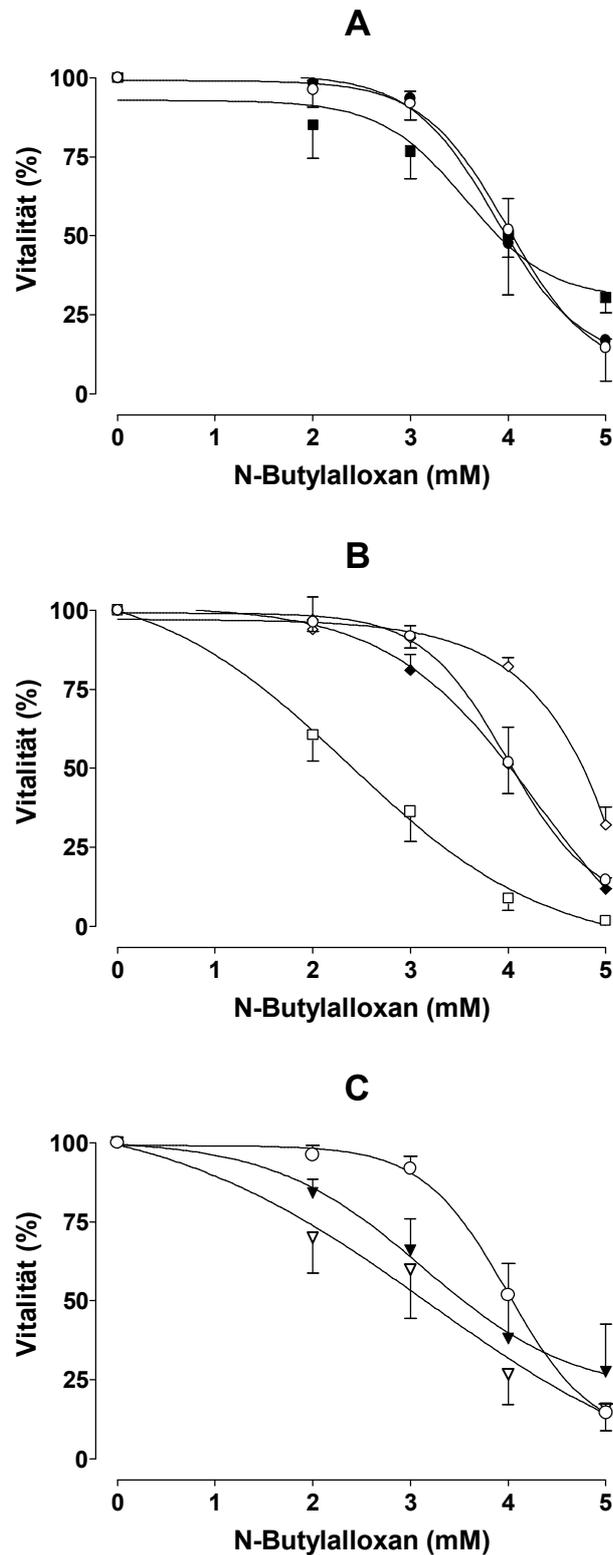


Abb. 3.13: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber N-Butylalloxan Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 - 7 unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Inkubation der transfizierten RINm5F-Zellen mit chemischen NO-Generatoren

Die Toxizität von chemischen NO-Generatoren gegenüber insulinproduzierenden Zelllinien und pankreatischen B-Zellen wurde in vielen Studien untersucht. DNA-Strangbrüche und Lipidperoxidation konnten als Radikal-induzierte Schäden nachgewiesen werden. Durch gleichzeitige Inkubation mit antioxidativ wirkenden Substanzen konnte eine Reduktion dieser NO-vermittelten Schäden erreicht werden, so daß eine Beteiligung von Sauerstoffradikalen am Zellschädigungsmechanismus anzunehmen ist (Burkart *et al.* 1995). Gentechnisch veränderte RINm5F-Zellen mit einer modifizierten zytoprotektiven Enzymausstattung haben gegenüber den benutzten chemischen Antioxidantien Vorteile. Die Inaktivierung von Sauerstoffradikalen durch das zytoprotektive Enzymsystem verläuft sehr viel effizienter ab als durch Zusatz von chemischen Schutzsubstanzen und zusätzlich läßt die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme andere von der extrazellulären Applikation der Antioxidantien abweichende Schutzmöglichkeiten vermuten.

3.2.2.1 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SIN-1

Der EC_{50} -Wert der nicht transfizierten RINm5F-Kontrollzellen betrug gegenüber SIN-1 2,3 mM. Der stark eingegrenzte Konzentrationsbereich, in dem die Inkubation von RINm5F-Zellen erfolgte (bis 3,5 mM), zeigt die schon bei kleinen Konzentrationszunahmen sehr stark zunehmende Toxizität von SIN-1. Durch die Überexpression von Katalase erlangten die Zellen einen ausgeprägten Schutz gegenüber SIN-1 und der EC_{50} -Wert konnte so auf 3,0 mM gesteigert werden. Eine leicht geringere Schutzwirkung wurde auch mit der Cu/ZnSOD Einzeltransfektion erreicht: Der EC_{50} -Wert stieg auf 2,8 mM. Beide Resistenzsteigerungen gegenüber der durch SIN-1 vermittelten Toxizität waren signifikant. Die Modulation der MnSOD-Expression hatte keinerlei signifikante Auswirkungen auf die Resistenz gegenüber SIN-1. Mit der gleichzeitigen Überexpression von Katalase und Cu/ZnSOD konnte keine additive Schutzwirkung der in der Einzeltransfektion erfolgreichen Schutzsysteme erreicht werden. Auch die Katalase/GPx Doppeltransfektante zeigte mit einem EC_{50} -Wert von 2,2 mM keinen von den Kontrollzellen signifikant abweichenden Wert auf.

Überexpression	SIN-1 (mM)		
Kontrolle	2,3 ±	0,10	(6)
GPx	2,1 ±	0,01	(6)
Katalase	3,0 ±	0,11	(6)**
Cu/ZnSOD	2,8 ±	0,03	(6)**
MnSOD <i>sense</i>	2,1 ±	0,04	(6)
MnSOD <i>antisense</i>	2,0 ±	0,06	(6)
KAT/GPx	2,2 ±	0,1	(6)
KAT/Cu/ZnSOD	2,3 ±	0,09	(6)

Tab. 3.6: EC₅₀-Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von SIN-1 gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen SIN-1 in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.14 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus jeweils 6 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnett's*-Test).

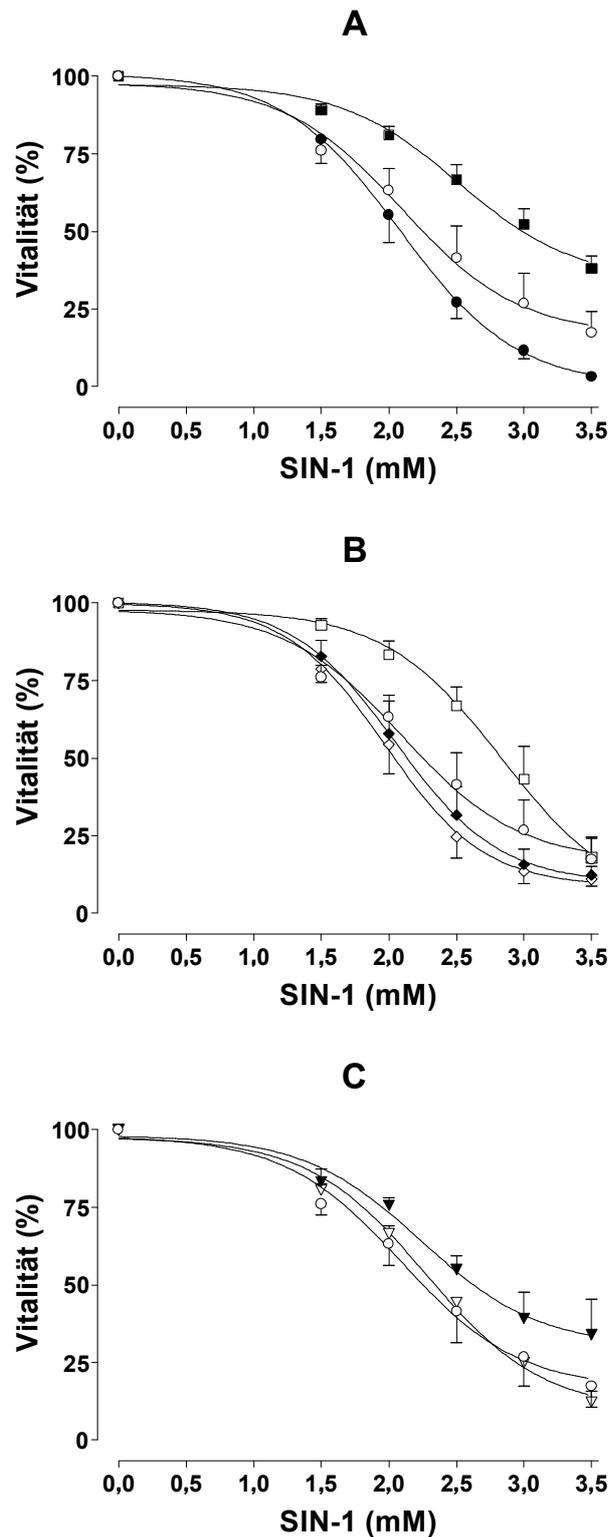


Abb. 3.14: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber SIN-1 Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.2.2 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Natriumnitroprussid

Glutathionperoxidase überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten gegenüber Natriumnitroprussid die ausgeprägteste Resistenzsteigerung. Ihre Vitalität verringerte sich nach der Inkubation mit Natriumnitroprussid nur um einige Prozentpunkte und selbst bei Konzentrationen, die bei nicht transfizierten Zellen den kompletten Zelltod auslösten, lag ihre Vitalität über 90 % (siehe Abb. 3.15). Einen ebenfalls ausgeprägten Schutz zeigte auch der MnSOD *antisense* Zellklon, der bei der höchsten verwendeten Natriumnitroprussidkonzentration von 2 mM noch eine Vitalität von 68 % aufwies. Bei beiden transfizierten Zelllinien konnte aufgrund der hohen Resistenz gegenüber Natriumnitroprussid keine halbmaximale Hemmung der Vitalität errechnet werden. Die Überexpression des Cu/ZnSOD- oder des MnSOD-Isoenzym zeigt mit einem um 50 % erhöhten EC₅₀-Wert ebenfalls eine signifikante Resistenzsteigerung. Die Überexpression von Katalase allein oder in der Kombination mit GPx oder Cu/ZnSOD erbrachte keine Veränderungen.

Überexpression	Natriumnitroprussid (mM)		
Kontrolle	0,98 ±	0,09	(5)
GPx	> 2 ±		(5)**
Katalase	1,03 ±	0,08	(5)
Cu/ZnSOD	1,52 ±	0,07	(6)**
MnSOD <i>sense</i>	1,54 ±	0,06	(5)**
MnSOD <i>antisense</i>	> 2 ±		(5)**
KAT/GPx	1,11 ±	0,09	(6)
KAT/Cu/ZnSOD	0,92 ±	0,189	(6)

Tab. 3.7: EC₅₀-Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von Natriumnitroprussid gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Natriumnitroprussid in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.15 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnett's*-Test).

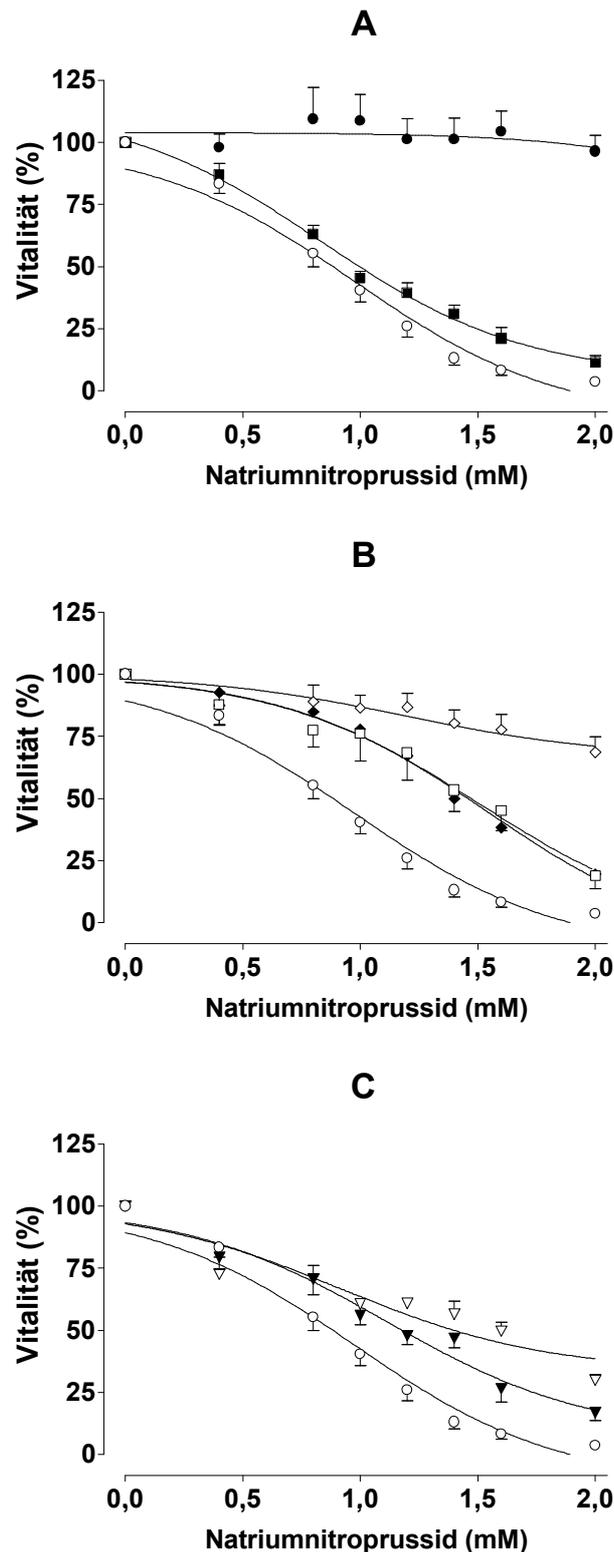


Abb. 3.15: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber Natriumnitroprussid Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ▽ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 - 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.2.3 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SNAP

Für nicht transfizierte RINm5F-Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme nach Inkubation mit SNAP im Konzentrationsbereich bis 1,6 mM und mit einem EC_{50} -Wert von 0,58 mM beobachtet werden. Mit der Überexpression von GPx erhöhte sich die Resistenz gegenüber SNAP am stärksten. So betrug die halbmaximale Hemmung nach Versuchsdurchführung 1,53 mM. Die einzelne Überexpression von Katalase oder Cu/ZnSOD bewirkte einen geringeren, aber dennoch signifikanten Anstieg der im MTT-Test ermittelten Restvitalitäten um ca. 100 % bzw. 40 %. Durch die Veränderung der MnSOD-Expressionsstärken konnte keine Veränderung der Zellvitalität nach Inkubation mit SNAP erreicht werden. Beide Doppeltransfektionen von Katalase zusammen mit Cu/ZnSOD oder GPx unterschieden sich im Gegensatz zu der Einzelüberexpression von Katalase nicht signifikant von den Kontrollzellen.

Überexpression	SNAP (mM)		
Kontrolle	0,58 ±	0,03	(5)
GPx	1,53 ±	0,08	(5)**
Katalase	1,09 ±	0,04	(5)**
Cu/ZnSOD	0,90 ±	0,02	(5)**
MnSOD <i>sense</i>	0,59 ±	0,01	(5)
MnSOD <i>antisense</i>	0,57 ±	0,01	(5)
KAT/GPx	0,67 ±	0,01	(5)
KAT/Cu/ZnSOD	0,67 ±	0,01	(5)

Tab. 3.8: EC_{50} -Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von SNAP gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen SNAP in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.16 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 5 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnnett's*-Test).

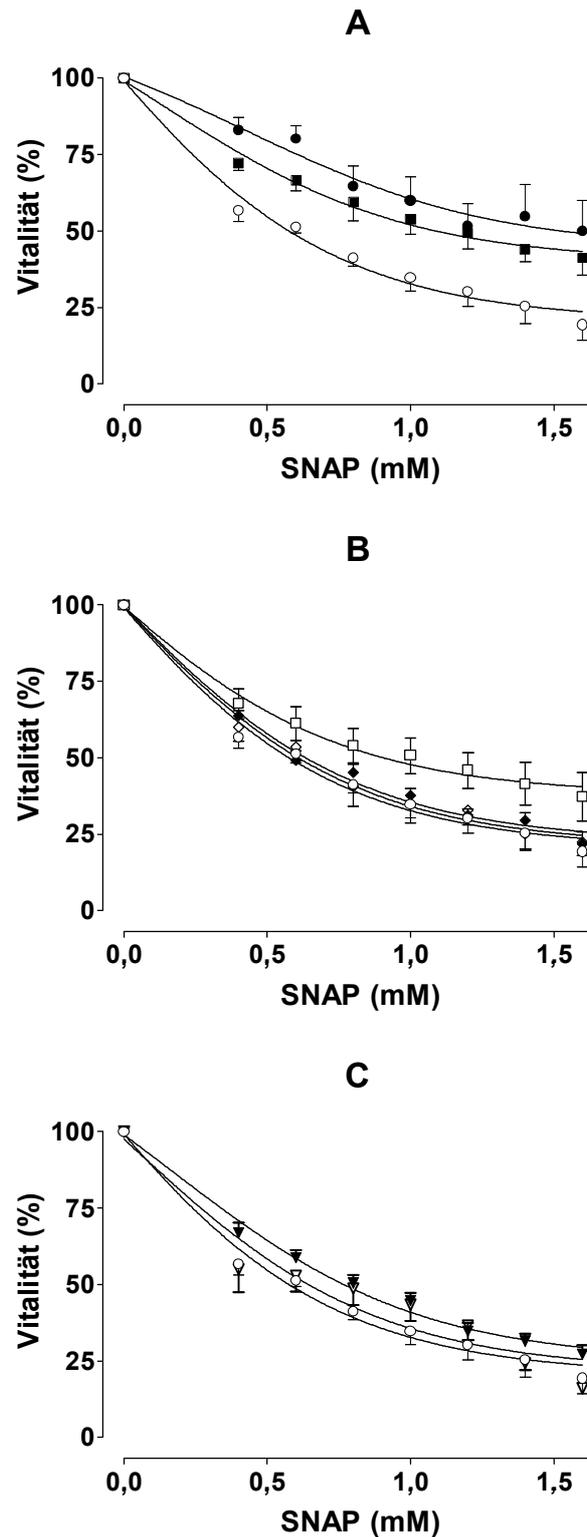


Abb. 3.16: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber SNAP Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.2.2.4 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit DETA/NO

Die DETA/NO-vermittelte Zytotoxizität resultierte bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen in einem EC_{50} -Wert von 1,25 mM. Durch keine der Transfektionen war es möglich, die Resistenz der einzelnen Zelllinien gegenüber dieser NO-generierenden Substanz zu steigern.

Überexpression	DETA/NO (mM)		
Kontrolle	1,25 ±	0,18	(4)
GPx	1,14 ±	0,19	(5)
Katalase	1,30 ±	0,33	(5)
Cu/ZnSOD	1,25 ±	0,34	(5)
MnSOD <i>sense</i>	1,39 ±	0,13	(5)
MnSOD <i>antisense</i>	1,15 ±	0,16	(5)
KAT/GPx	1,25 ±	0,15	(5)
KAT/Cu/ZnSOD	1,05 ±	0,24	(5)

Tab. 3.9: EC_{50} -Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von DETA/NO gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen DETA/NO in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.17 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnett's*-Test).

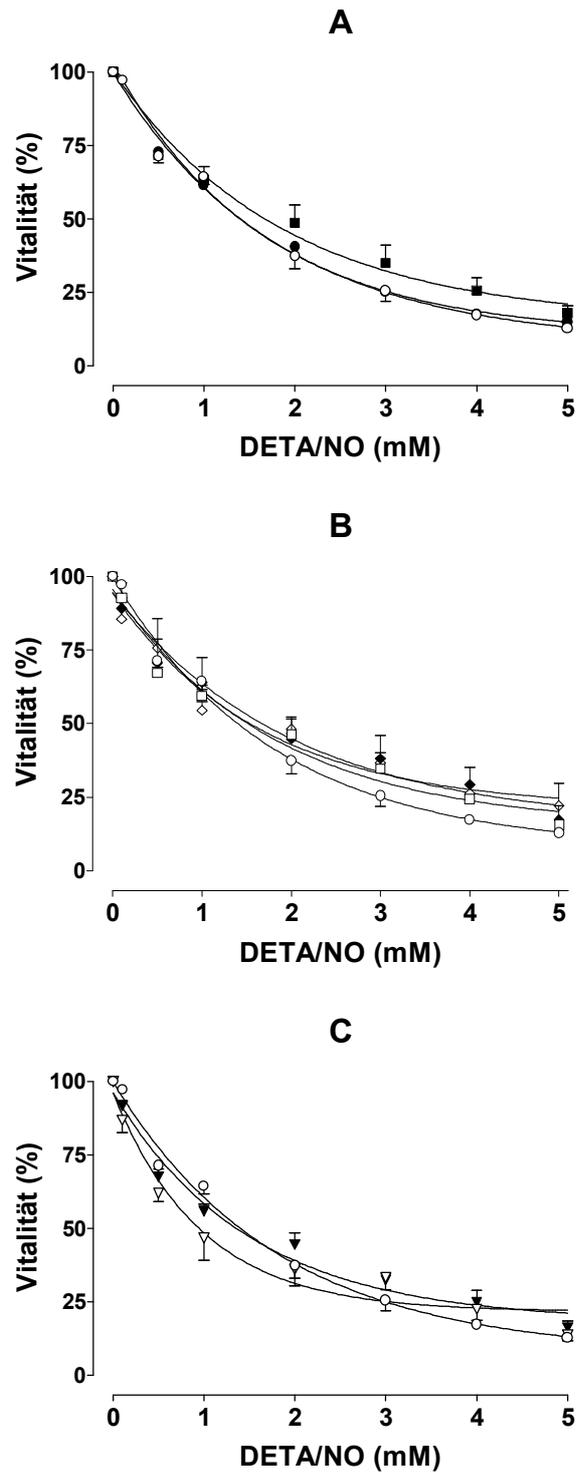


Abb. 3.17: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber DETA/NO Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 - 5 unabhängigen Experimenten.

3.2.2.5 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit SPER/NO

Mit einem auf 0,073 mM erhöhten EC_{50} -Wert unterschieden sich nur die Cu/ZnSOD überexprimierenden RINm5F-Zellen signifikant von den nicht transfizierten Kontrollzellen mit einem EC_{50} -Wert von 0,024 mM. Alle anderen Transfektionen erbrachten keine Veränderung der Resistenz gegenüber SPER/NO.

Überexpression	SPER/NO (mM)
Kontrolle	0,024 ± 0,0033 (6)
GPx	0,023 ± 0,0011 (5)
Katalase	0,030 ± 0,0011 (5)
Cu/ZnSOD	0,073 ± 0,0155 (5)**
MnSOD <i>sense</i>	0,026 ± 0,004 (5)
MnSOD <i>antisense</i>	0,058 ± 0,002 (5)
KAT/GPx	0,041 ± 0,004 (5)
KAT/Cu/ZnSOD	0,035 ± 0,005 (5)

Tab. 3.10: EC_{50} -Werte für die im MTT-Test ermittelte Toxizität von SPER/NO gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen SPER/NO in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde im MTT-Test ermittelt. Die EC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression aus den in der Abb. 3.18 dargestellten Kurven ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (*ANOVA*-Test/*Dunnnett's*-Test).

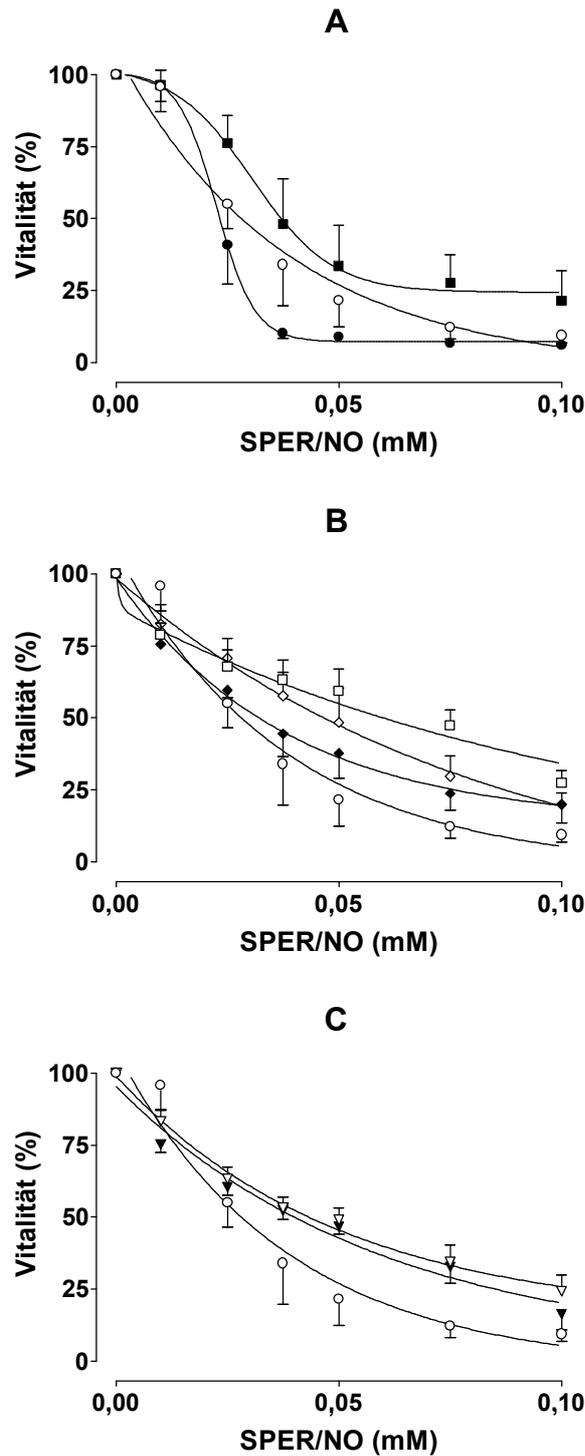


Abb. 3.18: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber SPER/NO Toxizität

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ? = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ▽ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 5 - 6 unabhängigen Experimenten.

3.3 Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen

Ergänzend zu den durchgeführten Inkubationsversuchen mit transfizierten RINm5F-Zellen wurden Versuche mit exogenem Zusatz von Katalase und/oder Cu/Zn-Superoxiddismutase zum Inkubationsmedium durchgeführt. Aufgrund dieser Versuchsanordnung wurde eine lokale Eingrenzung der Radikalgenerierung (extra- oder intrazellulär) und eine spezifischere Definition der generierten Sauerstoffradikale möglich.

Die Menge der zugesetzten zytoprotektiven Enzyme war mit 6 U Katalase und 60 U Cu/ZnSOD pro Milliliter Zellkulturmedium ausreichend groß gewählt worden, um einen vollständigen Abbau der zu erwartenden reaktiven Sauerstoffspezies zu gewährleisten. Die Konzentrationen der für die Inkubationsversuche benutzten Testkomponenten wurden aus den unter 2.9 aufgeführten Versuchen ermittelt, so daß eine 80 – 90 %ige Schädigung nach erfolgter Inkubation zu erwarten war.

3.3.1 Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber Sauerstoffradikal-Generatoren

Der Zusatz von Katalase allein oder in Kombination zusammen mit Cu/ZnSOD zum Inkubationsmedium erbrachte einen vollständigen Schutz gegenüber der durch H₂O₂ und Hypoxanthin/Xanthinoxidase induzierten Zellschädigung. Hierbei war kein signifikanter Unterschied zwischen Einzel- oder Kombinationsschutz ersichtlich. Durch den Zusatz von Cu/ZnSOD allein war gegenüber diesen Noxen kein Schutz zu erreichen. Gegenüber Menadion und N-Butylalloxan war sowohl der exogene Zusatz von Katalase und Cu/ZnSOD allein oder die Kombination beider Enzyme unwirksam. Die Spezifität des durch den Enzymzusatzes erhaltenen Schutzes wurde durch Inkubation mit hitzeinaktivierten Enzymen sichergestellt. Die dabei erhaltenen Vitalitätswerte wichen nicht signifikant von den gemessenen Werten ohne Enzymzusatz ab.

Testkomponente	kein Zusatz	KAT (6 U/ml)	Cu/ZnSOD (60 U/ml)	KAT/Cu/ZnSOD (6 U/ml, 60 U/ml)
H ₂ O ₂ (100 µM)	22 ± 7 (4)	98 ± 6 (4)**	28 ± 11 (4)	102 ± 5 (4)**
HX/XO (0,2 mM, 4 mU/ml)	18 ± 6 (4)*	103 ± 21 (4)*	47 ± 28 (4)	106 ± 20 (4)*
Menadion (20 µM)	5 ± 5 (5)	13 ± 7 (5)	2 ± 6 (5)	7 ± 4 (5)
N-Butylalloxan (5 mM)	39 ± 7 (4)	18 ± 3 (4)	31 ± 7 (4)	24 ± 5 (4)

Tab. 3.11: Effekte exogenen Zusatzes von Katalase, Cu/ZnSOD oder Katalase und Cu/ZnSOD auf die im MTT-Test ermittelte Toxizität von Sauerstoffradikal-Generatoren gegenüber nicht transfizierten RINm5F-Zellen

Nicht transfizierte RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit Katalase (6 U/ml), Cu/ZnSOD (60 U/ml) oder Katalase und Cu/ZnSOD (6 U und 60 U/ml) und der jeweiligen Testkomponente in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die in der Tabelle wiedergegebenen Vitalitäten wurden mit dem MTT-Test ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. *p < 0,05, **p < 0,01 verglichen mit RINm5F-Zellen, die ohne exogenen Enzymzusatz mit der Testkomponente inkubiert wurden (ANOVA-Test/Dunnnett's-Test).

3.3.2 Exogener Schutz von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen gegenüber NO-Generatoren

Gegenüber den NO-generierenden Substanzen Natriumnitroprussid, SNAP, DETA/NO und SPER/NO konnte durch den Zusatz von Katalase oder Cu/ZnSOD allein oder durch den gleichzeitigen Zusatz beider Enzyme keinerlei Schutz erreicht werden. Die SIN-1-induzierte Toxizität ließ sich durch den Zusatz von Katalase oder Cu/ZnSOD nicht verringern. Nur die Kombination beider Enzyme im Inkubationsmedium erbrachte eine signifikante Vitalitätssteigerung auf 75 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Durch Hitzedenaturierung inaktivierte Enzympräparationen bewirkten im Vergleich zu Inkubationen ohne Enzymzusatz keine gesteigerten Vitalitätswerte.

Testkomponente	kein Zusatz	KAT (6 U/ml)	Cu/ZnSOD (60 U/ml)	KAT/Cu/ZnSOD (6 U/ml, 60 U/ml)
SIN-1 (3,5 mM)	2,9 ± 0,6 (4)	7,5 ± 2,0 (4)	4,9 ± 1,6 (4)	75,4 ± 4,6 (4)**
Natriumnitroprussid (1,6 mM)	25,1 ± 5,0 (5)	24,4 ± 5,4 (5)	21,0 ± 4,0 (5)	22,4 ± 4,7
SNAP (1,6 mM)	14,7 ± 1,5 (5)	14,0 ± 3,0 (5)	9,7 ± 2,6 (5)	10,4 ± 2,1 (5)
DETA/NO (5 mM)	29 ± 4,0 (5)	31 ± 3,0 (5)	36 ± 3,0 (5)	33 ± 3 (5)
SPER/NO (0,75 mM)	32 ± 8,0 (5)	18 ± 3,0 (5)	32 ± 5 (5)	44 ± 2 (5)

Tab. 3.12: Effekte exogenen Zusatzes von Katalase, Cu/ZnSOD oder Katalase und Cu/ZnSOD auf die im MTT-Test ermittelte Toxizität von NO-Generatoren gegenüber nicht transfizierten RINm5F-Zellen

Nicht transfizierte RINm5F-Zellen wurden für 18 h mit Katalase (6 U/ml), Cu/ZnSOD (60 U/ml) oder Katalase und Cu/ZnSOD (6 U und 60 U/ml) und der jeweiligen Testkomponente in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die in der Tabelle wiedergegebenen Vitalitäten wurden mit dem MTT-Test ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. *p < 0,05, **p < 0,01 verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (ANOVA-Test/Dunnett's-Test).

3.4 Kombinierte Inkubation von nicht transfizierten RINm5F-Zellen mit Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren

Durch die Koinkubation von nicht transfizierten RINm5F-Zellen mit Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren sollten mögliche synergistische Schädigungsmechanismen untersucht werden. Durch die Verwendung für sich allein nur gering toxischen Konzentrationen Radikalgenerierender Substanzen können überadditive Schädigungseffekte in Kombination beider Verbindungen beobachtet werden.

Für den Versuch wurden RINm5F-Zellen für 18 h mit jeweils einem der beiden Sauerstoffradikal-Generatoren H₂O₂ (40 µM) oder HX/XO (50 µM/1 mU) oder einem der beiden NO-Generatoren SNAP (0,4 mM) oder SIN-1 (1 mM) inkubiert. Zusätzlich wurden RINm5F-Zellen mit einer Kombination beider Radikalbildner (H₂O₂ mit SNAP oder SIN-1 und HX/XO mit SNAP oder SIN-1) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte RINm5F-Zellen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Verbindungen sollten substanzspezifische Effekte ausgeschlossen werden.

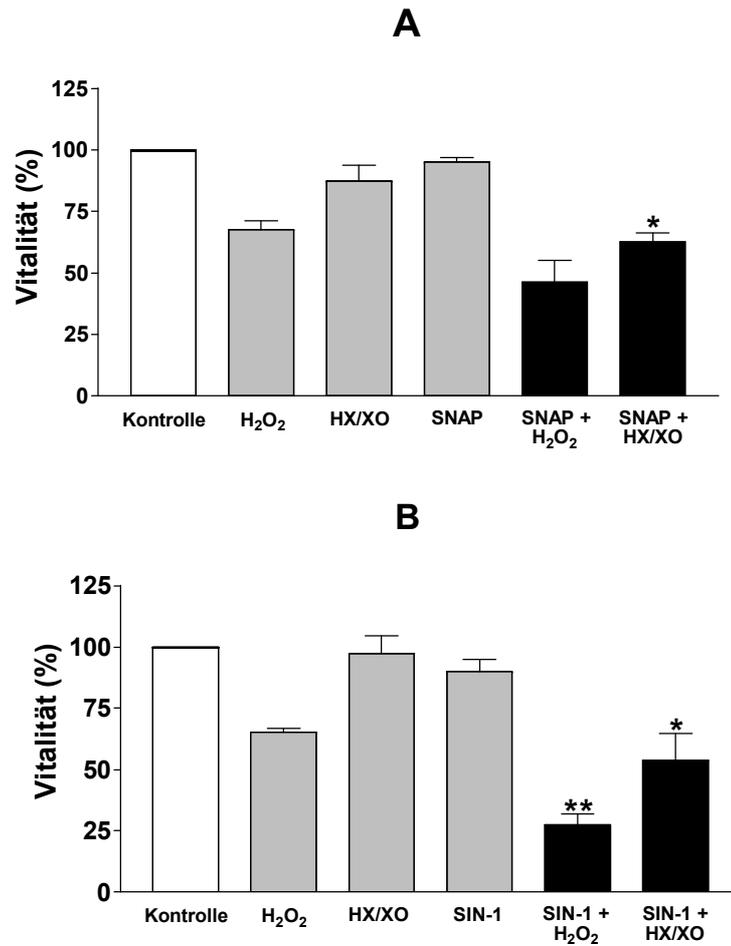


Abb. 3.19: Effekte der Koinkubation von Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren auf die Vitalität von nicht transfizierten RINm5F-Zellen

A: Nicht transfizierte RINm5F-Zellen wurden mit SNAP, H₂O₂ und HX/XO allein (grau unterlegte Säulen) oder mit der Kombination aus SNAP/H₂O₂ bzw. SNAP/HX/XO (schwarze Säulen) inkubiert.

B: Nicht transfizierte RINm5F-Zellen wurden mit SIN-1, H₂O₂ und HX/XO allein (grau unterlegte Säulen) oder mit der Kombination aus SIN-1/H₂O₂ bzw. SIN-1/HX/XO (schwarze Säulen) inkubiert.

Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen (offene Säulen) als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit den Vitalitätswerten der H₂O₂ oder HX/XO-Inkubationen reduziert um den Vitalitätsverlust der SNAP oder SIN-1-Einzelinkubationen (*Student's t-Test*).

3.5 Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Die Beteiligung von Zytokinen an der Zerstörung der pankreatischen B-Zellen konnte erstmals von Mandrup-Poulsen *et al.* (1985) gezeigt werden. Durch Inkubation von pankreatischen B-Zellen in Kulturüberständen aktivierter humaner mononukleärer Zellen konnte eine 80 - 90 %ige Inhibierung der Insulinsekretion gezeigt werden. Später wurde Interleukin-1 β (IL-1 β) als Hauptmediator identifiziert. In weiteren Studien konnten konzentrations- und zeitabhängige Zellschädigungen durch IL-1 β an pankreatischen B-Zellen und eine Potentierung der schädigenden Wirkung durch IFN- γ und TNF- α nachgewiesen werden (Mandrup-Poulsen *et al.* 1987). Als Hauptschädigungsmechanismus wurde in den letzten Jahren die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS oder NOS II) und die damit verbundene intrazelluläre Bildung von NO angesehen (Kolb & Kolb-Bachofen 1992). Mögliche protektive Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in insulinproduzierenden Zellen gegenüber der Interleukin-1 β - und Zytokin-medierten Toxizität sollten durch Inkubationsversuche mit diesen Signalstoffen untersucht werden.

3.5.1 MTT-Vitalitätstest nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit Interleukin-1 β

Die Vitalität der Interleukin-1 β exponierten RINm5F-Zellen wurde nach einer 72 h Inkubation durch den MTT-Test bestimmt. Neben unbehandelten Kontrollen wurden Zellen mit 60 U/ml, 300 U/ml und 600 U/ml IL-1 β inkubiert.

Bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen, aber auch bei allen transfizierten Zellklonen konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität beobachtet werden (siehe Abb. 3.20). Die nach der Inkubation im MTT-Test meßbare Restvitalität betrug bei der höchsten verwendeten Konzentration von 600 U/ml IL-1 β 76 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellklonen auftretende Unterschiede in der Resistenz gegenüber der durch IL-1 β induzierten Zellschädigung erwiesen sich als nicht signifikant (siehe Abb. 3.20).

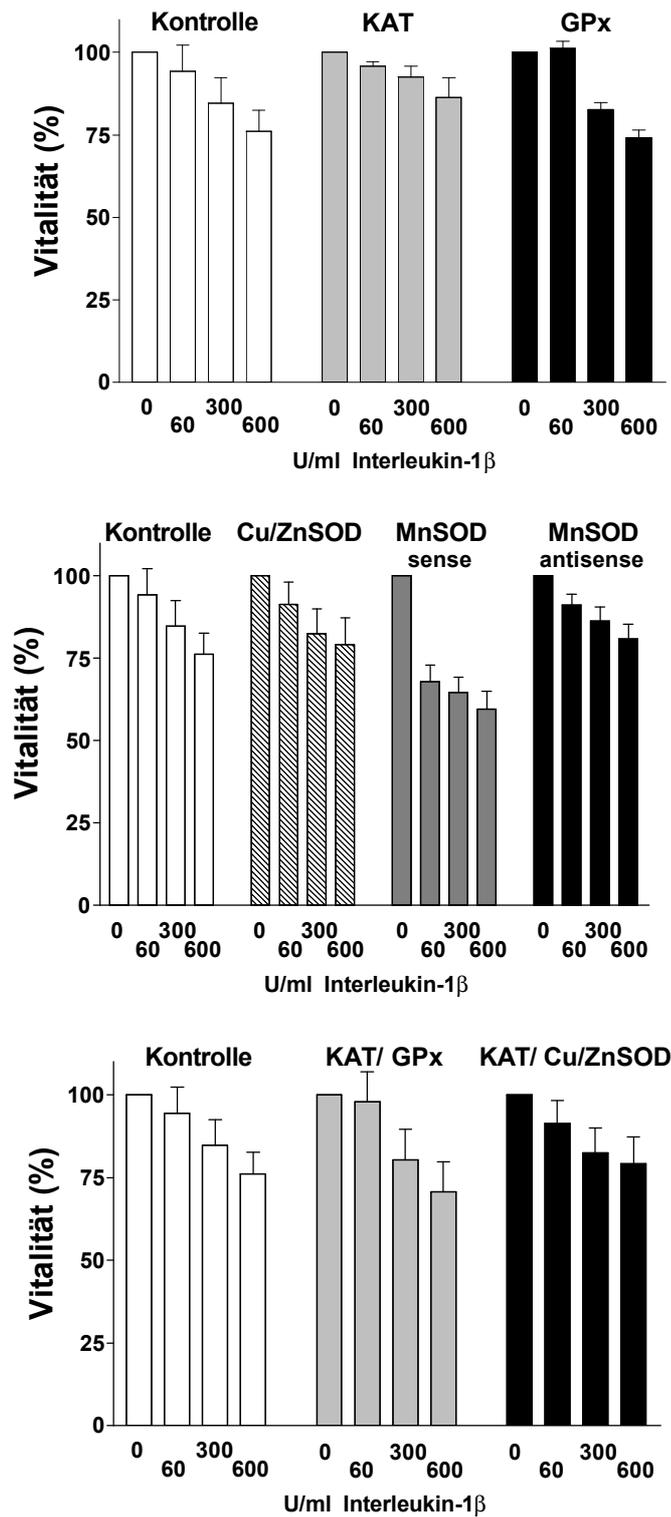


Abb. 3.20: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber der durch Interleukin-1 β induzierten Toxizität

RINm5F-Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von humanem Interleukin-1 β in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Vitalität wurde anschließend im MTT-Test ermittelt und für die prozentualen Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (ANOVA-Test/Dunnett's-Test).

3.5.2 MTT-Vitalitätstest nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ

RINm5F-Zellen wurden für 72 h mit einer Mischung der B-zelltoxischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ inkubiert. Verwendet wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen, wobei das Verhältnis der Zytokinkonzentrationen untereinander beibehalten wurde: Die höher konzentrierte Mischung (in den folgenden Abbildungen mit 1 bezeichnet) bestand aus 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α und 14 U/ml IFN- γ . Die Konzentration der zweiten verwendeten Zytokinlösung (in den folgenden Abbildungen mit 0,5 bezeichnet) war mit 30 U/ml IL-1 β , 92,5 U/ml TNF- α und 7 U/ml IFN- γ genau halb so konzentriert.

Unter Verwendung dieses Zytokingemisches zeigten nicht transfizierte RINm5F-Zellen nach 72 h Inkubation eine Restvitalität von 44 % bei Verwendung der niedriger konzentrierten 0,5x Zytokinmischung und 33 % bei der Verwendung der vollen Konzentration (siehe Abb. 3.21). Durch die Überexpression der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase wurde ein signifikanter Schutz gegenüber der durch die Zytokinmischung induzierten Zellschädigungen erreicht. So betrug die Vitalität der GPx-Zellen 76 % (0,5x Zytokinmischung) bzw. 71 % (1x Zytokinmischung). Ein ebenfalls signifikanter Schutz wurde mit der Transfektion von Cu/ZnSOD oder der kombinierten Überexpression von KAT und GPx erreicht. MnSOD überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten mit 30 % (0,5x Zytokinmischung) und 24 % (1x Zytokinmischung) die geringsten Restvitalitäten nach der Zytokininkubation. Die Reduktion der MnSOD-Expression in den MnSOD *antisense* Zellen führte zu einer leicht erhöhten Resistenz gegenüber den untersuchten Zytokinen, so daß die Vitalität noch 55 % (0,5x Zytokinmischung) und 44 % (1x Zytokinmischung) betrug. Beide Ergebnisse erwiesen sich in der statistischen Überprüfung als nicht signifikante Abweichungen.

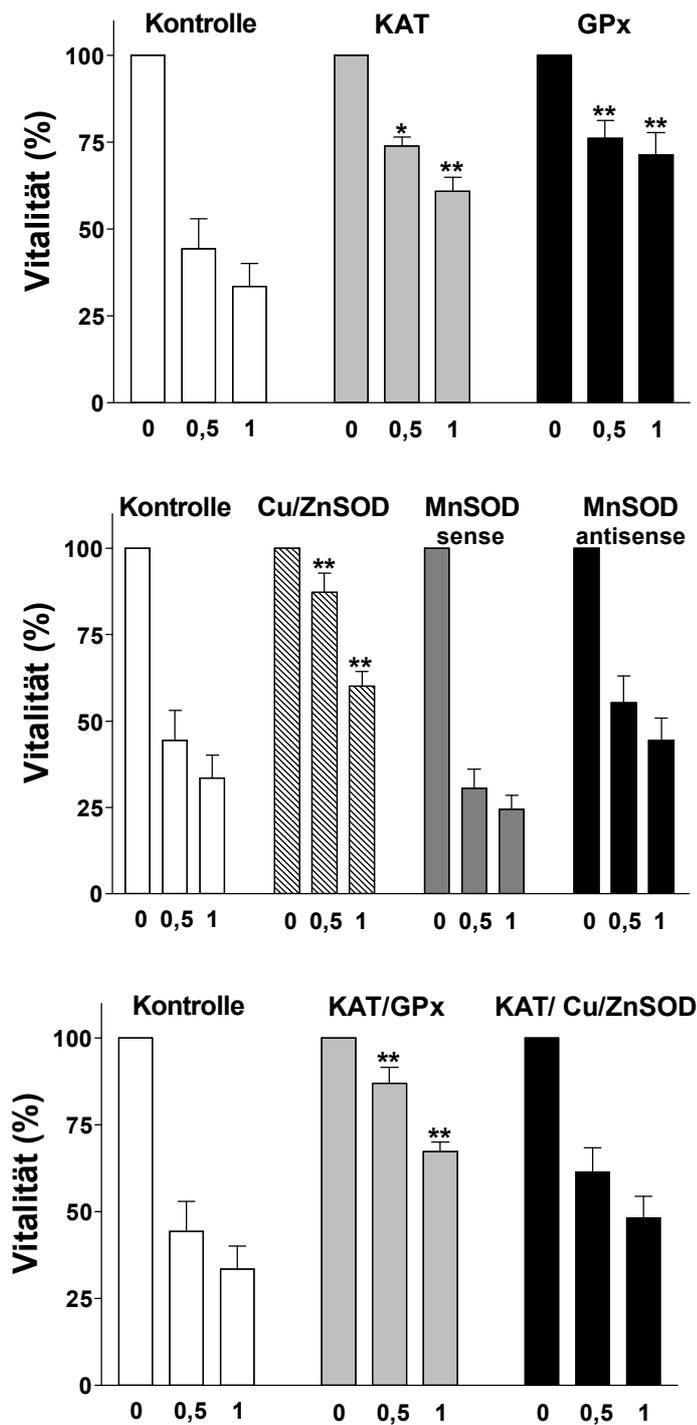


Abb. 3.21: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen gegenüber der durch ein Zytokingemisch induzierten Toxizität

RINm5F-Zellen wurden für 72 h mit einem Zytokingemisch bestehend aus humanem Interleukin-1 β , humanem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Ratten-Interferon- γ (IFN- γ) in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. 0,5 = 30 U/ml IL-1 β , 92,5 U/ml TNF- α , 7 U/ml IFN- γ , 1 = 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α , 14 U/ml IFN- γ . Die Vitalität wurde anschließend im MTT-Test ermittelt und für die prozentualen Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (ANOVA-Test/Dunnett's-Test).

Die nach der Zytokininkubation im MTT-Test quantifizierten unterschiedlichen Restvitalitäten der RINm5F-Zellen ermöglichten die Aussage, daß eine reduzierte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen vorliegt. Die differenzierte Aussage, ob durch Zytokinexposition eine funktionelle Schädigung der Zelle mit nachfolgendem Zelltod oder eine Reduktion der Zellproliferationsrate durch die Zytokine verursacht wurde, ermöglichten erst die weiteren Untersuchungen. Die Messung der Proliferation nach unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten erfolgte durch Detektion des in die DNA eingebauten BrdU in einem spezifischen *ELISA*. Die Bestimmung des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch die Färbung mit Propidiumjodid und/oder dem Hoechstfarbstoff HOE33342. Mit der Verwendung dieser Färbemethode waren gleichzeitig Aussagen zum Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen möglich.

3.5.3 Proliferationsuntersuchungen nach Inkubation von transfizierten RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ

Die Proliferationsmessung nach Exposition mit einer Mischung aus 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α und 14 U/ml IFN- γ verursachte sowohl bei transfizierten als auch bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen eine zeitabhängige Abnahme der Proliferationsrate. Nach 24 h Zytokininkubation reduzierte sich bei nicht transfizierten Kontrollzellen die Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 77 %, nach 48 h auf 60 % und nach 72 h auf 55 %. KAT, GPx, Cu/ZnSOD und KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen zeigten während des beobachteten Zeitraums von 72 h eine durchweg höhere Proliferationsrate als nicht transfizierte Zellen. Nach 24 h zeigten die KAT transfizierten Zellen mit einer Zellteilungsrate von 91 % die höchsten Werte. Nach 48 h Zytokininkubation wurde bei diesen Transfektanten noch eine Proliferation von 83 % (KAT/GPx) bzw. 87 % (KAT) gemessen. Eine größere Reduktion der Proliferationsrate konnte nach 72 h Zytokinexposition festgestellt werden. Mit 74 % (Cu/ZnSOD) bzw. 72 % (GPx oder KAT/GPx) Restproliferationsrate konnten auch nach dieser dreitägigen Inkubationsphase signifikant erhöhte Werte gemessen werden. Transfektionen mit den MnSOD *sense*- und MnSOD *antisense*-Plasmidkonstrukten sowie die Doppeltransfektion KAT/Cu/ZnSOD ergaben im Vergleich zu nicht transfizierten RINm5F-Zellen keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate.

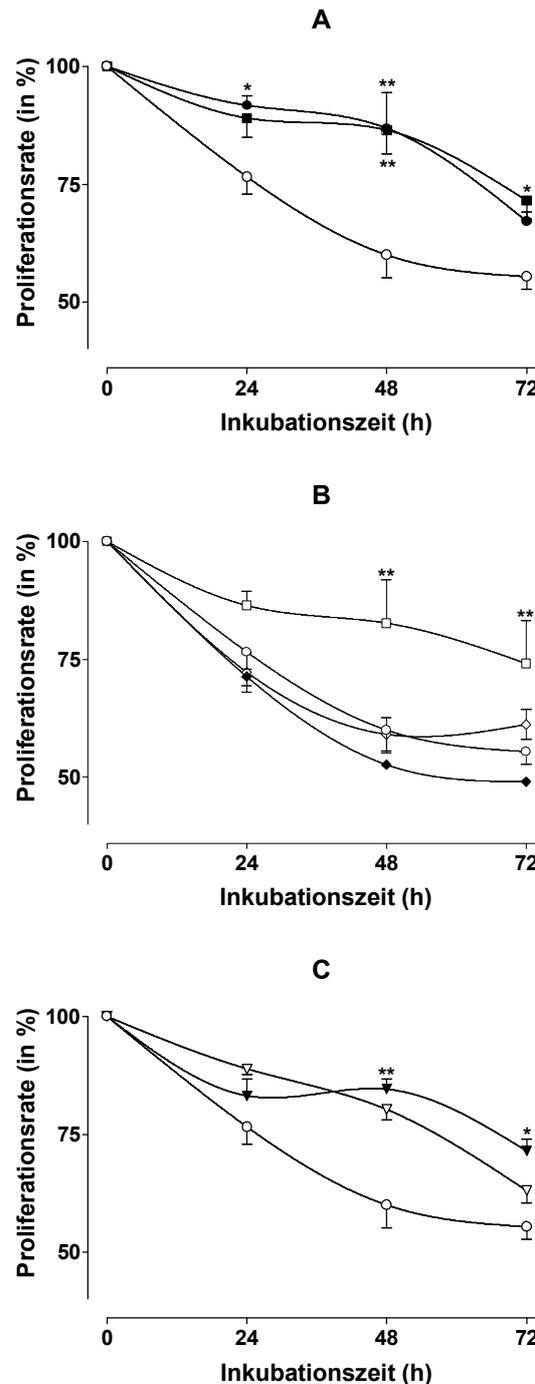


Abb. 3.22: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen auf die Proliferationsrate nach Exposition mit einem Zytokingemisch

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ▽ = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

RINm5F-Zellen wurden für bis zu 72 h mit einem Zytokingemisch bestehend aus 60 U/ml humanem Interleukin-1 β , 185 U/ml humanem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und 14 U/ml Ratten-Interferon- γ (IFN- γ) in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Proliferationsrate wurde anschließend im BrdU *ELISA* ermittelt und für die prozentualen Proliferationsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen.

3.5.4 Fluoreszenz-Differentialfärbung von RINm5F-Zellen nach Inkubation mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ

Die schädigende Wirkung von Zytokinen auf insulinproduzierende Zellen wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Sowohl apoptotische als auch nekrotische Befunde wurden an pankreatischen Inselzellen, insulinproduzierenden Zellkulturlinien und im *in vivo* Tiermodell beobachtet (Mauricio & Mandrup-Poulsen 1998; Suarez Pinzon *et al.* 1997). Durch die gewählte Färbemethode mit Propidiumjodid und dem Hoechstfarbstoff HOE33342 konnten beide Zelltodformen erfaßt werden.

Unter Verwendung der Zytokinmischung, bestehend aus 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α und 14 U/ml IFN- γ , konnte eine zeitabhängige Zunahme des Zelltodes bei den nicht transfizierten RINm5F-Kontrollzellen registriert werden. Nach 24 h Zytokinexposition betrug der Anteil toter Zellen bereits 20 % aller erfaßten Zellen und stieg während des weiteren Versuchsverlaufs auf 53 % nach 48 h und auf 61 % nach 72 h an. Sowohl die Katalase als auch die Glutathionperoxidase-Überexpression reduzierten die nach Zytokinexposition nachgewiesenen toten Zellen auf ein über den gesamten Versuchszeitraum konstantes Niveau von 3,1 – 6,4 %. Eine Reduktion des durch Zytokinexposition verursachten Zelltodes auf vergleichbar niedrige Werte wurde auch bei den Cu/ZnSOD und MnSOD antisense Transfektanten erreicht. Der berechnete Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl lag zwischen 0,8 % und 5,5 %. Die Überexpression der MnSOD führte nach 24 h Zytokinexposition zu einem prozentualen Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl von 19 %, erhöhte sich nach 48 h auf 27 % und betrug nach 72 h Zytokinexposition 21 % von der Gesamtzellpopulation. Durch die Doppeltransfektion der KAT/GPx- und KAT/Cu/ZnSOD-Plasmidkonstrukte konnte der Anteil toter Zellen nach Exposition mit der Zytokinmischung signifikant reduziert werden. Über den 72 h andauernden Inkubationszeitraum blieb bei diesen Doppeltransfektanten der Anteil toter Zellen im Bereich von 1,2 % und 7,1 % und war somit mit den Einzeltransfektanten vergleichbar.

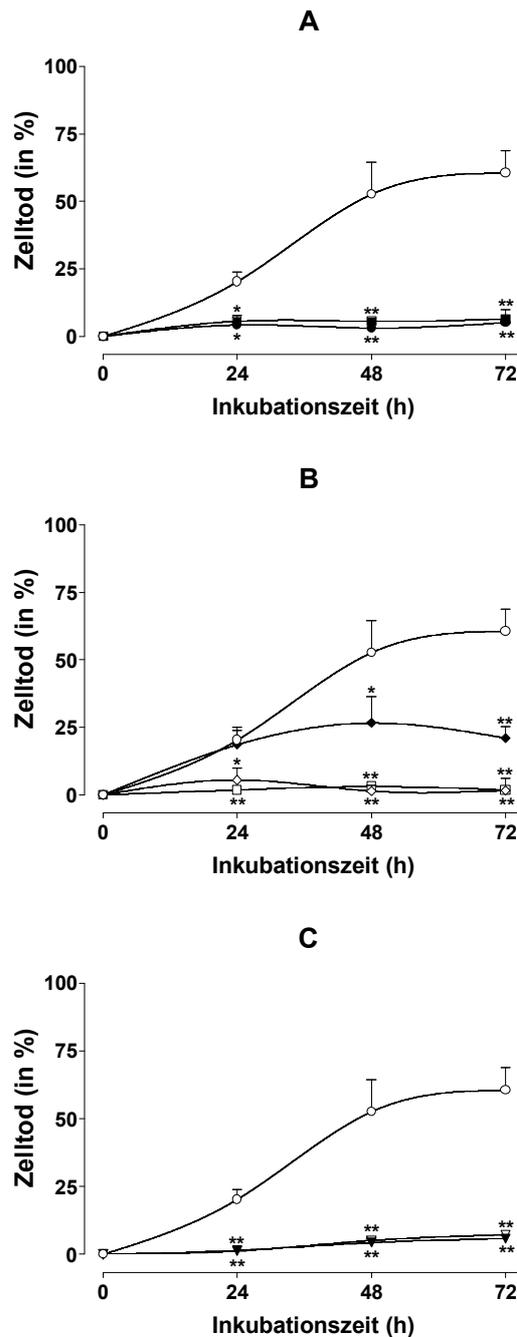


Abb. 3.23: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen auf den Anteil toter Zellen nach Exposition mit einem Zytokingemisch

A: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ● = GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ■ = KAT transfizierte RINm5F-Zellen. B: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, □ = Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen, ◆ = MnSOD *sense* transfizierte RINm5F-Zellen, ◇ = MnSOD *antisense* transfizierte RINm5F-Zellen. C: ○ = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, ⊙ = KAT/GPx transfizierte RINm5F-Zellen, ∇ = KAT/Cu/ZnSOD transfizierte RINm5F-Zellen.

RINm5F-Zellen wurden für bis zu 72 h mit einem Zytokingemisch bestehend aus 60 U/ml humanem Interleukin-1 β , 185 U/ml humanem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und 14 U/ml Ratten-Interferon- γ (IFN- γ) in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Anzahl vitaler bzw. toter Zellen nach Zytokinexposition wurde durch Differentialfärbung mit PI und HOE33342 ermittelt. Für die Prozentangaben wurde der Anteil toter Zellen (Zelltod nach Zytokinexposition – spontaner Zelltod) an der gezählten Gesamtzellzahl bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit nicht transfizierten RINm5F-Zellen (ANOVA-Test/Dunnnett's-Test).

Die durch die Differentialfärbung ermöglichte Unterscheidung des Zelltodes in apoptotische und nekrotische Formen ist in Tab. 3.13 dargestellt. Nicht transfizierte RINm5F-Zellen und MnSOD *sense* transfizierte Zellen wiesen, wie in Abb. 3.21 gezeigt, die größten Anteile abgestorbener Zellen an der Gesamtzellpopulation auf. Diese massiven Anstiege in der Anzahl toter Zellen sind bei beiden Zellklonen auf einen massiven Anstieg nekrotischer Zellen zurückzuführen. So betrug der Anteil nekrotischer Zellen am Gesamtanteil toter Zellen nach 48 h bzw. 72 h zwischen 94 % und 99 %. Nach einem Inkubationszeitraum von 24 h beträgt der Anteil nekrotischer Zellen 71 % (nicht transfizierte RINm5F-Zellen) bzw. 81 % (MnSOD *sense*-Zellen). Die Initiierung apoptotischer Prozesse im Inkubationsverlauf als Ursache für die beobachteten starken Anstiege der Zelltodereignisse kann damit ausgeschlossen werden. Die anderen Zellklone, bei denen der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl konstant weniger als 8 % betrug, zeigten sehr stark schwankende Anteile nekrotischer oder apoptotischer Zellen. Die Anzahl nachweisbarer Zelltodereignisse bewegt sich hierbei nur unwesentlich über dem Niveau der gleichzeitig durchgeführten Kontrollinkubationen. Anteile apoptotischer Zellen bei diesen Transfektanten von über 50 % sind absolut gesehen nur ein geringer Anteil an der Gesamtzellzahl.

Zellklone	Anteil nekrotischer Zellen (%)			Anteil apoptotischer Zellen (%)		
	24 h	nach 48 h	72 h	24 h	nach 48 h	72 h
RINm5F-Kontrollzellen	71 ± 3	98 ± 4	99 ± 4	29 ± 2	2 ± 1	1 ± 2
KAT	56 ± 11	99 ± 11	50 ± 15	44 ± 4	1 ± 7	50 ± 29
GPx	37 ± 43	57 ± 4	78 ± 19	63 ± 18	43 ± 3	22 ± 21
Cu/ZnSOD	50 ± 19	92 ± 5	50 ± 24	50 ± 20	8 ± 4	50 ± 38
MnSOD <i>sense</i>	81 ± 5	94 ± 6	99 ± 5	19 ± 3	6 ± 1	1 ± 2
MnSOD <i>antisense</i>	96 ± 8	78 ± 18	94 ± 18	4 ± 6	22 ± 3	6 ± 28
KAT/GPx	66 ± 8	89 ± 6	73 ± 22	34 ± 5	11 ± 5	27 ± 23
KAT/Cu/ZnSOD	78 ± 6	83 ± 10	95 ± 12	22 ± 3	17 ± 5	5 ± 4

Tab. 3.13: Effekte der Überexpression zytoprotektiver Enzyme in RINm5F-Zellen auf den apoptotischen und nekrotischen Zelltod nach Exposition mit einer Zytokinnischung

RINm5F-Zellen wurden für bis zu 72 h mit einer Zytokinnischung bestehend aus 60 U/ml humanem Interleukin-1 β , 185 U/ml humanem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und 14 U/ml Ratten-Interferon- γ (IFN- γ) in glucosehaltigem RPMI-1640 Medium inkubiert. Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Zytokinexposition wurde durch Differentialfärbung mit PI und HOE33342 ermittelt. Für die Prozentangaben wurde der Anteil nekrotischer oder apoptotischer Zellen (Zelltod nach Zytokinexposition – spontaner Zelltod) an der Gesamtzahl toter Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus jeweils 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.5.5 Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Inkubation mit Interleukin-1 β oder Wasserstoffperoxid

Die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in B-Zellen des Pankreas durch IL-1 β oder durch die Kombination der B-zelltoxischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ wird durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren mediiert. Promotorstudien zeigten, daß insbesondere der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B für diese Aktivierung verantwortlich ist (Darville & Eizirik 1998). Zusätzlich konnte in anderen zellulären Systemen eine Aktivierung durch oxidative Einflüsse, insbesondere durch H₂O₂, gezeigt werden (Schreck *et al.* 1991). Für die Untersuchung einer NF- κ B Aktivierung durch IL-1 β oder H₂O₂ wurden RINm5F-Zellen mit diesen beiden Substanzen inkubiert. Aus diesen Zellen gewonnene Kernextrakte wurden in *Gel Shift*-Analysen untersucht. Die Untersuchungen wurden exemplarisch mit nicht transfizierten Kontrollzellen und mit KAT- und GPx-transfizierten Zellen durchgeführt, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Zytokinen aufwiesen. Die Nicht-Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B als Grund für den beobachtbaren erhöhten Schutz gegenüber Zytokinen ist in diesem Versuchsansatz untersuchbar.

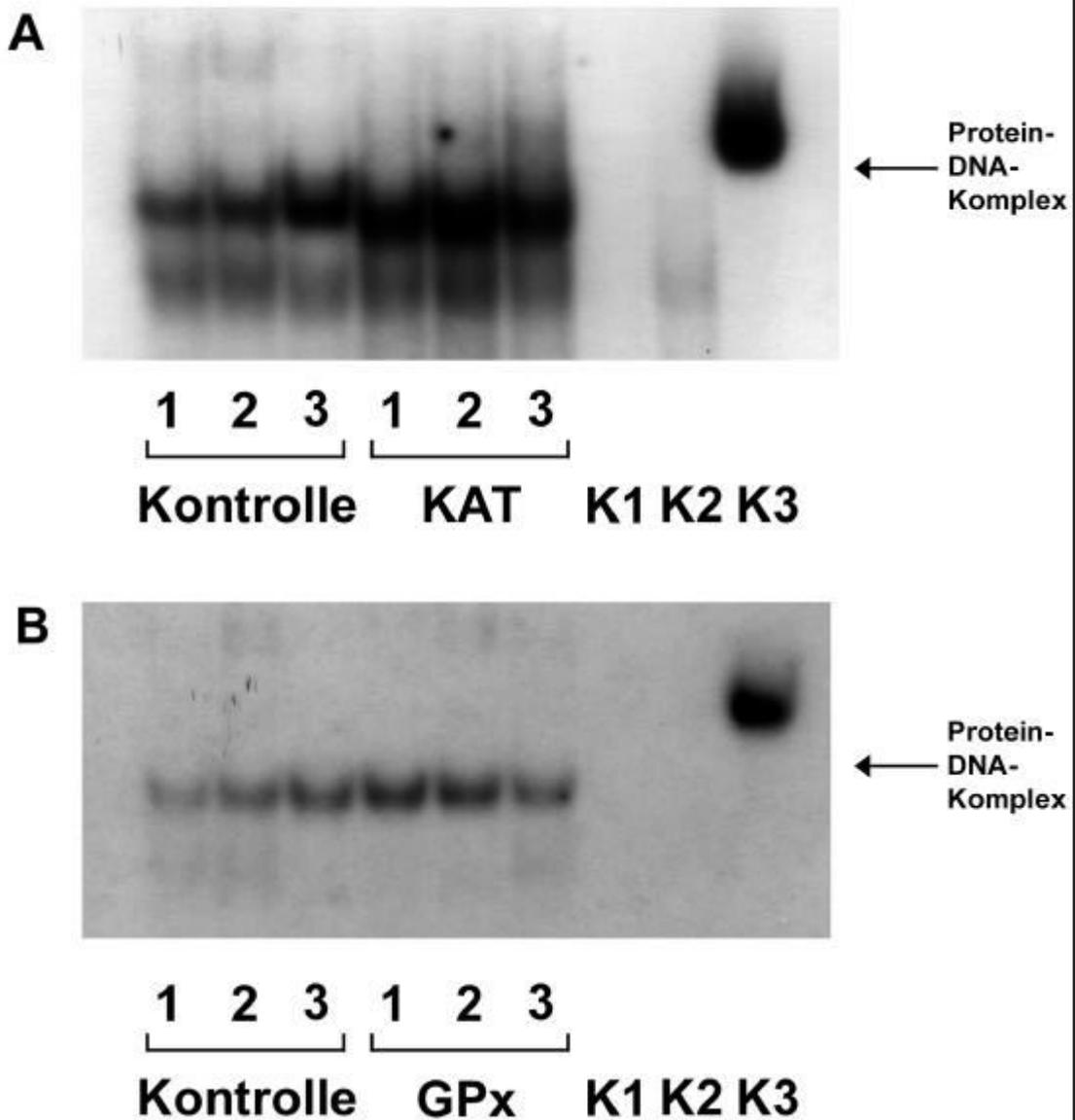


Abb. 3.24: *Gel Shift*-Analyse des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit Interleukin-1 β

Kontrolle 1: RINm5F-Zellen, 15 min Kontrollinkubation; Kontrolle 2: RINm5F-Zellen, 5 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β ; Kontrolle 3: RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β ; KAT/GPx 1: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Kontrollinkubation; KAT/GPx2: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 5 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β ; KAT/GPx 3: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β ; K1: RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Kompetitor-Oligonukletid; K2: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 60 U/ml IL-1 β zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Kompetitor-Oligonukletid; K3: radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit der humanen rekombinanten NF- κ B-Untereinheit p50.

Aufgetragen wurden 0,28 pmol NF- κ B bindendes Oligonukleotid mit einer Aktivität von ca. $10 - 15 \times 10^5$ cpm (bei K1 und K2 zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid) und 250 ng Protein aus Zellkernen/Bahn. Die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors wurde durch Exposition des getrockneten Gels auf einem Autoradiographiefilm detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

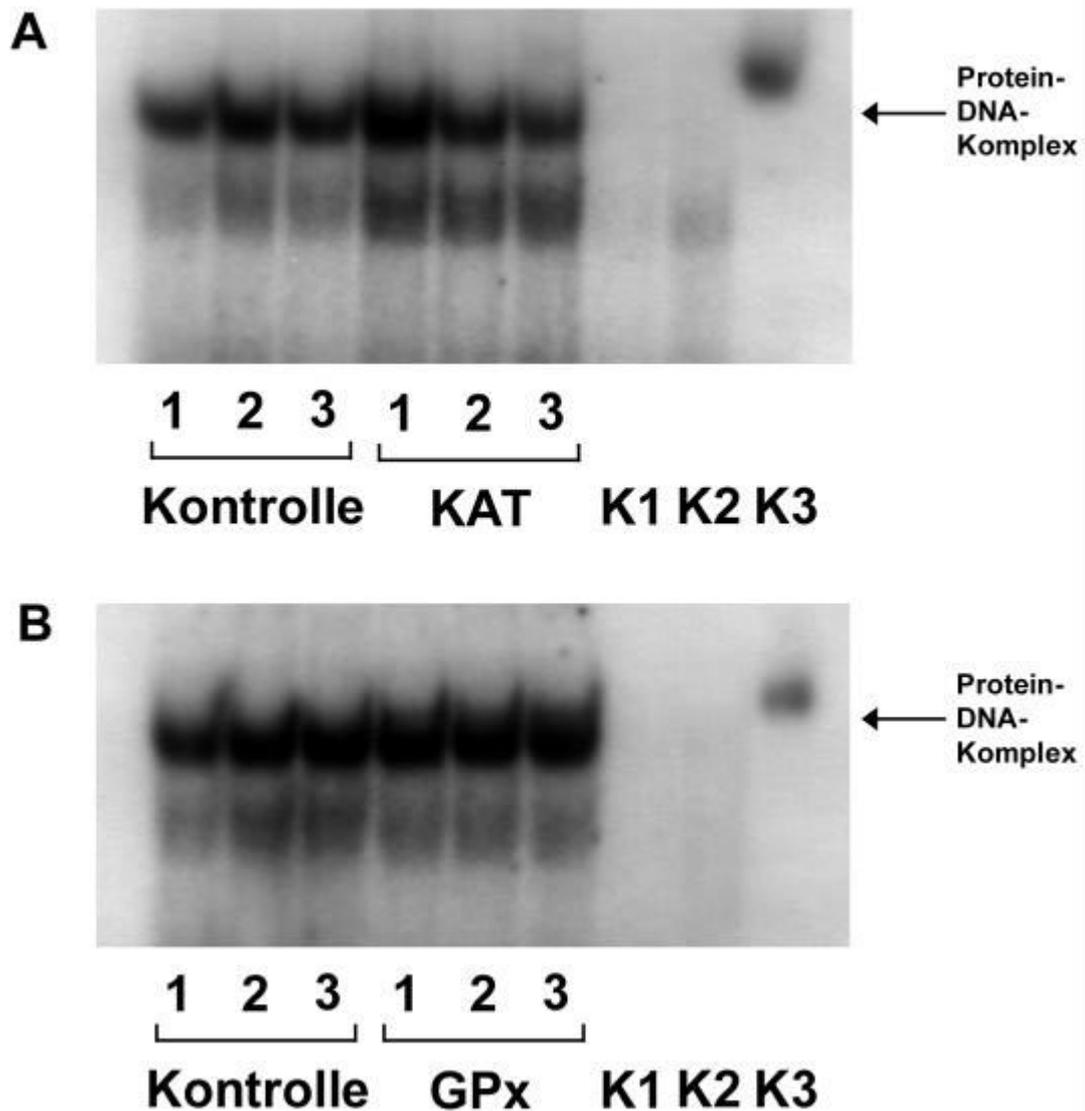


Abb. 3.25 *Gel Shift*-Analyse der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit H₂O₂

Kontrolle 1: RINm5F-Zellen, 15 min Kontrollinkubation; Kontrolle 2: RINm5F-Zellen, 5 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂; Kontrolle 3: RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂; KAT/GPx 1: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Kontrollinkubation; KAT/GPx2: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 5 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂; KAT/GPx 3: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂; K1: RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂ zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Kompetitor-Oligonukletid; K2: KAT oder GPx transfizierte RINm5F-Zellen, 15 min Inkubation mit 10 μ M H₂O₂ zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Kompetitor-Oligonukletid; K3: radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit der humanen rekombinanten NF- κ B-Untereinheit p50.

Aufgetragen wurden 0,28 pmol NF- κ B bindendes Oligonukleotid mit einer Aktivität von ca. $10 - 15 \times 10^5$ cpm (bei K1 und K2 zusätzlich 1,75 pmol nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid) und 250 ng Protein aus Zellkernen/Bahn. Die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors wurde durch Exposition des getrockneten Gels auf einem Autoradiographiefilm detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die durchgeführten *Gel Shift*-Analysen erbrachten eine spezifische Bindung des NF- κ B-Proteins an die im radioaktiv markierten Oligonukleotid enthaltene Konsensussequenz. Sowohl nicht transfizierte RINm5F-Zellen als auch KAT oder GPx überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten bereits unter Kontrollbedingungen eine detektierbare Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abb. 3.24 und Abb. 3.25, Kontrolle 1). Inkubationen mit IL-1 β oder H₂O₂ erbrachten keine oder nur eine geringe Steigerung der Aktivierung bzw. der DNA-Bindung. Unterschiede zwischen nicht transfizierten Kontrollzellen und überexprimierenden RINm5F-Zellen bestanden dabei nicht. Die Spezifität der NF- κ B/DNA-Wechselwirkung wurde durch Bindungsversuche mit einem Überschuß nicht radioaktiv markierter Oligonukleotide bestätigt (Abb. 3.24 und Abb. 3.25, K 1 und K 2). Bei allen drei verwendeten Zellklonen konnte durch den Zusatz nicht radioaktiv markierter Oligonukleotide die Bindung an das in geringerer Konzentration vorliegende markierte Oligonukleotid verhindert werden. Die in den Ansätzen, in denen nur radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet wurden, detektierbaren Signale konnten so verhindert werden. Eine weitere Spezifitätsüberprüfung war die Verwendung der rekombinaten NF- κ B-Untereinheit p50, die in den *Gel Shift*-Untersuchungen ebenfalls eine singuläre Bande unter Verwendung der radioaktiv markierten Konsensussequenz zeigte.

3.5.6 *Western-Blot*-Analysen der induzierbaren NO-Synthase nach Interleukin-1 β Inkubation

Die Proteinexpressionsstudien der induzierbaren NO-Synthase wurden nach 6 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-1 β durchgeführt. Der gewählte Zeitraum gewährleistete die vollständige transkriptionelle Aktivierung und die sich anschließende Proteintranslation des Enzyms. Eine Ausdehnung der Inkubationsdauer wurde angesichts der Selbstinhibierung der iNOS-Expression durch gebildetes NO und eine möglicherweise einsetzende Zellschädigung nicht durchgeführt.

Bei allen Zellklonen konnte nach 6stündiger Inkubation mit IL-1 β eine konzentrationsabhängige Induktion der iNOS in den durchgeführten *Western-Blot*-Analysen detektiert werden. Nach Inkubationen von nicht transfizierten Kontrollzellen mit 60 U/ml IL-1 β konnte eine schwache iNOS-Proteinexpression detektiert werden. Eine Konzentrationserhöhung auf 600 U/ml bewirkte eine weitere Expressionssteigerung, die durch Verwendung noch höherer IL-1 β Konzentrationen oder unter Verwendung eines Zytokingemisches nicht weiter gesteigert werden konnte. Alle transfizierten Zellklone zeigten ebenfalls eine Aktivierung der iNOS Expression unter IL-1 β . Das detektierbare Expressionsniveau ist mit dem der nicht transfizierten RINm5F-Zellen zu vergleichen. Es lag bei Verwendung einer IL-1 β

Konzentration von 60 U/ml sogar etwas höher als bei den Kontrollen. Somit liegt in den transfizierten Zellklonen aufgrund der Überexpression zytoprotektiver Enzyme keine Hemmung der iNOS-Induktion vor. Sowohl die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B als auch die Induktion der iNOS-Proteinexpression läßt sich durch Modulation des antioxidativen Abwehrstatus nicht verhindern.

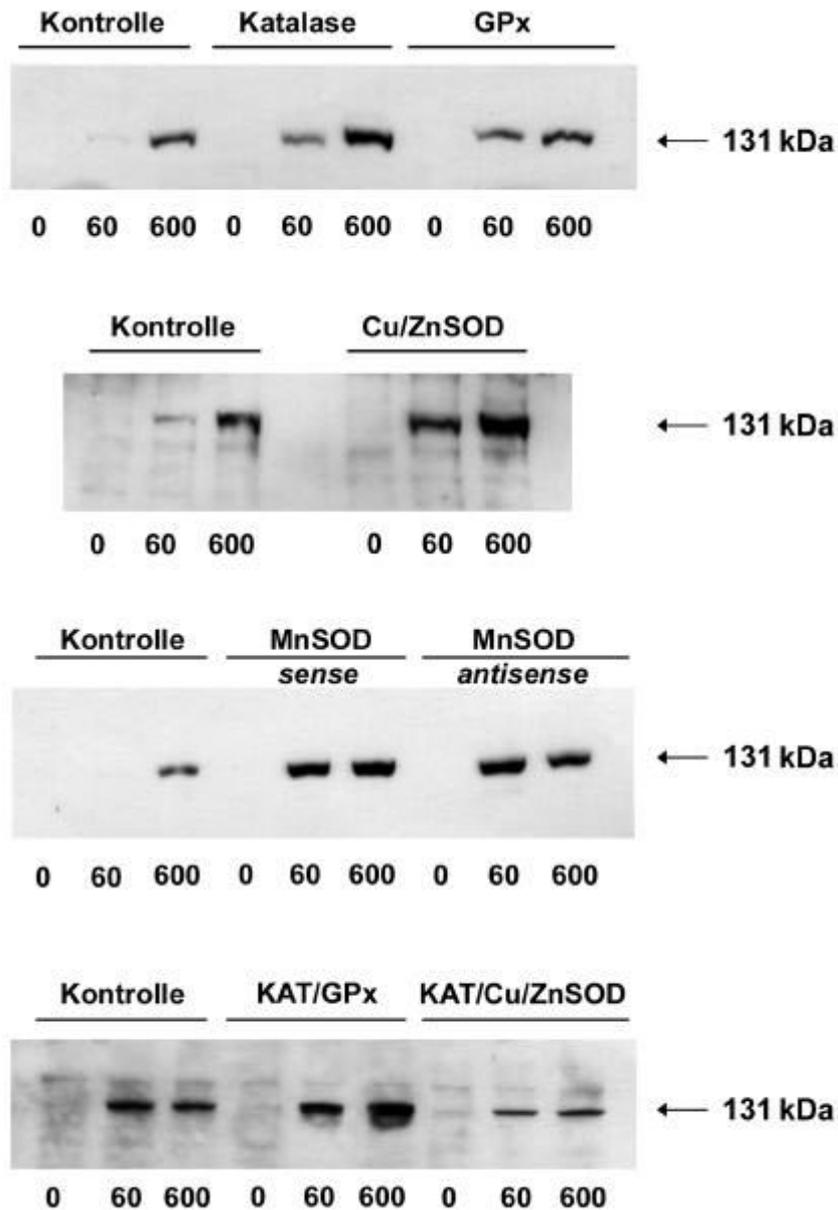


Abb. 3.26: Western-Blot-Analyse der induzierbaren NO-Synthase in RINm5F-Zellen nach 6 h Inkubation mit Interleukin-1 β

0 = Kontrollinkubation von RINm5F-Zellen ohne Interleukin-1 β , 60 = Inkubation von RINm5F-Zellen mit 60 U Interleukin-1 β , 600 = Inkubation von RINm5F-Zellen mit 600 U Interleukin-1 β . Aufgetragen wurden 50 μ g Protein/Bahn. Die Proteinexpression wurde durch einen spezifisch gegen die induzierbare NO-Synthase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.5.7 Bestimmung akkumulierten Nitrits nach 72 h Inkubation mit Zytokinen

Die durchgeführten Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die *Western-Blot*-Analysen der iNOS haben gezeigt, daß unabhängig von der durchgeführten Transfektion die Induktion der induzierbaren NO-Synthase nicht zu verhindern ist. Für die Beurteilung der Resistenz transfizierter RINm5F-Zellen gegenüber der durch Zytokine medierte Zelltoxizität wurde in einem weiteren Schritt die NO-Produktion nach Zytokininkubation gemessen. Da der direkte Nachweis von NO sehr aufwendig und störanfällig ist, wurde das im Zellkulturmedium akkumulierte Nitrit gemessen.

Nach 72stündiger Exposition von RINm5F-Zellen gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen IL-1 β (60 – 600 U/ml) und einem Gemisch der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ lagen die im Zellkulturüberstand meßbaren Nitritkonzentrationen im Bereich von 0,2 – 0,3 μ M. Zellkulturüberstände von Kontrollinkubationen ohne Zytokinzusatz wiesen mit 0,006 μ M Nitritkonzentrationen auf, die an der Nachweisgrenze lagen. Wurden Zellen gleichzeitig mit dem 1x Zytokingemisch und N ω -Nitro-L-Arginin, einem Inhibitor der NO-Synthase inkubiert, so lag auch in diesem Zellkulturmedium der Nitritgehalt an der Nachweisgrenze. Für alle Einzel- und Doppeltransfektanten konnte unter Zytokinstimulation eine erhöhte Produktion von NO aufgezeigt werden. Diese konnte durch Koinkubation mit N ω -Nitro-L-Arginin verhindert werden. Signifikante Unterschiede in der Nitritakkumulation zwischen nicht transfizierten RINm5F-Kontrollzellen und transfizierten RINm5F-Zellen konnten statistisch nicht ermittelt werden.

Trotz großer Unterschiede in ihrem toxischen Potential (siehe auch 3.5.1 und 3.5.2) produzierten die unterschiedlichen IL-1 β Konzentrationen und das verwendete Zytokingemisch vergleichbare Mengen NO.

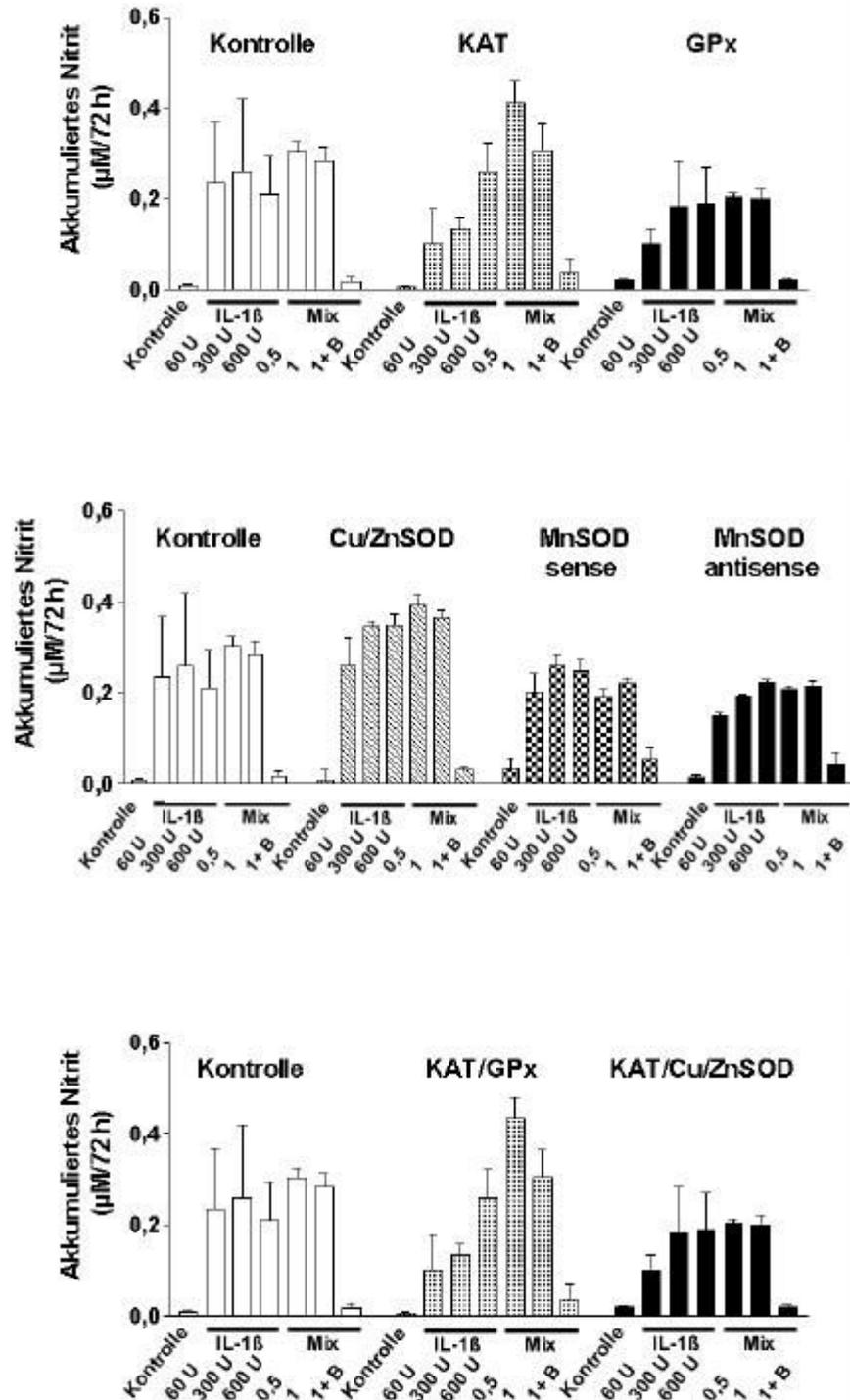


Abb. 3.27: Messung des im Zellkulturmedium akkumulierten Nitrits nach 72 h Inkubation mit Zytokinen

Kontrolle = Kontrollinkubation von RINm5F-Zellen ohne Zytokine, IL-1 β 60, 300, 600 U = Inkubation von RINm5F-Zellen mit 60 U/ml, 300 U/ml oder 600 U/ml Interleukin-1 β , Mix 0,5 = Inkubation von RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus 30 U/ml IL-1 β , 92,5 U/ml TNF- α , 7 U/ml IFN- γ , Mix 1 = Inkubation von RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α , 14 U/ml IFN- γ , 1Mix+B = Mix 1 = Inkubation von RINm5F-Zellen mit einem Zytokingemisch aus 60 U/ml IL-1 β , 185 U/ml TNF- α und zusätzlich 5 mM des NO-Synthaseinhibitors N ω -Nitro-L-Arginin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 – 6 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4 Diskussion

4.1 Enzymatische Abwehrmechanismen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies in insulinproduzierenden Zellen

Alle unter aeroben Bedingungen lebenden Zellen sind durch unterschiedliche antioxidative Enzymsysteme gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies geschützt. Direkte Protektion bieten die sauerstoffradikalaktivierenden Enzyme (Superoxiddismutasen, Katalase und Glutathionperoxidasen) und indirekte die unterschiedlichen Streß- und Hitzeschockproteine. Wie Halliwell & Gutteridge (1995) in ihrer Beurteilung von Sauerstoffradikalen für die Entstehung von Krankheiten hervorheben, ist die Exposition gegenüber freien Radikalen nicht zellspezifisch. Es sind vielmehr die Abwehr- und Reparaturmechanismen, die darüber entscheiden, ob eine Zelle überlebt oder durch direkte bzw. indirekte Schädigungen von Zellstrukturen zerstört wird.

Das extrem niedrige Expressionsniveau der zytoprotektiven Enzyme, insbesondere der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase (Grankvist *et al.* 1981; Lenzen *et al.* 1996), in B-Zellen des Pankreas führt zu einer im Vergleich zu anderen Zelltypen sehr geringen Resistenz gegenüber Radikal-medierten Zellschäden (Kröncke *et al.* 1993). Die Beteiligung von freien Sauerstoffradikalen und NO am Schädigungsprozeß der pankreatischen B-Zellen im Autoimmundiabetes und chemischen Diabetes (Streptozotocin- und Alloxandiabetes) wurde von mehreren Autoren beschrieben. Eine Übersicht wird bei Wolff (1993) gegeben.

Typische Streßfaktoren wie z.B. hohe Glucosekonzentrationen, Hitzeschock oder ein hoher Sauerstoffpartialdruck vermochten keine Steigerung des antioxidativen Abwehrstatus in B-Zellen des Pankreas auszulösen (Tiedge *et al.* 1997). Es war das Ziel der vorliegenden Dissertation, das im Vergleich zu anderen Geweben extrem niedrige Expressionsniveau der zytoprotektiven Enzyme Katalase, Glutathionperoxidase, Cu/ZnSOD und MnSOD in der insulinproduzierenden RINm5F-Zelllinie durch stabile Transfektion mit eukaryotischen Expressionsvektoren zu beeinflussen. In anschließenden Expositionsversuchen gegenüber chemischen Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren wurde das zytoprotektive Potential der verschiedenen antioxidativen Enzyme charakterisiert. Zusätzlich zu der direkten Radikalexposition sollte auch die Resistenz dieser transfizierten Zellen gegenüber der Zytokin-medierten Zelltoxizität überprüft werden.

Die Evaluierung der toxischen Eigenschaften unterschiedlicher Radikalspezies für insulinproduzierende Zellen sowie das Aufzeigen von Möglichkeiten eines Zellschutzes durch die Überexpression verschiedener zytoprotektiver Enzyme standen dabei im Mittelpunkt der durchgeführten Studien.

4.2 Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit Sauerstoffradikal-Generatoren

Die Überexpression der Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase führte zu einem starken Anstieg der spezifischen Enzymaktivitäten auf 564 bzw. 3,9 U/mg Protein. Die überexprimierenden RINm5F-Zellen zeigten somit für jedes der Enzyme höhere Enzymaktivitäten als Hepatozyten (324 bzw. 0,76 U/mg Protein), die als Referenz für einen optimalen antioxidativen Enzymstatus gelten. Gegenüber H_2O_2 konnte in Übereinstimmung mit Studien an anderen Zellsystemen durch die Katalase-Überexpression eine starke Erhöhung des EC_{50} -Werts erreicht werden (Lindau-Shepard & Shaffer 1993; Mann *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu erbrachte die Überexpression der Glutathionperoxidase im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollen nur eine geringfügige Schutzwirkung gegenüber H_2O_2 . Auch konnte durch die zusätzliche Überexpression der Glutathionperoxidase zusammen mit der Katalase die Resistenz gegenüber H_2O_2 nicht weiter erhöht werden. Dieses Phänomen wird durch die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften beider Enzyme erklärt. Trotz annähernd gleicher Reaktionskonstanten von $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Katalase und $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Glutathionperoxidase (Halliwell & Gutteridge 1995) unterscheiden sich beide Enzyme hinsichtlich ihrer Affinitäten zu H_2O_2 . Aufgrund der niedrigen Substrataffinität kann Katalase bei hohen H_2O_2 Konzentrationen der Zelle einen effektiven Schutz vermitteln, während Glutathionperoxidase mit einer hohen Affinität für H_2O_2 nur bei niedrigen Konzentrationen eine optimale Schutzfunktion ausüben kann (Eaton 1991; Flohe & Brand 1969). Somit konnte bei hohen H_2O_2 Konzentrationen nur mit Katalase eine ausreichende Inaktivierung in RINm5F-Zellen erreicht werden.

Starke & Farber (1985) konnten zeigen, daß bei Inkubationsversuchen von Hepatozyten mit H_2O_2 in eisenhaltigem Medium sowohl der Zusatz von Katalase als auch der von Superoxiddismutase vor der H_2O_2 -vermittelten Toxizität schützte. Sie folgerten aus dieser Beobachtung, daß nicht H_2O_2 an sich, mit seiner im Vergleich zu anderen reaktiven Sauerstoffspezies geringen chemischen Reaktivität, für die beobachtete Toxizität verantwortlich ist. Vielmehr sollten die in der Haber-Weiss-Reaktion aus Superoxidradikalen und H_2O_2 entstandenen Hydroxylradikale die beobachteten Zellschädigungen auslösen. Dennoch konnte durch

Überexpression der zytosolischen Cu/ZnSOD oder der mitochondrial lokalisierten MnSOD in RINm5F-Zellen keine Erniedrigung des durch H_2O_2 bedingten Zelltodes beobachtet werden. Auch die Suppression der MnSOD ließ den EC_{50} -Wert gegenüber H_2O_2 unverändert, so daß die intrazelluläre Produktion von Hydroxylradikalen in Folge der Haber-Weiss-Reaktion als Hauptmechanismus der durch H_2O_2 bedingten Zellschädigung in insulinproduzierenden RINm5F-Zellen als unwahrscheinlich gelten kann.

Die durch kombinierte Überexpression von Cu/ZnSOD und Katalase erzielte weitere Erhöhung des EC_{50} -Werts im Vergleich zu Zellen, die allein Katalase überexprimieren, weist der Cu/ZnSOD dennoch eine wichtige Schutzwirkung zu. Die Reaktion von Superoxidradikalen mit den im Katalasemolekül komplexierten Fe^{3+} -Ionen zu Ferroxycatalase führt zur Inaktivierung des Enzyms (Halliwell & Gutteridge 1995). Die zusätzliche Überexpression der Cu/ZnSOD kann somit die Inaktivierung der Katalase durch Superoxidradikale verhindern (Kono & Fridovich 1982; Shimizu *et al.* 1984). In Übereinstimmung mit den intrazellulären Überexpressionen konnte in den extrazellulären Schutzversuchen (3.3.1) nur durch Zusatz von Katalase oder durch den kombinierten Zusatz von Katalase und Cu/ZnSOD zum Inkubationsmedium ein Zellschutz gegenüber H_2O_2 erreicht werden.

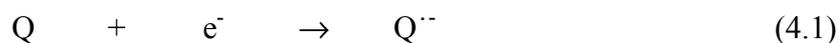
Das gleiche extrazelluläre enzymatische Schutzmuster konnte auch bei Inkubationen mit Hypoxanthin/Xanthinoxidase (HX/XO) beobachtet werden. Während durch den Zusatz von Katalase allein oder von Katalase zusammen mit Cu/ZnSOD ein vollständiger Schutz der RINm5F-Zellen erreicht wurde, blieb der alleinige Zusatz von Cu/ZnSOD wirkungslos. Fridovich (1970) konnte neben Superoxidradikalen auch die Entstehung von H_2O_2 durch das HX/XO-System nachweisen. Wie in früheren an Fibroblasten und Endothelzellen durchgeführten Untersuchungen (Jornot *et al.* 1991; Simon *et al.* 1981) kann der beobachtete zelltoxische Effekt des HX/XO-Systems gegenüber RINm5F-Zellen durch die kontinuierliche, extrazelluläre Generierung von H_2O_2 erklärt werden. Zusätzlich zu dem direkt freigesetzten H_2O_2 wird es aufgrund der hohen Spontandismutationsrate von Superoxidradikalen auch aus generierten Superoxidradikalen gebildet (Fridovich 1975).

Obwohl wie bei den mit H_2O_2 durchgeführten Versuchen nur H_2O_2 als direkt schädigende Verbindung angesehen werden kann, ist die Kinetik der H_2O_2 Freisetzung bei beiden Versuchsansätzen sehr unterschiedlich. Durch direkten Zusatz von H_2O_2 zum Inkubationsmedium wirken unmittelbar hohe Konzentrationen auf die Zellen ein. Die gute Permeabilität der Plasmamembran für H_2O_2 bewirkt eine schnelle Diffusion in die Zelle und entsprechend schnell bilden sich hohe intrazelluläre H_2O_2 Konzentrationen. Die enzymatische Freisetzung

von H_2O_2 während der HX/XO-Reaktion bewirkt, daß über einen ausgedehnten Zeitraum konstante Mengen an H_2O_2 freigesetzt werden. Die Überexpression der Katalase erbrachte von den Einzeltransfektionen den besten Schutz von RINm5F-Zellen, während von der Überexpression der Glutathionperoxidase aufgrund der kinetischen Eigenschaften nur eine geringere Protektion ausging. Somit ist davon auszugehen, daß die hohen intrazellulären H_2O_2 Konzentrationen bevorzugt durch die Katalase detoxifiziert wurden. Die kombinierte Überexpression von Katalase und Glutathionperoxidase in RINm5F-Zellen führte zu einem besseren Schutz als dies durch ein Enzym allein möglich war. Der Grund kann in der Inaktivierung des Katalaseenzym durch längere Inkubationszeiten mit niedrigen H_2O_2 Konzentrationen liegen (Nicholls 1964), die durch die Glutathionperoxidase umgesetzt werden können. Zusätzlich kann in den RINm5F-Zellen durch die ausgedehnte H_2O_2 Exposition die Bildung von organischen Peroxiden induziert werden, die durch Überexpression der Glutathionperoxidase verhindert werden kann (Flohe *et al.* 1976) und so zu einem verbesserten Zellschutz führt.

Die Verbesserung des durch die Katalase-Überexpression erreichten Schutzes aufgrund der zusätzlichen Cu/ZnSOD-Überexpression kann, wie oben bereits diskutiert, durch den Schutz des Katalaseenzymproteins durch die Cu/ZnSOD begründet sein. Andererseits werden durch Superoxidradikale initiierte Lipidperoxidationen (Thomas *et al.* 1982), die parallel zur H_2O_2 -vermittelten Zellschädigung ablaufen, durch die Cu/ZnSOD-Überexpression reduziert.

Mit Menadion sollte zusätzlich zu den oben beschriebenen extrazellulären Sauerstoffradikal-Generatoren eine intrazellulär aktivierbare Substanz verwendet werden. Die intrazelluläre Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Menadion (Powis 1989; Rosen *et al.* 1989) beruht auf einer einstufigen Reduktion des Menadions (Gleichung 4.1) durch Flavoenzyme zum entsprechenden Semiquinon (Chesis *et al.* 1984; Nakamura & Hayashi 1994). Durch Autooxidation kann das gebildete Semiquinon unter Superoxidfreisetzung wieder zu Menadion reagieren (Gleichung 4.2). Die spontane oder durch Superoxiddismutase katalysierte Dismutation führt schließlich zur Bildung von Wasserstoffperoxid (Gleichung 4.3).



Die Überexpression von Cu/ZnSOD allein verstärkte die durch Menadion bewirkte Zellschädigung, wohingegen die kombinierte Überexpression von Katalase und Cu/ZnSOD die

Resistenz der Zellen gegenüber Menadion erhöhte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den in Gleichung 4.1 - 4.3 formulierten Prozessen. Die Reaktion des Semiquinons mit molekularem Sauerstoff (Gleichung 4.2) verläuft reversibel (Ishii & Fridovich 1990), so daß sich ein Gleichgewicht ausbildet. Aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit (Meisel & Czapski 1975) konkurriert diese Reaktion mit der Dismutation der Superoxidradikale, mit der Konsequenz, daß die Bildung von H_2O_2 sehr gering ist. In Anwesenheit von Cu/ZnSOD wird das Reaktionsgleichgewicht hingegen auf die rechte Seite zugunsten der Superoxiddismutation verschoben (Winterbourn *et al.* 1978). In Folge davon sinkt die Semiquinon Konzentration bei gleichzeitig ansteigender H_2O_2 Generierung. Die Überexpression der Cu/ZnSOD in RINm5F-Zellen zusammen mit den in dieser Zelle sehr geringen Aktivitäten Wasserstoffperoxid-inaktivierender Enzyme verstärkt durch vermehrte H_2O_2 Produktion die Toxizität von Menadion. Bei gleichzeitiger Erhöhung der Katalaseexpression können die erhöhten H_2O_2 Konzentrationen wirksam inaktiviert werden. Während mit einer alleinigen Überexpression von Katalase keine protektiven Effekte beobachtet wurden, erbrachte die Überexpression der Glutathionperoxidase in Übereinstimmung mit den von Mirault *et al.* (1991) publizierten Daten an T47D-Zellen eine Schutzwirkung gegenüber der durch Menadion verursachten Zelltoxizität.

Die diabetogene und selektiv B-zelltoxische Substanz Alloxan bzw. ihre Derivate können durch Redoxzyklen reaktive Sauerstoffspezies bilden (Lenzen & Munday 1991; Munday 1988; Munday *et al.* 1993). Dennoch zeigte Alloxan gegenüber RINm5F-Zellen auch bei Konzentrationen von > 10 mM keine Toxizität. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit *in vitro* Versuchen an anderen insulinproduzierenden Gewebekulturzellen (Zhang *et al.* 1995) und ist darauf zurückzuführen, daß die für diese Untersuchungen verwendeten RINm5F-Zellen den als Hauptzielstruktur des Alloxans angesehenen GLUT2-Glucosetransporter (De Vos *et al.* 1995; Eizirik *et al.* 1994) nur sehr gering exprimieren. Das lipophilere Alloxanderivat N-Butylalloxan wirkte hingegen gegenüber RINm5F-Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 4,0 mM toxisch. Weder durch die Erhöhung des intrazellulären Abwehrstatus noch durch extrazellulären Enzymschutz konnte die Toxizität von N-Butylalloxan signifikant reduziert werden.

Trotz starker Einschränkung der Autooxidation von Dialursäure bzw. ihrer entsprechenden Derivate durch Superoxiddismutasen (Munday 1988; Munday *et al.* 1993) wird in RINm5F-Zellen die N-Butylalloxantoxizität durch Cu/ZnSOD-Überexpression verstärkt und steht so im Widerspruch zu den mit Alloxan in Cu/ZnSOD transgenen Mäusen erhobenen Befunden von Kubisch *et al.* (1997). Von der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies unabhängige

Mechanismen, wie die Oxidation von SH-Gruppen in Proteinen der Plasmamembran, werden gegenwärtig für die Alloxantoxizität diskutiert (Lenzen & Panten 1988).

Die wichtige Schutzfunktion aller drei im Zytosol lokalisierten zytoprotektiven Enzyme für die Verhinderung von Sauerstoffradikal-induzierten Zellschäden ist somit von der chemischen Reaktivität, der Konzentration und der Zerfallskinetik der verwendeten Sauerstoffradikal-Generatoren individuell determiniert. Während Katalase bei hohen H_2O_2 Konzentrationen einen effektiven Schutz vermitteln kann, ist bei niedrigeren H_2O_2 Konzentrationen die Glutathionperoxidase wirkungsvoller. Die zusätzliche Fähigkeit der Glutathionperoxidase, Lipidperoxidationsprodukte umzusetzen und so einen Verlust der Plasmamembranbarriere zu verhindern, ist eine weitere protektive Eigenschaft des Enzyms. Die Verminderung der intrazellulären Superoxidkonzentration durch die Cu/ZnSOD wirkt sich sowohl auf die Stabilität der Katalase als auch auf die Verhinderung von Superoxid-vermittelten Sekundärreaktionen und den in diesen Reaktionen entstehenden Hydroxylradikalen aus (Liochev & Fridovich 1994).

Sowohl die Überexpression als auch die Suppression der mitochondrialen MnSOD hat für die Abwehr Sauerstoffradikal-medierter Zellschäden in insulinproduzierenden RINm5F-Zellen nach den erhaltenen Ergebnissen keinerlei Auswirkungen, zumal das starke Ungleichgewicht zwischen Superoxid- und Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen die Akkumulation von H_2O_2 favorisiert. Ähnlich ungünstige Enzymratios wurden von Zhong *et al.* (1996) in Gliomzellen vorgefunden. Durch Überexpression der MnSOD konnte die Sensitivität gegenüber Sauerstoffradikal-generierenden Substanzen verstärkt werden. Zumindest für die in dieser Studie verwendeten chemischen Sauerstoffradikal-Generatoren gelten somit Zellmembran und Zytosol als die wichtigsten Zielstrukturen.

4.3 Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit NO-Generatoren

Neben reaktiven Sauerstoffverbindungen besitzen auch Stickstoffmonoxid (NO) und die von diesem Radikal abgeleiteten reaktiven Stickstoffverbindungen ein bedeutendes Schädigungspotential im initialen Zerstörungsprozeß der pankreatischen B-Zellen im Autoimmundiabetes. Der genaue Mechanismus der NO-Toxizität ist zur Zeit noch ungeklärt, doch werden Enzyminhibierungen, Interaktionen mit Metallkomplexen in Enzymen sowie DNA-Strangbrüche als direkt NO-mediierte Schäden angesehen (Kröncke *et al.* 1997). Als weiterer Aspekt der NO-Toxizität rückte in den letzten Jahren die Interaktion von NO mit Sauerstoffradikalen in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen Betrachtung. Es konnte an verschiedenen zellulären

Systemen belegt werden, daß die toxische Wirkung von NO durch Reaktionen mit Sauerstoffradikalen potenziert wird (Beckman & Koppenol 1996). Als direkte Folge der oben beschriebenen Zellschädigungen wurde ein nekrotisches Absterben von Zellen beschrieben (Kröncke *et al.* 1991). In Makrophagen, Thymuszellen oder neuronalen Zellen können durch NO Signalkaskaden aktiviert werden, die zum apoptotischen Zelltod führen (Albina *et al.* 1993; Bonfoco *et al.* 1995).

Bei der Verwendung von chemischen NO-Generatoren muß insbesondere der Mechanismus der NO-Freisetzung und die Spezifität der NO-Produktion bei den unterschiedlichen Verbindungen beachtet werden. Vertreter der NO-generierenden Substanzgruppe der Sydnonimine, wie SIN-1, setzen während ihres spontanen Zerfalls in wäßriger Lösung äquivalente Mengen an Superoxidradikalen und NO frei (Feelisch & Stamler 1996; Ioannidis & de Groot 1993). In der sehr schnellen Folgereaktion bildet sich hochreaktives Peroxynitrit (Beckman & Koppenol 1996). Neben der Generierung von Superoxidradikalen und NO konnte auch die Bildung von H₂O₂ durch SIN-1 nachgewiesen werden, das sowohl durch spontane Superoxiddismutation als auch durch Reaktion von Peroxynitrit mit biologischen Strukturen wie tertiären Aminen gebildet wird (Hogg *et al.* 1992; Kirsch *et al.* 1998; Quine *et al.* 1997). Im Gegensatz zur spontanen Generierung von NO durch SIN-1 erfolgt die Freisetzung von NO bei Natriumnitroprussid, einem Eisen-Nitrosyl-Komplex, durch die einstufige Reduktion zum Nitroxidradikal (Rao *et al.* 1991), das im weiteren Zerfall NO freisetzt, aber auch in Redoxzyklen Superoxidradikale generiert (Ramakrishna Rao & Cederbaum 1996). Thionitrit-Verbindungen wie das benutzte SNAP zerfallen spontan zu NO und dem Thiylradikal (Feelisch & Stamler 1996), das wiederum in Folgereaktionen Disulfidanion- und ebenfalls Superoxidradikale freisetzen kann (Munday 1994).

In Inkubationsversuchen mit SIN-1, Natriumnitroprussid oder SNAP wurden RINm5F-Zellen somit nicht nur gegenüber NO exponiert, sondern auch gegenüber unterschiedlichen reaktiven Sauerstoffspezies (H₂O₂, Superoxid- und Hydroxylradikalen) und NO-Verbindungen. Als reine NO-Generatoren können NO-Polyaminverbindungen wie das benutzte DETA/NO oder SPER/NO eingestuft werden, die keine nachweisbaren Mengen reaktiver Sauerstoff- oder NO-Verbindungen produzieren (Kröncke *et al.* 1993). Aber auch durch die reinen NO-Generatoren DETA/NO und SPER/NO können durch extra- oder intrazellulär ablaufende Folgereaktionen weitere reaktive Radikalverbindungen gebildet werden.

Der Zusatz antioxidativer Enzyme zum Inkubationsmedium hatte keinen Einfluß auf die Toxizität von Natriumnitroprussid, SNAP, DETA/NO oder SPER/NO gegenüber RINm5F-Zellen. Die vollständige Verhinderung des Zelltodes durch exogenen Zusatz von Katalase und Cu/ZnSOD zum Zellkulturmedium verdeutlicht den hohen Anteil reaktiver Sauerstoffspezies beim SIN-1-Zerfall.

Die Überexpression von Katalase in RINm5F-Zellen schützte signifikant gegenüber SIN-1- und SNAP-medierter Toxizität. Dies spiegelt eine Beteiligung intra- oder extrazellulär generierten H_2O_2 für die Toxizität dieser Substanzen wider. Darüber hinaus kann das intrazelluläre NO auch durch die Bildung von Katalase-NO-Komplexen detoxifiziert werden. NO-Eisen-Komplexe werden durch H_2O_2 oxidiert, so daß Nitrit entsteht (Kanner 1996) und es konnte gezeigt werden, daß an Katalase komplexiertes NO bereits durch geringe H_2O_2 Konzentrationen zerstört werden kann (Brunelli *et al.* 1994). Aufgrund der niedrigen Affinität der Katalase zu H_2O_2 sind geringe Mengen an H_2O_2 auch in Gegenwart hoher Katalaseaktivitäten immer zugegen. Wie bereits weiter oben erwähnt, bildet sich H_2O_2 aus der Reaktion von Peroxynitrit mit tertiären Aminen wie ATP oder aber auch mit DNA (Kirsch *et al.* 1998).

Glutathionperoxidase überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollen eine höhere Resistenz gegenüber SNAP und Natriumnitroprussid. Auch hier kann die Inaktivierung von intrazellulärem H_2O_2 durch die Glutathionperoxidase den Schutz erklären. Zusätzlich besitzt die Glutathionperoxidase die Fähigkeit, Peroxynitrit durch die Umwandlung in Nitrit zu inaktivieren (Sies *et al.* 1997).

Einen Schutz gegenüber SIN-1, Natriumnitroprussid, SNAP und SPER/NO konnte auch durch Überexpression der zytosolischen Cu/ZnSOD erreicht werden. Vordergründig könnte die Inaktivierung von generierten Superoxidradikalen die durch Cu/ZnSOD-Überexpression bedingte Resistenzhöhung erklären. Die Superoxiddismutation verhindert effektiv die Bildung von hochtoxischem Peroxynitrit. Dies erklärt auch, warum Cu/ZnSOD nicht vor der Toxizität des reinen NO-Generators DETA/NO schützen konnte. Alternativ könnte die von Murphy & Sies (1991) beschriebene Reduktion des NO zum Nitroxylanion durch Cu/ZnSOD ebenfalls eine Detoxifizierung bewirken, da NO über diesen Mechanismus in nicht toxische Stickstoffoxide überführt wird. Die zuletzt beschriebenen Reaktionen sollten dann aber für alle überprüften NO-Generatoren gültig sein, insbesondere auch für die benutzte NO-Polyaminverbindung DETA/NO, auf deren Toxizität die Cu/ZnSOD-Überexpression keinen Einfluß hatte. Ein weiterer Faktor, der bei der unterschiedlichen Toxizität der beiden NO-

Polyaminverbindungen berücksichtigt werden muß, sind die sehr unterschiedlichen Freisetzungskinetiken beider Substanzen. Während Feelisch & Stamler (1996) für SPER/NO eine Halbwertszeit von 39 min nennen (bei pH 7,4 und 37 °C), beträgt die Halbwertszeit für DETA/NO unter den gleichen Bedingungen ca. 20 h. Diese niedrig dosierte aber kontinuierliche NO-Generierung durch DETA/NO läßt toxische Sekundärreaktionen, bei denen die Cu/ZnSOD protektive Effekte aufweist, in den Hintergrund treten und reine NO-Toxizitätsphänomäne dominieren. Dennoch kann eine abschließende Beurteilung der komplexen Interaktionen zwischen NO, reaktiven Sauerstoffspezies und der Cu/ZnSOD an dieser Stelle nicht abgegeben werden.

Eine Funktion der mitochondrialen MnSOD für die Toxizität von chemischen NO-Generatoren konnte lediglich für Natriumnitroprussid belegt werden. So konnte durch Überexpression der MnSOD eine im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollen erhöhte Resistenz gegenüber Natriumnitroprussid erreicht werden. Die Erniedrigung der MnSOD- Expression in RINm5F-Zellen, die mit einem MnSOD *antisense*-Konstrukt transfiziert wurden, führte ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Natriumnitroprussid. Ein möglicher Grund für die Sonderstellung des Natriumnitroprussids könnte die für die NO-Generierung nötige intrazelluläre Aktivierung durch Reduktion sein. Rao *et al.* (1991) konnten an isolierten Hepatozyten die Beteiligung der Mitochondrien an der Aktivierung des Natriumnitroprussids zeigen, so daß hohe lokale Konzentrationen an NO entstehen können und in weiteren Sekundärreaktionen Superoxidradikale und H₂O₂ gebildet werden.

Durch Überexpression der MnSOD können sekundär schädigende Prozesse verhindert werden. Diesem schützenden Effekt der MnSOD stehen offenbar in einem labilen Gleichgewicht schädigende Einflüsse gegenüber, die durch Reduktion der MnSOD minimiert wurden. Metallkatalysierte Reaktionen zu reaktiven Stickstoffverbindungen könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Insgesamt spielt die mitochondriale Inaktivierung von Radikalen für die Toxizität der benutzten NO-Generatoren nur eine untergeordnete Rolle. Beschriebene Organellendefekte wie der Calciumausstrom aus dem Mitochondrium (Richter *et al.* 1994), eine Hemmung der ATP-Bildung (Granger *et al.* 1980) sowie eine vermehrte Superoxidradikalproduktion durch Entkopplung der Atmungskettenkomplexe (Turrens & Boveris 1980) sind in den in dieser Studie durchgeführten Inkubationsversuchen durch die Überexpression der mitochondrial lokalisierten MnSOD nicht zu verhindern gewesen.

Die Betrachtung der durch die kombinierte Überexpression zytoprotektiver Enzyme erhaltenen Ergebnisse bestätigt die komplexen Interaktionen zwischen NO und reaktiven Sauerstoffspezies. Unter Verwendung der NO-Polyaminverbindungen DETA/NO und SPER/NO konnte in Übereinstimmung mit den Einzeltransfektionen keine Schutzwirkung durch die Überexpression von Katalase zusammen mit der Cu/ZnSOD oder der Glutathionperoxidase erreicht werden. Die vorhandene Schutzwirkung gegenüber SIN-1, SNAP oder Natriumnitroprussid, die als NO- und Sauerstoffradikal-generierende Substanzen gelten, wurde durch Überexpression eines weiteren protektiven Enzyms nicht synergistisch verstärkt.

Ein Aspekt, der bei der Interpretation dieser Ergebnisse beachtet werden muß, sind die bei der kombinierten Überexpression erhaltenen Enzymaktivitäten der zytoprotektiven Enzyme. So betrug die Katalaseenzymaktivität mit 212 U/mg Protein in den KAT/GPx-Zellen und mit 326 U/mg Protein in den KAT/Cu/ZnSOD-Zellen nur 38 % bzw. 58 % der Aktivitäten der Einzeltransfektante. Bei der zusätzlichen Überexpression der Cu/ZnSOD betrug die Enzymaktivität 78 % von dem bei der alleinigen Überexpression gemessenen Wert, während die Glutathionperoxidasewerte bei der kombinierten Überexpression nicht erniedrigt waren. Mit diesen veränderten Enzymaktivitäten könnten Schwellenwerte unterschritten worden sein, mit der Folge eines fast völligen Verlustes der Schutzwirkung.

Der Schutz insulinproduzierender RINm5F-Zellen durch Überexpression zytoprotektiver Enzyme zeigt die Bedeutung der synergistischen Wirkung von NO und reaktiven Sauerstoffspezies. Diese überadditiven Schädigungseffekte einer NO-Sauerstoffradikal-Interaktion konnten durch die Koinkubationen von H₂O₂ bzw. Hypoxanthin/Xanthinoxidase mit SIN-1 oder SNAP demonstriert werden. In den jeweils benutzten sublytischen Konzentrationen waren die einzelnen Radikalverbindungen für RINm5F-Zellen nur schwach toxisch. Durch Kombination der Sauerstoffradikal- und NO-Generatoren wurden starke Zellschäden ausgelöst, wie sie auch von Filep *et al.* (1997) an Lymphomzellen beobachtet wurden.

Der Umfang und die Art des Schutzes sind bei NO-generierenden Substanzen im Vergleich zu Sauerstoffradikal-Generatoren noch stärker von der jeweils verwendeten Substanz abhängig. Die Vorhersage jeder theoretisch möglichen Interaktion mit zellulären Strukturen ist auf Grund der Vielzahl reaktiver Verbindungen nicht möglich und muß für den Einzelfall in speziellen Studien individuell untersucht werden.

4.4 Inkubationsversuche transfizierter RINm5F-Zellen mit Zytokinen

Die Bedeutung der Zytokine, insbesondere von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , für die Zerstörung insulinproduzierender Zellen wurde durch zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien belegt (Übersicht bei Mandrup Poulsen *et al.* (1990) und Rabinovitch & Suarez-Pinzon (1998)). Die Hemmung der Insulinbiosynthese und der Glucose-induzierten Insulinsekretion, reduzierte Glucoseoxidation, gesteigerte Lipidperoxidation und DNA-Fragmentierung sind Merkmale der Zytokin-vermittelten B-Zellschädigung.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Vitalität von RINm5F-Zellen nach Inkubation mit IL-1 β oder einem Zytokingemisch durch den MTT-Test ermittelt und mit nicht behandelten Kontrollen verglichen. Während mit IL-1 β allein nach dreitägiger Inkubation auch bei Konzentrationen von 600 U IL-1 β nur eine 25 %ige Vitalitätsreduktion erreicht wurde, fiel bei Verwendung des Zytokingemisches die Restvitalität konzentrationsabhängig bis auf 33 % ab. Die Überexpression der zytoprotektiven Enzyme Katalase, Glutathionperoxidase und Cu/ZnSOD schützte signifikant vor einem Vitalitätsverlust nach 72stündiger Inkubation mit der Zytokinkombination. Die mit dem MTT-Test ermittelten Vitalitäten der RINm5F-Zellen bestätigen die mit anderen Methoden ermittelten Auswirkungen von Zytokinen. Ankarcona *et al.* (1994) beobachteten nach 72stündiger Inkubation von RINm5F-Zellen mit IL-1 β einen Anstieg der LDH-Freisetzung um 30 % (10 U/ml IL-1 β) bzw. 37 % (50 U/ml IL-1 β) gegenüber unbehandelten Kontrollen und Suarez Pinzon *et al.* (1994) konnten nach Inkubation von RINm5F-Zellen mit einem Gemisch der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ DNA-Strangbrüche, mitochondriale Defekte und schließlich den Zelltod induzieren. Indirekt lassen sich auch an primären B-Zellen gewonnene Ergebnisse bestätigen, die eine Verstärkung der IL-1 β Toxizität durch TNF- α und IFN- γ ergaben (Cetkovic Cvrlje & Eizirik 1994). Yamada *et al.* (1993) konnten bei Inkubationen von Langerhansschen Inseln mit TNF- α und IFN- γ einen schützenden Effekt durch die Radikalfänger Dimethylharnstoff und Dimethylsulfoxid beobachten. Exogen zugegebene Katalase und Superoxiddismutase erbrachten aufgrund der Membranundurchlässigkeit keinen Schutz.

Die zur weiteren Differenzierung der im MTT-Test erhaltenen Ergebnisse durchgeführten Proliferationsstudien sowie die durch Differentialfärbung erhaltenen Daten bestätigen den im MTT-Test gefundenen Schutz von RINm5F-Zellen durch Überexpression zytoprotektiver Enzyme. Die gefundenen starken Proliferationshemmungen bei nicht transfizierten RINm5F-Zellen sind spezifische Wirkungsmechanismen von TNF- α und IFN- γ an teilungsfähigen, permanenten Gewebekulturlinien. Schädigungsprozesse, die bei nahezu mitotisch ruhenden

B-Zellen des Pankreas zum Zelltod führen, wirken sich in proliferationsaktiven Zellkulturlinien zuerst zytostatisch aus.

Die Auszählung der abgestorbenen Zellen und deren Differenzierung in apoptotische und nekrotische Zellen zeigte deutlich, daß der Zelltod der nicht transfizierten RINm5F-Zellen in den meisten Fällen auf Nekrose zurückzuführen war und nicht durch Apoptose ausgelöst wurde. Das Vorherrschen nekrotischer Zelltodformen wurde für die Typ I Diabetestiermodelle der BB-Ratte und NOD-Maus (Seemayer *et al.* 1982; Serreze *et al.* 1988), für kultivierte Langerhanssche Inseln (Kröncke *et al.* 1991) und für insulinproduzierende Zellkulturlinien beschrieben. Apoptotische Zelltodmechanismen wurden in der neueren Literatur für ein transgenes Modell der NOD-Maus mit einem B-zellspezifischen T-Zellrezeptor (Kurrer *et al.* 1997) sowie bei humanen Inselzellen kumulativ nach Zytokinexposition beschrieben (Delaney *et al.* 1997). Eine endgültige Aussage, ob primär nekrotische oder apoptotische Mechanismen zum Zelltod insulinproduzierender Zellen nach Zytokininkubation führen, ist derzeit aufgrund der kontroversen Datenlage nicht möglich.

Als zentrales Ereignis im Prozeß der durch Zytokine initiierten Schädigungen wird die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) beschrieben. Innerhalb der zur Aktivierung führenden Signalkaskade ist der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B von besonderer Bedeutung, da in insulinproduzierenden Zellen zwei NF- κ B-Bindungsstellen innerhalb des iNOS-Promotors die Expression vermitteln (Darville & Eizirik 1998). Insbesondere für Jurkat T-Zellen wurde eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors durch H₂O₂ und die Unterbindung der Aktivierung durch die antioxidativ wirkenden Substanzen PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) und NAC (N-Acetylcystein) beschrieben (Schreck *et al.* 1991; Schreck *et al.* 1992). Für RINm5F-Zellen wurde die Aktivierung von NF- κ B durch IL-1 β gezeigt, eine Aktivierung durch Inkubation mit H₂O₂ jedoch war nicht möglich (Eizirik *et al.* 1996b). Die IL-1 β induzierte NF- κ B Aktivierung wurde durch Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on), einer selenhaltigen, antioxidativ und entzündungshemmend wirkenden Verbindung, nicht verhindert (de-Mello *et al.* 1996).

Zwischen den transfizierten und nicht transfizierten RINm5F-Zellen konnten in den *Gel Shift*-Versuchen keine Unterschiede in der Aktivierung von NF- κ B nach IL-1 β oder H₂O₂ festgestellt werden. Wie von Brennan & O'Neill (1995) gezeigt, stellt die Aktivierung von NF- κ B durch Sauerstoffradikale kein allgemeines Prinzip dar, so daß auch für die Aktivierung von NF- κ B in RINm5F-Zellen andere zellspezifische Regulierungsmechanismen postuliert werden müssen.

Obwohl Ebselen die IL-1 β -bedingte NF- κ B Aktivierung nicht verhindern konnte, zeigten de-Mello *et al.* (1996), daß die Expression der iNOS auf mRNA-Ebene und die NO-Produktion nach einer 6stündigen Inkubationsdauer reduziert war. Auch durch PDTC konnte in RINm5F-Zellen eine 90 %ige Reduktion der iNOS mRNA-Expression und Nitritakkumulation (Bedoya *et al.* 1995) erreicht werden. Durch Überexpression zytoprotektiver Enzyme konnte weder die Induktion der iNOS noch die NO-Bildung verhindert werden. Durch Ebselen oder PDTC bedingte Effekte beruhen daher wahrscheinlich auf anderen substanzspezifischen Eigenschaften und nicht auf ihrer allgemeinen antioxidativen Wirkung. Die im Zellkulturüberstand gemessene Nitritkonzentration, die als Maß für die NO-Produktion diente, war bei Inkubationen von RINm5F-Zellen mit IL-1 β oder dem Zytokingemisch nicht signifikant unterschiedlich. Bereits 60 U IL-1 β reichten in Übereinstimmung mit Ankarcona *et al.* (1994) aus, um gegenüber der Kontrolle eine signifikante Nitritakkumulation zu erreichen. Die NO-Bildung kann die bei den transfizierten RINm5F-Zellen gefundenen erhöhten Vitalitäten nicht erklären.

Für die beobachteten Schutzeffekte vor Zytokin-vermittelter Toxizität in RINm5F-Zellen müssen demnach neben der NO-Bildung zusätzliche Mechanismen verantwortlich sein, die eine aktive Generierung von freien Sauerstoffradikalen beinhalten. Die Induktion von zellschädigenden Einflüssen zusätzlich zu der NO-Generierung wurde auch von Suarez Pinzon *et al.* (1994) postuliert. Bei Inkubationsversuchen von RINm5F-Zellen vermochte Nicotinamid, Inhibitor der ADP-Ribosylierung und allgemeiner Sauerstoffradikalfänger, durch Zytokine verursachte Zellschädigungen zu verhindern, ohne die NO-Generierung zu beeinflussen.

Durch IL-1 β und IFN- γ induzierbare Signalwege in insulinproduzierenden Zellen sind schematisch in Abb. 4.1 dargestellt und neben der bereits erläuterten Aktivierung der iNOS wird die Induktion weiterer Gene aufgezeigt.

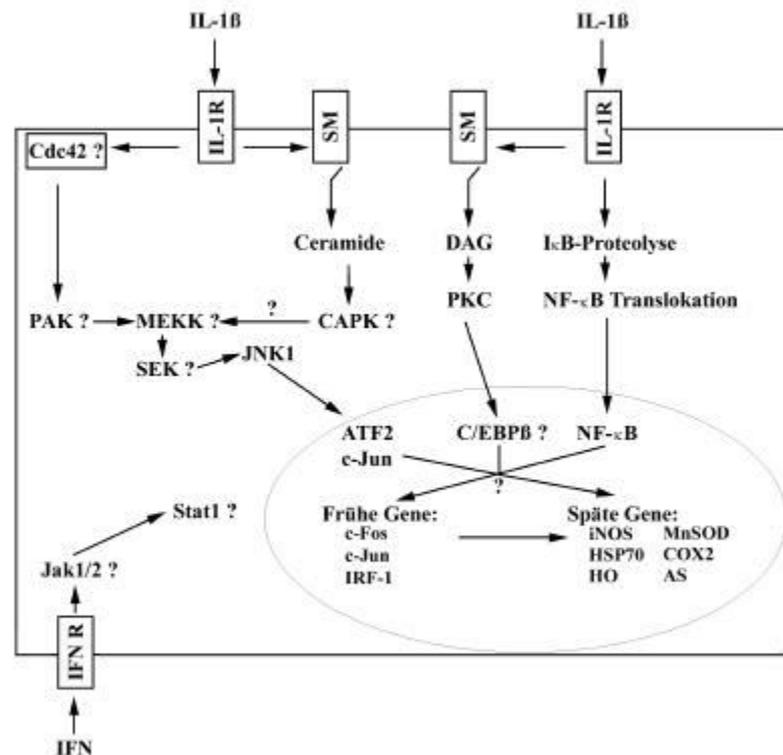


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der IL-1 β und IFN- γ induzierten Signaltransduktionswege in insulinproduzierenden Zellen nach Eizirik *et al.* (1996b)

Die Aktivierung des IL-1 Rezeptors (IL-1R) aktiviert die Sphingomyelinase (SM) und Ceramid Generierung. Dies führt wahrscheinlich zur Aktivierung der ceramid-aktivierten Proteinkinase (CAPK), die die Aktivität der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK1) erhöht. In anderen Zellen ist bekannt, daß IL-1 β JNK1 durch einen alternativen Weg, beginnend mit dem GTP-bindenden Protein Cdc42, gefolgt von der Phosphorylierungskaskade (PAK, MEKK und SEK), aktivieren kann. Es ist jedoch unklar, ob dieser Weg auch in insulinproduzierenden Zellen abläuft. Die JNK1 Aktivierung führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF2 und c-Jun. IL-1 β induziert wahrscheinlich eine phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PLC) und eine Diacylglycerol (DAG) Generierung und Proteinkinase C (PKC) Aktivierung. Für die PKC ist bekannt, daß sie die mikrotubulin-assoziierte Proteinkinase (MAP) stimuliert, die wiederum den Transkriptionsfaktor C/EBP β aktiviert. IL-1 β bindet an den IL-1 β Rezeptor und induziert wahrscheinlich durch I κ B-Proteolyse die NF- κ B Aktivierung. In anderen Zellen schließlich führt die IFN γ Rezeptor-Aktivierung zu einer Erhöhung der Aktivität der Protein Tyrosin-Kinasen Jak1 und Jak2 sowie des Transkriptionsregulators Stat1. Die Transkriptionsfaktoren ATF2, c-Jun, C/EBP β , NF- κ B, und Stat1 induzieren die frühen responsiven Gene (30 min) und die späten responsiven Gene (3 h). Einige der frühen responsiven Gene sind ebenfalls an der Induktion der späten responsiven Gene beteiligt. HSP, Heat Shock Protein; HO, Hämoxygenase; MnSOD, Mn enthaltende Superoxid-dismutase; COX2, induzierbare Form der Cyclooxygenase; AS, Argininsuccinatsynthetase.

Der indirekte Beweis einer Beteiligung von reaktiven Sauerstoffverbindungen an der Zerstörung pankreatischer B-Zellen ist vielfach geführt worden (Mandrup Poulsen *et al.* 1993; Rabinovitch *et al.* 1996; Suarez Pinzon *et al.* 1997). Für die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase (COX-2) wurde ein durch IL-1 β bewirkter Anstieg in Langerhansschen Inseln berichtet (McDaniel *et al.* 1996). Parallel dazu verstärkt das durch die iNOS gebildete NO die Aktivität der konstitutiv exprimierten COX-1- und der induzierbaren COX-2-Isoform und

bewirkt einen Anstieg entzündungstypischer Prostaglandine. Die Koexpression der iNOS und der COX-2 als radikalgenerierende Enzyme wurde auch in besonders stark von zerebralen Ischämieschäden betroffenen Gehirnregionen beobachtet (Nogawa *et al.* 1998).

Die Induktion der mitochondrialen MnSOD durch IL-1 β wird wie auch die Induktion des Hitzchockproteins 70 und der Hämoxigenase I als protektive Maßnahme der Zelle angesehen (Eizirik *et al.* 1996b). Durch Dismutation der im Mitochondrium akkumulierten Superoxidradikale soll eine tiefgreifende Dysfunktion der Mitochondrien verhindert werden. Die von Hohmeier *et al.* (1998) gefundene Resistenz stabil MnSOD überexprimierender INS-1- und RIN1046-38-Zellen scheint dieser These experimentelle Bestätigung zu geben. Als Mechanismus dieser Resistenzsteigerung wurde aber nicht eine sekundäre Beseitigung von Superoxidradikalen bzw. die Verhinderung von Sekundärreaktionen angeführt, sondern die Reduktion der iNOS-Expression und eine verminderte NO-Bildung.

Wie erläutert weisen die in dieser Arbeit benutzten MnSOD überexprimierenden Zellen keinerlei veränderte iNOS-Expressionen oder NO-Bildungsraten auf. Vielmehr konnte durch die Suppression der MnSOD eine höhere Resistenz erreicht werden.

Bei zusammenfassender Betrachtung des protektiven Potentials antioxidativer Enzyme in RINm5F-Zellen wird deutlich, daß nur die zytosolischen Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase sowie zusätzlich die Cu/ZnSOD einen Schutz gegenüber den chemischen Radikal-Generatoren und den Zytokinen bewirkten. Insbesondere der Ausgleich des in pankreatischen B-Zellen vorherrschenden Ungleichgewichts zwischen Superoxid- und Wasserstoffperoxid-inaktivierenden Enzymen führte zu einer erhöhten Resistenz der transfizierten Zellen. Die Rolle der MnSOD als zentrales Schutzenzym insulinproduzierender Zellen konnte nicht bestätigt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Albano, E., Tomasi, A., Gorla Gatti, L., Poli, G., Vannini, V. & Dianzani, M.U. (1987).** Free radical metabolism of alcohols by rat liver microsomes. *Free Radic Res Commun* **3**: 243-249.
- Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B. & Reichner, J.S. (1993).** Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **150**: 5080-5085.
- Amstad, P., Peskin, A., Shah, G., Mirault, M.E., Moret, R., Zbinden, I. & Cerutti, P. (1991).** The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* **30**: 9305-9313.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Brune, B. & Nicotera, P. (1994).** Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Exp Cell Res* **213**: 172-177.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. & Dizdaroglu, M. (1991).** Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* **273**: 601-604.
- Asayama, K., Nyfeler, F., English, D., Pilkis, S.J. & Burr, I.M. (1984).** Alloxan-induced free radical production in isolated cells. Selective effect on islet cells. *Diabetes* **33**: 1008-1011.
- Bach, J.F. (1994).** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* **15**: 516-542.
- Beck, Y., Oren, R., Amit, B., Levanon, A., Gorecki, M. & Hartman, J.R. (1987).** Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* **15**: 9076.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. & Freeman, B.A. (1990).** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1620-1624.
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. (1996).** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-1437.
- Bedoya, F.J., Flodstrom, M. & Eizirik, D.L. (1995).** Pyrrolidine dithiocarbamate prevents IL-1-induced nitric oxide synthase mRNA, but not superoxide dismutase mRNA, in insulin producing cells. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 816-822.
- Bennet, P.H. (1983).** *Classification of diabetes*. Medical Examination Publishing, New York.
- Benoist, C. & Mathis, D. (1997).** Cell death mediators in autoimmune diabetes--no shortage of suspects. *Cell* **89**: 1-3.

- Bhathena, S.J., Oie, H.K., Gazdar, A.F., Voyles, N.R., Wilkins, S.D. & Recant, L. (1982).** Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* **31**: 521-531.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S.A. (1995).** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7162-7166.
- Boveris, A. (1977).** Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* **78**: 67-82.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. & Snyder, S.H. (1991).** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**: 714-718.
- Brennan, P. & O'Neill, L.A. (1995).** Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* **1260**: 167-175.
- Brunelli, L., Koppenol, W.H., Bertolini, A. & Beckman, J.S. (1994).** Catalase can scavenge nitric oxide. *Circulation* **90**: I-458.
- Burkart, V., Gross Eick, A., Bellmann, K., Radons, J. & Kolb, H. (1995).** Suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by alpha-tocopherol. *FEBS Lett* **364**: 259-263.
- Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A. (1994).** Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**: 7-10.
- Cetkovic Cvrlje, M. & Eizirik, D.L. (1994).** TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* **6**: 399-406.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979).** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605.
- Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W. & Moncada, S. (1993).** Cloning, characterization, and expression of a cDNA

encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11419-11423.

Chesis, P.L., Levin, D.E., Smith, M.T., Ernster, L. & Ames, B.N. (1984). Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1696-1700.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Chu, F.F., Esworthy, R.S., Akman, S. & Doroshov, J.H. (1990). Modulation of glutathione peroxidase expression by selenium: effect on human MCF-7 breast cancer cell transfectants expressing a cellular glutathione peroxidase cDNA and doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Nucleic Acids Res* **18**: 1531-1539.

Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In Grennwald, R.A. (ed.) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton.

Clare, D.A., Blum, J. & Fridovich, I. (1984). A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese. *J Biol Chem* **259**: 5932-5936.

Clark, J.M. & Lambertsen, C.J. (1971). Pulmonary oxygen toxicity: a review. *Pharmacol Rev* **23**: 37-133.

Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W. & Chang, L.Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10405-10409.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M. & Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* **107**: 526-545.

Darley-USmar, V., Wiseman, H. & Halliwell, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* **369**: 131-135.

Darville, M.I. & Eizirik, D.L. (1998). Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter. *Diabetologia* **41**: 1101-1108.

De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D. & Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* **96**: 2489-2495.

- Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G. & Eizirik, D.L. (1997).** Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* **138**: 2610-2614.
- de-Mello, M.A., Flodstrom, M. & Eizirik, D.L. (1996).** Ebselen and cytokine-induced nitric oxide synthase expression in insulin-producing cells. *Biochem Pharmacol* **52**: 1703-1709.
- Diplock, A.T. (1994).** *Antioxidants and free radical scavengers*. Elsevier, Amsterdam.
- Eaton, J.W. (1991).** Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *J Lab Clin Med* **118**: 3-4.
- Eisenbarth, G.S. (1986).** Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* **314**: 1360-1368.
- Eizirik, D.L., Delaney, C.A., Green, M.H., Cunningham, J.M., Thorpe, J.R., Pipeleers, D.G., Hellerstrom, C. & Green, I.C. (1996a).** Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* **118**: 71-83.
- Eizirik, D.L., Flodstrom, M., Karlsen, A.E. & Welsh, N. (1996b).** The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **39**: 875-890.
- Eizirik, D.L., Pipeleers, D.G., Ling, Z., Welsh, N., Hellerstrom, C. & Andersson, A. (1994).** Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9253-9256.
- Feelisch, M. & Stamler, J.S. (eds.) (1996).** *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley & Sons, New York.
- Fehsel, K., Jalowy, A., Qi, S., Burkart, V., Hartmann, B. & Kolb, H. (1993).** Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* **42**: 496-500.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. (1987).** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413-7417.
- Filep, J.G., Lapierre, C., Lachance, S. & Chan, J.S. (1997).** Nitric oxide co-operates with hydrogen peroxide in inducing DNA fragmentation and cell lysis in murine lymphoma cells. *Biochem J* **321**: 897-901.
- Fischer, L.J. & Hamburger, S.A. (1980).** Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. *Diabetes* **29**: 213-216.

- Flohe, L. & Brand, I. (1969).** Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **191**: 541-549.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. & Ladenstein, R. (1976).** Glutathione peroxidase. In: *Glutathione: metabolism and function* (Arias, I.M. & Jakoby, W.B., eds.). Raven Press, New York, Vol. 6, 115-138.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. & Schock, H.H. (1973).** Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* **32**: 132-134.
- Forman, H.J. & Fridovich, I. (1973).** On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *J Biol Chem* **248**: 2645-2649.
- Freeman, B.A. (1984).** *Biological sites and mechanism of free radical production*. Rave Press, New York.
- Fridovich, I. (1970).** Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* **245**: 4053-4057.
- Fridovich, I. (1975).** Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**: 147-159.
- Fridovich, I. (1983).** Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**: 239-257.
- Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1986).** Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 313-317.
- Gatignol, A., Durand, H. & Tiraby, G. (1988).** Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett* **230**: 171-175.
- Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.K., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C. & Lauris, V. (1980).** Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3519-3523.
- Granger, D.L., Taintor, R.R., Cook, J.L. & Hibbs JB, J.r. (1980).** Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *J Clin Invest* **65**: 357-370.
- Grankvist, K., Marklund, S.L. & Taljedal, I.B. (1981).** CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* **199**: 393-398.
- Griffith, O.W. & Stuehr, D.J. (1995).** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**: 707-736.

- Grossmann, A. & Wendel, A. (1983).** Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem* **135**: 549-552.
- Günzler, W.A. & Flohe, L. (1985).** Glutathione Peroxidase. In Greenwald, R.A. (ed.) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton.
- Halliwell, B. & Aruoma, O.I. (1991).** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* **281**: 9-19.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1995).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Henry, Y., Lepoivre, M., Drapier, J.C., Ducrocq, C., Boucher, J.L. & Guissani, A. (1993).** EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* **7**: 1124-1134.
- Hidalgo, E., Ding, H. & Demple, B. (1997).** Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem Sci* **22**: 207-210.
- Ho, Y.S. & Crapo, J.D. (1987a).** cDNA and deduced amino acid sequence of rat copper-zinc-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* **15**: 6746.
- Ho, Y.S. & Crapo, J.D. (1987b).** Nucleotide sequences of cDNAs coding for rat manganese-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* **15**: 10070.
- Ho, Y.S., Howard, A.J. & Crapo, J.D. (1988).** Nucleotide sequence of a rat glutathione peroxidase cDNA. *Nucleic Acids Res* **16**: 5207.
- Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T. & Moncada, S. (1992).** Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* **281**: 419-424.
- Hohmeier, H.E., Thigpen, A., Tran, V.V., Davis, R. & Newgard, C.B. (1998).** Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta- induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest* **101**: 1811-1820.
- Homo-Delarche, F. & Boitard, C. (1996).** Autoimmune diabetes: the role of the islets of Langerhans. *Immunol Today* **17**: 456-460.
- Huie, R.E. & Padmaja, S. (1993).** The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* **18**: 195-199.
- Imlay, J.A. & Linn, S. (1988).** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309.

- Ioannidis, I. & de Groot, H. (1993).** Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J* **296**: 341-345.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. & Beckman, J.S. (1992).** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **298**: 446-451.
- Ishii, T. & Fridovich, I. (1990).** Dual effects of superoxide dismutase on the autoxidation of 1,4-naphthohydroquinone. *Free Radic Biol Med* **8**: 21-24.
- Jornot, L., Petersen, H. & Junod, A.F. (1991).** Differential protective effects of O-phenanthroline and catalase on H₂O₂-induced DNA damage and inhibition of protein synthesis in endothelial cells. *J Cell Physiol* **149**: 408-413.
- Junod, A.F., Jornot, L. & Petersen, H. (1989).** Differential effects of hyperoxia and hydrogen peroxide on DNA damage, polyadenosine diphosphate-ribose polymerase activity, and nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine triphosphate contents in cultured endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* **140**: 177-185.
- Kanner, J. (1996).** Nitric oxide and metal-catalyzed reactions. *Methods Enzymol* **269**: 218-229.
- Karlsen, A.E., Andersen, H.U., Vissing, H., Larsen, P.M., Fey, S.J., Cuartero, B.G., Madsen, O.D., Petersen, J.S., Mortensen, S.B., Mandrup-Poulsen, T., Boel, E. & Nerup, J. (1995).** Cloning and expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase cDNA from rat islets of Langerhans. *Diabetes* **44**: 753-758.
- Keen, H. (1982).** *Problems in the definition of diabetes mellitus and its subtypes*. Academic Press, London.
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. & Hallewell, R.A. (1991).** Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7381-7385.
- Kerner, W. (1998).** Klassifikation und Diagnose des Diabetes mellitus. *Deutsches Ärzteblatt* **95**: A-3144-3148.
- Kingston, R.E. (ed.) (1997).** *Introduction of DNA into Mammalian Cells*. John Wiley & Sons, New York.
- Kirsch, M., Lomonosova, E.E., Korth, H.G., Sustmann, R. & de Groot, H. (1998).** Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxynitrite with HEPES and related tertiary amines. Implications for a general mechanism. *J Biol Chem* **273**: 12716-12724.

- Kolb, H. & Kolb-Bachofen, V. (1992).** Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia* **35**: 796-797.
- Kono, Y. & Fridovich, I. (1982).** Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* **257**: 5751-5754.
- Kröncke, K.D., Brenner, H.H., Rodriguez, M.L., Etzkorn, K., Noack, E.A., Kolb, H. & Kolb Bachofen, V. (1993).** Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* **1182**: 221-229.
- Kröncke, K.D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. (1997).** Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* **1**: 107-120.
- Kröncke, K.D., Kolb-Bachofen, V., Berschick, B., Burkart, V. & Kolb, H. (1991).** Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 752-758.
- Kubisch, H.M., Wang, J., Bray, T.M. & Phillips, J.P. (1997).** Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes* **46**: 1563-1566.
- Kurrer, M., Pakala, S., Hanson, H. & Katz, J. (1997).** Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 213-218.
- Ladenstein, R., Epp, O., Bartels, K., Jones, A., Huber, R. & Wendel, A. (1979).** Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **134**: 199-218.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P. & Michel, T. (1992).** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6348-6352.
- Leibovitz, B., Hu, M.L. & Tappel, A.L. (1990).** Dietary supplements of vitamin E, beta-carotene, coenzyme Q10 and selenium protect tissues against lipid peroxidation in rat tissue slices. *J Nutr* **120**: 97-104.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M. (1996).** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Rad Biol Med* **20**: 463-466.

- Lenzen, S. & Munday, R. (1991).** Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* **42**: 1385-1391.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988).** Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* **31**: 337-342.
- Lindau-Shepard, B.A. & Shaffer, J.B. (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **15**: 581-588.
- Lindl, T. & Bauer, J. (1994).** *Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Liochev, S.I. & Fridovich, I. (1994).** The role of O₂⁻ in the production of HO[•]: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **16**: 29-33.
- Mandrup Poulsen, T., Corbett, J.A., McDaniel, M.L. & Nerup, J. (1993).** What are the types and cellular sources of free radicals in the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus? *Diabetologia* **36**: 470-471.
- Mandrup Poulsen, T., Helqvist, S., Wogensen, L.D., Molvig, J., Pociot, F., Johannesen, J. & Nerup, J. (1990).** Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **164**: 169-193.
- Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Dinarello, C.A. & Nerup, J. (1987).** Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity. *J Immunol* **139**: 4077-4082.
- Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Nielsen, J.H., Bendixen, G. & Nerup, J. (1985).** Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy* **40**: 424-429.
- Mann, H., McCoy, M.T., Subramaniam, J., Van Remmen, H. & Cadet, J.L. (1997).** Overexpression of superoxide dismutase and catalase in immortalized neural cells: toxic effects of hydrogen peroxide. *Brain Res* **770**: 163-168.
- Marklund, S.L. (1984).** Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* **222**: 649-655.
- Marletta, M.A. (1993).** Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**: 12231-12234.

- Mauricio, D. & Mandrup-Poulsen, T. (1998).** Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* **47**: 1537-1543.
- McCord, J.M. (1976).** Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships. *Adv Exp Med Biol* **74**: 540-550.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969).** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.
- McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A. & Corbett, J.A. (1996).** Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* **211**: 24-32.
- Mehrotra, S., Kakkar, P. & Viswanathan, P.N. (1991).** Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Radic Biol Med* **10**: 277-285.
- Meisel, D. & Czapski, G. (1975).** One-electron transfer equilibria and redox potentials of radicals studied by pulse radiolysis. *J Phys Chem* **79**: 1503-1509.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984).** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* **12**: 7035-7056.
- Mills, G.C. (1957).** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* **229**: 189-197.
- Mirault, M.E., Tremblay, A., Beaudoin, N. & Tremblay, M. (1991).** Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants. *J Biol Chem* **266**: 20752-20760.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Munday, R. (1988).** Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. *Biochem Pharmacol* **37**: 409-413.
- Munday, R. (1994).** Bioactivation of thiols by one-electron oxidation. *Adv Pharmacol* **27**: 237-270.
- Munday, R., Ludwig, K. & Lenzen, S. (1993).** The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J Endocrinol* **139**: 153-163.
- Murphy, M.E. & Sies, H. (1991).** Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10860-10864.

- Nakamura, M. & Hayashi, T. (1994).** One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *J Biochem* **115**: 1141-1147.
- Nathan, C. (1992).** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**: 3051-3064.
- Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T., Helqvist, S., Andersen, H.U., Pociot, F., Reimers, J.I., Cuartero, B.G., Karlsen, A.E., Bjerre, U. & Lorenzen, T. (1994).** On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* **37 Suppl 2**: S82-89.
- Nicholls, P. (1964).** The formation and catalytic role of catalase peroxide compound II. *Biochem Biophys Acta* **81**: 479-495.
- Nogawa, S., Forster, C., Zhang, F., Nagayama, M., Ross, M.E. & Iadecola, C. (1998).** Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10966-10971.
- Oberley, L.W. & Spitz, D.R. (1984).** Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* **105**: 457-464.
- Oliver, C.N. (1987).** Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **253**: 62-72.
- Powis, G. (1989).** Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic Biol Med* **6**: 63-101.
- Pushpa Rekha, T.R., Burdsall, A.L., Oleksa, L.M., Chisolm, G.M. & Driscoll, D.M. (1995).** Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem* **270**: 26993-26999.
- Quan, F., Korneluk, R.G., Tropak, M.B. & Gravel, R.A. (1986).** Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res* **14**: 5321-5335.
- Quine, L.A., Carrier, M.J. & Anggard, E.E. (1997).** Effect of anti-oxidants on the degradation of SIN-1. *Biochem Soc Trans* **25**: 417S.
- Rabinovitch, A., Suarez Pinzon, W.L., Shi, Y., Morgan, A.R. & Bleackley, R.C. (1994).** DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* **37**: 733-738.
- Rabinovitch, A., Suarez Pinzon, W.L., Strynadka, K., Lakey, J.R. & Rajotte, R.V. (1996).** Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 3197-3202.

- Rabinovitch, A. & Suarez-Pinzon, W.L. (1998).** Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* **55**: 1139-1149.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. & Freeman, B.A. (1991a).** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 4244-4250.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. & Freeman, B.A. (1991b).** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **288**: 481-487.
- Ramakrishna Rao, D.N. & Cederbaum, A.I. (1996).** Generation of reactive oxygen species by the redox cycling of nitroprusside. *Biochim Biophys Acta* **1289**: 195-202.
- Rao, D.N., Elguindi, S. & PJ, O.B. (1991).** Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **286**: 30-37.
- Rice Evans, C. & Burdon, R. (1993).** Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* **32**: 71-110.
- Richter, C., Gogvadze, V., Schlapbach, R., Schweizer, M. & Schlegel, J. (1994).** Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1143-1150.
- Rosen, G.M., Hassett, D.J., Yankaskas, J.R. & Cohen, M.S. (1989).** Detection of free radicals as a consequence of dog tracheal epithelial cellular xenobiotic metabolism. *Xenobiotica* **19**: 635-643.
- Salin, M.L. & Bridges, S.M. (1981).** Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *Biochem J* **195**: 229-233.
- Sandler, S., Eizirik, D.L., Svensson, C., Strandell, E., Welsh, M. & Welsh, N. (1991).** Biochemical and molecular actions of interleukin-1 on pancreatic beta-cells. *Autoimmunity* **10**: 241-253.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H. & Newgard, C.B. (1994).** STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**: 1326-1333.

- Schraufstatter, I.U., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Spragg, R.G. & Cochrane, C.G. (1986).** Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* **77**: 1312-1320.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W. & Baeuerle, P.A. (1992).** Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* **175**: 1181-1194.
- Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P.A. (1991).** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **10**: 2247-2258.
- Seemayer, T.A., Tannenbaum, G.S., Goldman, H. & Colle, E. (1982).** Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. III. Light-microscopic and ultrastructural observations of pancreatic islets of Langerhans. *Am J Pathol* **106**: 237-249.
- Serreze, D.V., Leiter, E.H., Kuff, E.L., Jardieu, P. & Ishizaka, K. (1988).** Molecular mimicry between insulin and retroviral antigen p73. Development of cross-reactive autoantibodies in sera of NOD and C57BL/KsJ db/db mice. *Diabetes* **37**: 351-358.
- Shimizu, N., Kobayashi, K. & Hayashi, K. (1984).** The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J Biol Chem* **259**: 4414-4418.
- Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O. & Briviba, K. (1997).** Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* **272**: 27812-27817.
- Simon, R.H., Scoggin, C.H. & Patterson, D. (1981).** Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem* **256**: 7181-7186.
- Southorn, P.A. & Powis, G. (1988).** Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* **63**: 381-389.
- Starke, P.E. & Farber, J.L. (1985).** Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem* **260**: 10099-10104.
- Steinman, H.M., Naik, V.R., Abernethy, J.L. & Hill, R.L. (1974).** Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. *J Biol Chem* **249**: 7326-7338.

- Suarez Pinzon, W.L., Strynadka, K., Schulz, R. & Rabinovitch, A. (1994).** Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide. *Endocrinology* **134**: 1006-1010.
- Suarez Pinzon, W.L., Szabo, C. & Rabinovitch, A. (1997).** Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* **46**: 907-911.
- Sunde, R.A. (1990).** Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* **10**: 451-474.
- Sutton, H.C. & Winterbourn, C.C. (1989).** On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* **6**: 53-60.
- Thomas, M.J., Mehl, K.S. & Pryor, W.A. (1982).** The role of superoxide in xanthine oxidase-induced autooxidation of linoleic acid. *J Biol Chem* **257**: 8343-8347.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S. (1997).** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* **46**: 1733-1742.
- Trush, M.A. & Kensler, T.W. (1991).** An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **10**: 201-209.
- Turner, R., Hattersley, A. & Cook, J. (1992).** Type II diabetes: search for primary defects. *Ann Med* **24**: 511-516.
- Turrens, J.F. & Boveris, A. (1980).** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**: 421-427.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. & Gregolin, C. (1982).** Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* **710**: 197-211.
- Vainshtein, B.K., Melik Adamyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A. & Grebenko, A.I. (1981).** Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature* **293**: 411-412.
- Weiss, S.J. (1989).** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**: 365-376.
- Welsh, N., Margulis, B., Borg, L.A., Wiklund, H.J., Saldeen, J., Flodstrom, M., Mello, M.A., Andersson, A., Pipeleers, D.G., Hellerstrom, C. & Eizirik D. L. (1995).** Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med* **1**: 806-820.

- Welsh, N. & Sandler, S. (1992).** Interleukin-1 beta induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 333-340.
- Westermeier, R. (1990).** *Elektrophorese-Praktikum*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- White, A.A., Crawford, K.M., Patt, C.S. & Lad, P.J. (1976).** Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **251**: 7304-7312.
- Winterbourn, C.C., French, J.K. & Claridge, R.F. (1978).** Superoxide dismutase as an inhibitor of reactions of semiquinone radicals. *FEBS Lett* **94**: 269-272.
- Wolff, S.P. (1993).** Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* **49**: 642-652.
- Xie, Q. & Nathan, C. (1994).** The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* **56**: 576-582.
- Yamada, K., Inada, C., Otabe, S., Takane, N., Hayashi, H. & Nonaka, K. (1993).** Effects of free radical scavengers on cytokine actions on islet cells. *Acta Endocrinol* **128**: 379-384.
- Yoon, J.W. (1990).** The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* **164**: 95-123.
- Yoon, J.W., Kim, C.J., Pak, C.Y. & McArthur, R.G. (1987).** Effects of environmental factors on the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med* **10**: 457-469.
- Yost, F.J. & Fridovich, I. (1973).** An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **248**: 4905-4908.
- Zhang, H., Ollinger, K. & Brunk, U. (1995).** Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. *Diabetologia* **38**: 635-641.
- Zhong, W., Oberley, L.W., Oberley, T.D., Yan, T., Domann, F.E. & St. Clair, D.K. (1996).** Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth Differ* **7**: 1175-1186.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Juli 1995 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. S. Lenzen am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover begonnen und im Dezember 1998 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. S. Lenzen

danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die vielen wertvollen Gespräche, seine hilfreiche Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. S. Lenzen für das mir entgegengebrachte Vertrauen und sein außerordentliches Engagement im Laufe der Dissertation.

Herrn Dr. M. Tiedge

danke ich für die sehr gute Betreuung, für seine Hilfe bei den vielen Fragen der Konzeption und Durchführung der Versuche sowie bei der Publikation der Ergebnisse. Seine stetige Diskussionsbereitschaft hat einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Doktoranden, Mitarbeitern und Gästen des Institutes für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Oscar Alcazar, Simone Baltrusch, Matthias Elsner und Ingo Rustenbeck sowie Maren Böger, Anke Hager, Dagmar Lischke, Britta Lueken, Anne Petzold, Ute Sommerfeld und Martin Wirth.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Stephan Lortz
Geburtsdatum: 30.07.1969
Geburtsort: Gehrden, Landkreis Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1976 bis 1980 Grundsule Ronnenberg
1980 bis 1982 Orientierungsstufe Ronnenberg
1982 bis 1989 Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1989 bis 1995 Studium an der Universität von Hannover
Studiengang: Lehramt an Gymnasien mit der
Fächerkombination Biologie und Chemie
30.06.1995 Abschluß mit dem Ersten Staatsexamen für das
Lehramt an Gymnasien
ab dem Wintersemester 1995/96 Promotionsstudium an der Universität Hannover
Durchführung der Doktorarbeit am Institut für
Klinische Biochemie der Medizinischen
Hochschule Hannover (Prof. Dr. S. Lenzen)

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig unter Angabe aller Hilfsmittel verfaßt habe. Die vorliegende Dissertation ist nicht schon als Diplomarbeit oder vergleichbare Arbeit verwendet worden.

Hannover, den 07.01.1999

Stephan Lortz