UNTERSUCHUNGEN ZUR H_2O_2- UND EISENINDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG AN KULTIVIERTEN ZELLEN: EINFLUß DES ZELLULÄREN REDOXSTATUS

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“
(DR. RER. NAT.)

DES FACHBEREICHS CHEMIE
DER UNIVERSITÄT DUISBURG - ESSEN

VORGELEGT VON

ILKA KRISTINA LEHNEN-BEYEL

AUS VIERSEN

INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
CAMPUS ESSEN
2003

Die Straße gleitet fort und fort,
Weg von der Tür, wo sie begann,
Weit überland, von Ort zu Ort,
Ich folge ihr, so gut ich kann.
Ihr lauf ich raschen Fußes nach,
Bis sie sich groß und breit verflicht
Mit Weg und Wagnis tausendfach
Und wohin dann? Ich weiß es nicht.

J. R. R. Tolkien

DANKE!

Ich danke Herrn Prof. de Groot für die Möglichkeit, im Institut für Physiologische Chemie meine Doktorarbeit zu machen. Danke auch für die vielen fruchtbaren Diskussionen. Ihre Begeisterung für Ihr Fachgebiet ist ansteckend!

Herrn Prof. Sustmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Rauen, die die Betreuung meiner Arbeit in einer schwierigen Zeit übernommen hat. Ohne Sie und Ihre engagierte Betreuung, Ihren Einsatz sowie Ihre rückhaltlose Unterstützung wäre diese Arbeit nicht fertig geworden. Vielen Dank für die Zeit, die Sie sich genommen haben!

Ich danke Dr. Anke Fuchs für die intensive Betreuung während der ersten, molekularbiologischen Phase dieser Arbeit. Durch Dich und Deine sorgfältige und hingebungsvolle Art, Themen anzugehen, habe ich sehr viel gelernt und ganz neue Einblicke in molekularbiologische Zusammenhänge gewonnen!

Vielen Dank auch an Dr. Frank Petrat. Danke für Deine Hilfe in diversen Schwierigkeiten (und besonders für die Vorschläge, welche Kontrollen noch gemacht werden könnten...) und für Deine Bereitschaft, bei Problemen immer zur Verfügung zu stehen!

Nathalie Dehne und ganz besonders Uta Kerkweg danke ich für fachliche und – vor allem – moralische Unterstützung in allen Schwierigkeiten. Danke, daß Ihr mir so gute Freunde seid!

Eva Hillen, Martina Brachvogel, Britta Petrik und Birgit Lammers danke ich für die Bereitstellung von Zellen diverser Art (Endothelzellen, Hepatozyten...) sowie Hilfe und Rat in allen Labor- und Lebenslagen. Ohne Euch wäre es nicht das gleiche gewesen!

Danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie für das angenehme Arbeitsklima und die bereitwillig gewährte Hilfe. Insbesondere ohne Frau Heimeshoff wären viele Versuche nicht ohne Schwierigkeiten durchführbar gewesen (und mit Sicherheit nicht so schnell).

Dr. Hans-Gert Korth danke ich für die Beantwortung der diversen Fragen und die Durchführung der ESR-Messungen. Ich wußte nicht, daß solche Messungen so viel Spaß machen können!

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und Schwiegereltern sowie meiner Tante Mathilde und meinem Onkel Klaus, möchte ich für ihre Unterstützung auch in kritischen Zeiten danken. Danke für Eure Liebe!

Ohne meinen Mann Rainer wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für Deine Liebe, Unterstützung und Hilfe!

DIESE ARBEIT ENTSTAND VON JANUAR 1999 BIS DEZEMBER 2002 AM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN, CAMPUS ESSEN

REFERENT:	**PROF. DR. DR. H. DE GROOT**
KORREFERENT:	**PROF. DR. DR. H.C. R. SUSTMANN**
TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:	**09. MAI 2003**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) 1

1.2 DER ZELLULÄRE EISENSTOFFWECHSEL 3

1.3 ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN DER ZELLE 6

1.4 OXIDATIVER STREß UND MECHANISMEN DES ZELLUNTERGANGES 12

1.5 FRAGESTELLUNG 17

2. ERGEBNISSE 19

2.1 WASSERSTOFFPEROXID-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG KULTIVIERTER L929-FIBROBLASTEN 19

2.1.1 EINFLUß VON GLUCOSE AUF DIE H_2O_2-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG VON KULTIVIERTEN L929-ZELLEN 21

2.1.2 BETEILIGUNG DER MITOCHONDRIEN AN DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG 22

2.1.3 CALCIUMABHÄNGIGKEIT DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG 26

2.1.4 EISENABHÄNGIGKEIT DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG 28

2.1.5 EINFLUß VON ANTIOXIDANTIEN AUF DIE H_2O_2-INDUZIERTE ZELLSCHÄDIGUNG 31

2.1.6 BEEINFLUSSUNG DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG DURCH REGULIERTE ÜBEREXPRESSION DES ANTIAPOPTOTISCHEN PROTEINS BCL-2 32

2.2 EISENINDUZIERTE SCHÄDIGUNG VON KULTIVIERTEN ZELLEN 45

2.2.1 ERHÖHUNG DES CHELATISIERBAREN EISENPOOLS IN L929-ZELLEN 45

2.2.2 VERSTÄRKUNG DER EISENTOXIZITÄT DURCH D-GLUCOSE 46

2.2.3 VERSTÄRKUNG VON EISENINDUZIERTEM OXIDATIVEN STREß DURCH GLUCOSE 47

2.2.4 Ausschluß einer möglichen Energieabhängigkeit der Eisentoxizitätsverstärkung durch Glucose 49

2.2.5 Effekt von D-Glucose auf den zellulären Redoxstatus 49

2.2.6 Einfluß von D-Glucose auf die Eisenreduktion 51

2.2.7 Einfluß von Ascorbat und Glutathion auf die Eisenreduktion 55

2.2.8 Einfluß von Reduktionsmitteln auf die Eisentoxizität 57

2.2.9 Eisentoxizität in anderen kultivierten Zellen 59

2.2.10 Kälteinduzierte Verstärkung der Eisentoxizität in Hepatozyten und Leberendothelzellen 61

3. Diskussion 65

4. Zusammenfassung 77

5. Experimentelles 79

5.1 Materialien 79

5.1.1 Chemikalien 79

5.1.2 Geräte und Gebrauchsmaterialien 81

5.1.3 Zusammensetzung der häufig verwendeten Lösungen und Puffer 82

5.2 Methodik 82

5.2.1 Zellkultur 82

5.2.2 Cytotoxizität 83

a) Ansätze 83
b) Bestimmung der Vitalität der Zellen 85

5.2.3 Mikroskopische Methoden 85

a) Phasenkontrastaufnahmen 85
b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 85

5.2.4 NAD(P)H-Messungen 86

A) Fluoreszenzmikroskopische Messungen 86
B) Enzymatische Messungen mit Glutamat-dehydrogenase und α-Ketoglutarat 87

5.2.5 Glutathion-Messung 87

5.2.6 Bestimmung der Geschwindigkeit der Eisenreduktion 88

A) PhenGreen SK-Quenchung im zellfreien System 88
B) Zelluläre Messungen 90
C) ESR-Messungen 90

5.2.7 DCHF-Oxidation 91

5.2.8 Molekularbiologische Methoden 92

Allgemeine Methoden
A) Aufreinigung von DNA 92
B) Agarosegelelektrophorese 92

Modifikation von DNA-Enden
A) Restriktion 93
B) Klenow-Auffüllung 93
C) Phosphorylierung 93

PCR 94

Ligation 94

Herstellung kompetenter Bakterien 94

Amplifikation von DNA
A) Transformation 95
B) Amplifikation von DNA in kleinem Maßstab (Minipräparation) 95
C) Amplifikation von DNA in mittlerem/großem Maßstab (Midi/Maxipräparation) 96

Transfektion 96

Chemolumineszenz 97

Western-Blot
A) Lyse der Zellen 97
B) Elektrophorese (SDS-PAGE) 98
C) Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen 98
D) Hybridisierung und Detektion 98

Bradford-Test 99

5.2.9 Statistik 99

6. LITERATURVERZEICHNIS 101

7. ANHÄNGE 109

ANHANG I: SEQUENZEN UND EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN PRIMER 109

ANHANG II: ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNGEN UND SEQUENZEN DER VERWENDETEN VEKTOREN 109

ANHANG III: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 113

LEBENSLAUF 115

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS 116

1. EINLEITUNG

1.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)

Sauerstoff ist ein lebenswichtiges Element und kommt in der Natur in zweiatomiger Form (O_2), oxidisch gebunden als O^{2-} (beispielsweise in Metalloxiden) sowie kovalent gebunden in verschiedenen Salzen und anderen Molekülen vor. Aufgrund der Elektronenkonfiguration des diatomischen Moleküls – 2 ungepaarte Elektronen im 2pπ*-Orbital – ist der im Grundzustand als Triplett vorliegende Sauerstoff nur mäßig reaktiv. Durch Reduktion (= Elektronenaufnahme) kann sich die Elektronenkonfiguration im 2p-Orbital ändern und es kommt zur Bildung von hochreaktiven Spezies, die häufig als ROS („reactive oxygen species“) oder – zum Teil fälschlich – als „freie Radikale“ bezeichnet werden. Zu den biologisch wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies zählen hierbei das Superoxidanionradikal ($O_2^{-\cdot}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($^{\cdot}OH$).

In biologischen Systemen erfolgt die Reduktion des Sauerstoffes unter ATP-Bildung und damit Energiegewinn während der oxidativen Phosphorylierung durch die Enzyme der Atmungskette. Die Elektronen, die bei Redoxreaktionen während der Metabolisierung verschiedener Nährstoffe (hauptsächlich Kohlenhydrate und Fette) „frei“ werden, werden in den Mitochondrien über NADH, $FADH_2$ und verschiedene Zwischenakzeptoren (Ubichinol, Cytochrom c) durch die Cytochromoxidase unter Bildung von Wasser auf Sauerstoff übertragen. Läuft diese Reduktion nicht komplett (4-Elektronen-Reduktion), sondern nur partiell ab, können sich innerhalb der Zelle die erwähnten reaktiven Zwischenstufen bilden, die im folgenden genauer beschrieben werden sollen.

Das Superoxidanionradikal $O_2^{-\cdot}$ entsteht bei Übertragung von einem Elektron auf O_2, beispielsweise durch „Elektronenleaks“ in der Atmungskette, bei der monovalenten Oxidation von Ferrohäm zu Ferrihäm im Hämoglobin oder durch die Xanthin- oder NADPH-Oxidase. Sein amphoterer Charakter zeigt sich in seiner Fähigkeit zur Dismutation (Reaktion 1), also der Reaktion von zwei $O_2^{-\cdot}$-Molekülen zu einem H_2O_2- und einem O_2-Molekül, wobei ein Molekül $O_2^{-\cdot}$ als Elektronendonor (Reduktionsmittel) und das andere als Elektronenakzeptor (Oxidationsmittel) fungiert.

Reaktion 1 $$2\ O_2^{-\cdot} + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Reaktion 1: Dismutation von Superoxid
In dieser Reaktion wirkt ein Molekül $O_2^{-\cdot}$ als Reduktions-, das andere als Oxidationsmittel

In der Zelle wird die Dismutation von $O_2^{-\cdot}$ durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert, das die Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu einem Faktor von 10^6 beschleunigen kann und die Zelle vor den Folgen einer zu hohen $O_2^{-\cdot}$-Konzentration schützt. Steigt die Konzentration an $O_2^{-\cdot}$ nämlich zu stark an, kann es – besonders im Zusammenspiel mit Eisen – zur Reaktion mit verschiedenen Biomolekülen kommen, wobei diese zerstört und so unbrauchbar gemacht werden.

Werden zwei Elektronen auf Sauerstoff übertragen – beispielsweise enzymatisch durch verschiedene Oxidasen, wie die Glucoseoxidase oder Aminosäureoxidasen – entsteht, ebenso wie bei der schon erwähnten Dismutation von $O_2^{-\cdot}$, Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses relativ reaktionsträge Zwischenprodukt ($\varepsilon_0' = 0{,}38$ V) dient im zellulären Metabolismus als physiologisches Oxidans mit regulatorischen Funktionen. Es ist als einziges unter den hier beschriebenen Sauerstoffspezies frei membranpermeabel, was zur Folge hat, daß auch extrazellulär gebildetes H_2O_2 intrazellulär schädigen kann. Diese Eigenschaft wird von verschiedenen Zellen und Organismen ausgenutzt, die H_2O_2 extrazellulär bilden und damit unerwünschte Zellen zerstören. Auch während des normalen zellulären Metabolismus wird H_2O_2, je nach Zelltyp, in zum Teil großen Mengen gebildet; beispielsweise wurde für Rattenlebern eine H_2O_2-Bildung von 90 nmol pro Minute und pro Gramm Leber berechnet. Diese Bildungsrate kann durch einen erhöhten Sauerstoffpartialdruck und eine erhöhte Verfügbarkeit der Substrate der H_2O_2-bildenden Enzyme stark ansteigen. Obwohl H_2O_2 selbst nicht sehr reaktiv ist, birgt es eine hohe potentielle Toxizität, da es in Anwesenheit von Übergangsmetallionen des Kupfers und Eisens in die hochreaktiven OH-Radikale zerfällt. Physiologisch ist H_2O_2 an vielen Prozessen beteiligt, beispielsweise dient es als Botenstoff, ist Teil der Immunantwort und kann Apoptose induzieren (s.u.). Es ist an der Zellschädigung bei diversen pathophysiologischen Mechanismen wie Atherosklerose, Entzündungsreaktionen und Ischämie beteiligt [1, 2].

Wird H_2O_2 in einer monovalenten Reaktion reduziert (oder molekularer Sauerstoff in einer 3-Elektronen-Reaktion), entsteht das reaktivste unter den Sauerstoffspezies, das Hydroxylradikal. Mit einem Oxidationspotential von $\varepsilon_0' = 2{,}33$ V reagiert es praktisch am Ort seiner Entstehung („site specific“) weiter. Nahezu die gesamte Toxizität der reaktiven Sauerstoffspezies basiert auf der Bildung von Hydroxylradikalen. Die physiologisch wichtigste und bekannteste Reaktion, die zur Entstehung von OH-Radikalen führt, ist die Fenton-Reaktion (Reaktion 2b), in der

zweiwertiges Eisen oder einwertiges Kupfer eine Zersetzung von einem H_2O_2-Molekül in ein OH-Radikal und ein Hydroxidion katalysiert, wobei es selber oxidiert wird. Geht dieser Reaktion die Reduktion von Eisen in den zweiwertigen Zustand durch $O_2^{-\cdot}$ voraus, wird dieser Reaktionszyklus als „Haber-Weiss-Reaktion“ bezeichnet (Reaktion 2 a und b).

Reaktion 2a $Fe^{3+} + O_2^{-\cdot} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$

Reaktion 2b $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^-$ **(Fenton-Reaktion)**

Reaktion 2: Haber-Weiss-Reaktionszyklus

1.2 DER ZELLULÄRE EISENSTOFFWECHSEL

Ebenso wie Sauerstoff ist auch Eisen ein essentielles Element für nahezu alle Organismen. Es kommt physiologisch in zwei Oxidationsstufen vor: der Ferro-Form Fe^{II} und der Ferri-Form, Fe^{III}, die in wäßriger Lösung bei physiologischem pH-Wert sofort hydratisiert wird und das nur schwer lösliche Hydroxid bildet. Zweiwertiges Eisen hat die Elektronenkonfiguration $4s^0 3d^6$, wirkt somit leicht als Reduktionsmittel und wird in Anwesenheit von Luftsauerstoff relativ schnell zu Eisen(III) oxidiert. Eisen(III) ist ein d^5-System und liegt häufig im paramagnetischen High-Spin-Zustand vor, was einen Nachweis mittels ESR-Spektroskopie ermöglicht. Aufgrund des leichten Umschaltens zwischen den beiden Oxidationsstufen hat Eisen in physiologischen Systemen häufig die Aufgabe, als elektronensensitiver „Schalter“ oder als Elektronenüberträger bei verschiedenen Redoxreaktionen zu fungieren, das heißt, es ist oft regulative oder ausführende Komponente in Enzymen und Proteinen, in denen durch Änderung der Oxidationsstufe des Eisens eine Konformationsänderung induziert wird.

Um Eisen aus der Umgebung aufzunehmen, haben verschiedene Organismen unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Die einfachste Taktik verwenden einzellige Organismen: sie setzen starke Fe(III)-Chelatoren (Siderophore) in das sie umgebende Medium frei und nehmen die eisenbeladenen Moleküle als Ferrisiderophore wieder auf. Das bekannteste Beispiel für ein solches Siderophor ist Desferrioxamin, das als Desferal® auch therapeutische Anwendung findet. Höhere Organismen nehmen Eisen mit der Nahrung auf, das dann – durch die Magensalzsäure gelöst – in die Blutbahn gelangt, wo es in dreiwertigem Zustand an das Plasmaprotein Transferrin gebunden wird. Das Plasmaeisen wandert je nach Bedarf in die Leber (Bildung von Ferritin), ins Knochenmark (Bildung von Hämoglobin), in die

Muskeln (Bildung von Myoglobin, Myosin, Cytochrom c) usw. [3]. An seinem Bestimmungsort bindet das Transferrin an den Transferrinrezeptor und wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Eine Veränderung des pH-Wertes im Endosom vermindert die Eisenaffinität des Transferrins, was zu einer Freisetzung des Eisens in das Cytosol und einem Rücktransport des Transferrin/Rezeptorkomplexes an die Zelloberfläche führt [4]. Das dreiwertige Eisen wird nach seiner Freisetzung in den meisten Fällen in das Eisenspeicherprotein Ferritin eingebaut, das aus einem Proteinteil (Apoferritin, M = 450 kDa) und Micellen aus Eisen(III)hydroxid-Oxid der Zusammensetzung FeO(OH) mit wechselnden Phosphatgehalten besteht, wobei der Eisenkern (bis zu 4500 Eisenionen) von einer Kugelschale aus Proteinuntereinheiten umgeben ist [3, 4].

Der größte Teil des zellulären Eisens ist fest gebunden in Proteinen und Enzymen. Ein kleiner Teil (0,2-3%, [5-9]) liegt jedoch als „Übergangspool“ schwach gebunden an Liganden mit niedrigem Molekulargewicht, wie Phosphate oder Citrat, oder lose an Makromoleküle wie Proteine und Lipide assoziiert vor und bleibt somit für die Synthese von eisenhaltigen Proteinen verfügbar [5]. Dieser „labile“ Eisenpool wurde bereits 1976 beschrieben [10]; aufgrund seiner methodologischen Definition wird heute häufig der Ausdruck „chelatisierbarer“ Eisenpool verwendet.

Durch seine lose Assoziation ist das chelatisierbare Eisen im Gegensatz zu proteingebundenem Eisen, dessen Oxidationsstufe strikt kontrolliert wird und zu dem nur wenige Substrate Zugang haben, redoxaktiv und kann an verschiedenen Redoxreaktionen teilnehmen. So können zelluläre Antioxidantien wie Ascorbat und Glutathion als Ein-Elektronen-Reduktionsmittel wirken und halten den größten Teil des chelatisierbaren Eisens im zweiwertigen Zustand [11-15]. Eine besondere Bedeutung kommt den Reaktionen des chelatisierbaren Eisens mit reaktiven Sauerstoffspezies zu (s.u.). Chelatisierbares Eisen ist, wie der Name schon sagt, durch Chelatoren wie 2,2´-Dipyridyl oder Desferrioxamin komplexierbar, was in den meisten Fällen zu einer Verminderung seiner Redoxaktivität führt; in manchen Fällen steigert jedoch die Bindung bestimmter komplexierender Liganden die Bereitschaft zur Elektronenaufnahme bzw. -abgabe. So variiert zum Beispiel das Standardreduktionspotential von dreiwertigem Eisen je nach Ligand von -0,4 V (Fe^{3+}-Transferrin/Fe^{2+}-Transferrin) über -0,19 V (Fe^{3+}-Ferritin/Fe^{2+}-Ferritin) und +0,1 V (Fe^{3+}-Citrat/Fe^{2+}-Citrat) bis hin zu +0,26 V (Ferricytochrom c/Ferrocytochrom c) [16].

Die Größe des chelatisierbaren Eisenpools ist sehr strikt reguliert und befindet sich in einer Art „Fließgleichgewicht“, wobei eine Erhöhung der Konzentration über

eine Verstärkung der Eisenaufnahme durch Transferrin sowie durch die Freisetzung von Eisen aus Ferritin erfolgen kann und der Einbau des Eisens in Ferritin sowie in Funktionsproteine für eine Absenkung der Konzentration sorgt. Aufnahme und Einbau sind in der Zelle über ein komplexes System aus IREs (Iron-Responsive Elements) und IRPs (Iron-Regulatory Proteins) reguliert [4]. IREs sind Nukleotidsequenzen, die in mRNAs zur Bildung von strukturell hochkonservierten „Stem-Loops“ führen. Sie finden sich in nicht-translatierten Regionen (UTRs) von mRNAs eisenregulierter Gene wie dem Ferritingen und dem Transferrinrezeptorgen. IRPs sind RNA-bindende Proteine, die bei einer niedrigen intrazellulären Eisenkonzentration eine hohe Affinität zu den IRE-Bereichen der mRNAs besitzen. Diese Affinität wird in Anwesenheit von Eisen herabgesetzt, da dann der IRE-bindende Bereich durch einen Eisen-Schwefel-Cluster besetzt und die IRE-Bindung verhindert wird. Die Bindung von IRPs an IREs kann je nach Lage des IRE zwei sich ergänzende Effekte haben: liegen die IREs in einer 3´-UTR (also *hinter* dem codierenden Bereich), wie das beispielsweise bei der mRNA des Transferrinrezeptors der Fall ist, verhindert die Bindung eines IRPs die Zerstörung der mRNA durch Endonukleasen und bewirkt damit eine Verlängerung ihrer Lebensdauer. Befinden sich die IREs wie beispielsweise bei Ferritin dagegen in einer 5´-UTR (also *vor* der codierenden Sequenz), blockiert die IRP-Bindung die Translation der betreffenden mRNA. Eine niedrige Eisenkonzentration bewirkt also

1. eine höhere Verfügbarkeit der Transferrinrezeptor-mRNA, was zu einer verstärkten Expression des Rezeptors und damit einer erhöhten Möglichkeit der Transferrinaufnahme durch die Zelle führt, und
2. gleichzeitig eine Blockierung der Ferritinexpression, was dazu führt, daß das aufgenommene Eisen nicht sofort in das Speicherprotein eingebaut werden kann und sich die Konzentration an chelatisierbarem Eisen erhöht.

Ist diese Erhöhung ausreichend, bildet sich der Eisen-Schwefel-Cluster der IRPs wieder aus, wodurch die Ferritinexpression ansteigt und die Transferrinrezeptorexpression sinkt.

Lange galt trotz vieler Hinweise auf eine ubiquitäre Verteilung des chelatisierbaren Eisens in allen Zellkompartimenten die Meinung, daß chelatisierbares Eisen nur im Cytosol vorkommt. Petrat konnte jedoch mit Hilfe der PhenGreen-Methode [13] nicht nur zeigen, daß in anderen Zellkompartimenten chelatisierbares Eisen vorliegt [14], sondern auch die ungefähre Größe des Pools sowohl in den Kernen als auch in Bereichen der Lysosomen und des endoplasmatischen

Retikulums von Rattenhepatozyten und Rattenleberendothelzellen bestimmen [17]. Petrat und Weisheit konnten schließlich durch Verwendung eines spezifischen mitochondrialen Farbstoffes die Größe des mitochondrialen Pools in Rattenhepatozyten messen [18]. An einer Charakterisierung des Eisenpools anderer Zellkompartimente durch spezifische Farbstoffe wird zur Zeit gearbeitet.

1.3 ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN DER ZELLE

Da Sauerstoff aufgrund der oben beschriebenen Reaktionen für alle aeroben Lebewesen toxisch ist, haben nahezu alle Organismen verschiedene antioxidative Verteidigungssysteme entwickelt. Einige dieser Systeme basieren wie im Fall der Superoxiddismutase (SOD), der Katalase oder von Peroxidasen auf dem enzymatischen Abbau von ROS, andere nutzen Agentien mit niedrigem Molekulargewicht wie Glutathion und Ascorbat, um die reaktiven Spezies abzufangen. Auch die oben schon teilweise besprochene Minimierung der Verfügbarkeit von Prooxidantien wie zweiwertigem Eisen, Häm oder einwertigem Kupfer durch bestimmte Proteine ist ein wichtiger Verteidigungsmechanismus. Viele Zellen enthalten darüber hinaus noch Proteine, die Biomoleküle auf andere Weise vor Zerstörung schützen, wie beispielsweise die Heat-Shock-Proteine. Im weiteren sollen einige dieser Mechanismen etwas genauer beschrieben werden.

Bei den Superoxiddismutasen, die in nahezu allen Organismen gefunden werden können, unterscheidet man nach den im aktiven Zentrum präsenten Metallionen die Kupfer-Zink-SODs (CuZnSOD), die hauptsächlich in Eukaryoten vorkommen und im Cytosol lokalisiert sind, und die bakteriellen und mitochondrialen manganhaltigen SODs, MnSODs. Das Prinzip der Katalyse der Dismutation von $O_2^{-\cdot}$ ist in beiden Fällen sehr ähnlich (Reaktion 3): im ersten Schritt wird ein Elektron von $O_2^{-\cdot}$ auf das katalytisch-aktive Metallion (Kupfer oder Mangan) übertragen, wobei dieses reduziert wird und sich molekularer Sauerstoff bildet. Im zweiten Schritt wird in Anwesenheit von Protonen dieses Elektron auf ein zweites Molekül $O_2^{-\cdot}$ übertragen, dabei das Metallion wieder oxidiert und ein Molekül H_2O_2 gebildet. So erhält man wiederum die oben beschriebene Gesamtreaktion (Reaktion 1). Der Aufbau der Enzyme ist jedoch unterschiedlich: während die CuZnSODs in der Regel ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa haben, aus zwei Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum bestehen und sehr stabil gegen organische Lösungsmittel, Detergenzien sowie Temperatur- und pH-Schwankungen sind, sind die MnSODs größer (etwa

40 kDa), bestehen aus vier Untereinheiten, die 0,5 bis 1 Manganion pro Untereinheit enthalten und sind gegenüber den oben erwähnten Störungen sehr empfindlich. Die von den CuZnSODs katalysierte Reaktion ist praktisch pH-unabhängig (mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{bov.\ SOD} = 1{,}6 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$); dagegen nimmt die Geschwindigkeitskonstante der durch die MnSOD katalysierten Reaktion im Alkalischen ab. Den größten Teil des Superoxidabbaus übernehmen im allgemeinen die CuZnSODs (80-90%), während die MnSODs praktisch ausschließlich mitochondriales $O_2^{-\cdot}$ abbauen und ihr Anteil an der Gesamt-SOD-Aktivität 10-20% beträgt. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Kupfermangel, kann jedoch der Anteil an MnSOD erhöht werden, um die totale zelluläre SOD-Aktivität konstant zu halten; diese neugebildete MnSOD ist dann im Cytosol lokalisiert. In einigen Bakterien wurden SODs gefunden, die statt des Kupfers oder Mangans Eisen im aktiven Zentrum als katalytisches Metallion benutzen.

Reaktion 3a $\quad E\text{-}Me^{n+} + O_2^{-\cdot} \longrightarrow E\text{-}Me^{(n-1)+} + O_2$

Reaktion 3b $\quad E\text{-}Me^{(n-1)+} + O_2^{-\cdot} + 2H^+ \longrightarrow E\text{-}Me^{n+} + H_2O_2$

Reaktion 3: Reaktionsmechanismus der Superoxiddismutase
E = Enzym, Me = Metallion (Cu^{2+}, Mn^{3+} oder Fe^{3+}); die Gesamtreaktion entspricht Reaktion 1.

Das aus dem $O_2^{-\cdot}$ entstehende H_2O_2 kann – besonders im Zusammenspiel mit Eisen, s.o. – ebenfalls toxisch für die Zelle sein. Den meisten Zellen stehen zwei Arten von Detoxifizierungsenzymen zur Verfügung: Die *Katalasen*, die direkt die Dekomposition von H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff katalysieren (Reaktion 4a), und die *Peroxidasen*, die H_2O_2 abbauen, indem sie Elektronen von einem Substrat übertragen, welches dabei oxidiert wird (Reaktion 4b).

Reaktion 4a $\quad 2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$

Reaktion 4b $\quad Substrat\text{-}H_2 + H_2O_2 \longrightarrow Substrat + 2\ H_2O$

Reaktion 4: Reaktionen zur H_2O_2-Entgiftung
Reaktion 4a ist die Nettoreaktion der Katalasen, Reaktion 4b die der Peroxidasen

Katalasen, in Eukaryoten praktisch ausschließlich in den Peroxisomen lokalisiert, bestehen im allgemeinen aus 4 Proteinuntereinheiten, von denen jede eine Ferrihäm-Gruppe im aktiven Zentrum trägt. Diese Häm-Gruppen sind durch ihre Lage im Protein (20 Å von der Oberfläche entfernt; zugänglich nur durch einen schmalen hydrophoben Kanal) vor unspezifischen Reaktionen mit anderen Molekü-len als H_2O_2 geschützt. Jede Untereinheit besitzt darüber hinaus noch je ein NADPH-Molekül [16].

Der Reaktionsmechanismus ist relativ komplex, allerdings mittlerweile recht gut untersucht [19]: im ersten Schritt „übernimmt“ das dreiwertige Häm-Eisen ein Sauerstoffatom aus einem Molekül H_2O_2, wobei sich neben einem Wassermolekül das stark oxidierende „Compound I“ bildet, das ein Porphyrinradikalkation enthält. Compound I kann – je nach Bedingungen – auf verschiedene Arten weiterreagieren:

a) Mit einem weiteren H_2O_2-Molekül bildet sich über eine Eisen(IV)-Zwischenstufe molekularer Sauerstoff im Grundzustand, ein weiteres Molekül Wasser und das ursprüngliche Ferrihäm. Dies ist die „normale“ Katalasereaktion, die bevorzugt abläuft, wenn das Verhältnis H_2O_2/Katalase hoch ist [16].

b) Wird ein äquimolares Verhältnis von H_2O_2 und Katalase nicht überschritten, kann Compound I bei Verfügbarkeit eines oxidierbaren Substrates auch peroxidatisch in einer Zwei-Elektronen-Reaktion reagieren [16, 19]; so werden beispielsweise niedermolekulare Alkohole in ihre Aldehyde überführt, Ameisensäure zu CO_2 und Nitrit zu Nitrat oxidiert [16].

c) Zerfällt Compound I ohne Umsetzung eines Substrates durch Aufnahme nur eines Elektrons, bildet sich das inaktive Compound II, das Eisen in der Oxidationsstufe IV enthält. Mit Hilfe des gebundenen NADPH wird es wieder in die dreiwertige Form überführt und die aktive Katalase wiederhergestellt.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von Katalase ist sehr hoch; die Reaktion wird jedoch bei kleineren H_2O_2-Konzentrationen verlangsamt, da unter diesen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit, daß zwei H_2O_2-Moleküle das aktive Zentrum erreichen, geringer ist.

Die wichtigsten Peroxidasen sind die Glutathionperoxidasen (Gpx), die die H_2O_2-Reduktion mit der Oxidation von Glutathion, einem Tripeptid mit freier Cystein-SH-Gruppe, verknüpfen (Reaktion 5). Glutathionperoxidasen sind in praktisch allen tierischen Geweben weit verbreitet; im Gegensatz zu Katalase ist Glutathionperoxidase sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert. Neben H_2O_2 können einige Glutathionperoxidasen auch andere Peroxide wie bestimmte Lipidperoxide reduzieren; sie verwenden jedoch ausschließlich Glutathion (GSH) als Wasserstoffdonor.

Reaktion 5 $2\ GSH + ROOH \longrightarrow GSSG + 2\ ROH$

Reaktion 5: Nettoreaktion der Glutathionperoxidase
R ist meistens H; einige Gpx können jedoch auch Lipidperoxide reduzieren

Glutathionperoxidasen bestehen ebenfalls aus vier Proteinuntereinheiten, die jeweils ein aktives Zentrum mit einem Selenocystein enthalten. Schema 1 zeigt den Mechanismus der Gpx-katalysierten Reduktion von Peroxiden: im ersten Schritt reduziert ein Selenol-Anion ein Molekül Peroxid zum korrespondierenden Alkohol und wird dabei zur selenischen Säure (SeOH) oxidiert (1). Die folgenden zwei Schritte (2) und (3) bestehen aus der sequentiellen Reduktion der selenischen Säure durch Glutathion, wobei zuerst ein Selensulfid und Wasser gebildet (2) und anschließend das Selenol regeneriert und dabei Glutathion unter Bildung von GSSG oxidiert wird (3).

(1) $E\text{-}Cys\text{-}Se^- + ROOH + H^+ \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}SeOH + ROH$

(2) $E\text{-}Cys\text{-}SeOH + GSH \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}SeOH\text{-}SGH \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}Se\text{-}SG + H_2O$

(3) $E\text{-}Cys\text{-}Se\text{-}SG + GSH \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}Se\text{-}SG\text{-}GSH \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}SeH\text{-}GSSG \longrightarrow E\text{-}Cys\text{-}Se^- + H^+ + GSSG$

Schema 1: Mechanismus der von Glutathionperoxidase katalysierten Entgiftung von Peroxiden
E = Enzym

Um das Verhältnis GSH/GSSG in der Zelle hochzuhalten (in den meisten Geweben mind. 10:1), wird das gebildete GSSG durch das Enzym Glutathion-Reduktase unter Verwendung von NADPH als Elektronendonor reduziert und wieder als GSH zur Verfügung gestellt.

Neben seiner Aufgabe als Cofaktor für Glutathionperoxidase ist Glutathion an vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt; so ist es ein radioprotektives Agens, wirkt als Cofaktor für verschiedenste Enzyme in diversen Stoffwechselwegen und spielt eine Rolle bei der Proteinfaltung und der Degradation von Proteinen [16]. Es ist ein Tripeptid aus Glycin, Glutamat und Cystein, wobei Cystein und Glutamat über eine atypische Peptidbindung aus der Aminogruppe des Cysteins und der γ-Carboxylgruppe des Glutamats verknüpft sind (Abbildung 1).

Glutathion kann sowohl direkt als Antioxidans wirken und SH-Gruppen von Proteinen vor Oxidation und Cross-Linking schützen als auch zur Regeneration anderer Antioxidantien, besonders von Ascorbat, beitragen. Seine antioxidative Wirkung basiert auf der Möglichkeit, sowohl in Ein-Elektronen-Reaktionen Radikale abzufangen, wobei Thiyl-Radikale gebildet werden, als auch Elektronen für Zwei-Elektronen-Reduktionen zur Verfügung zu stellen, was zur Bildung von GSSG führt, welches wiederum durch die Glutathionreduktase mit NADPH als Elektronendonor re-reduziert werden kann. Die Glutathionsynthese findet im Cytosol statt, von dem

aus es in andere Zellkompartimente wie Mitochondrien transportiert wird [20]; es kann jedoch nicht – „unzerlegt“ – aus dem Extrazellulärmedium in die Zelle transportiert werden [21]. Glutathion ist – auch wegen seiner hohen zellulären Konzentrationen (millimolar) – eins der zentralen Antioxidantien und kann unter bestimmten Bedingungen sogar die Aufgaben anderer Antioxidantien übernehmen.

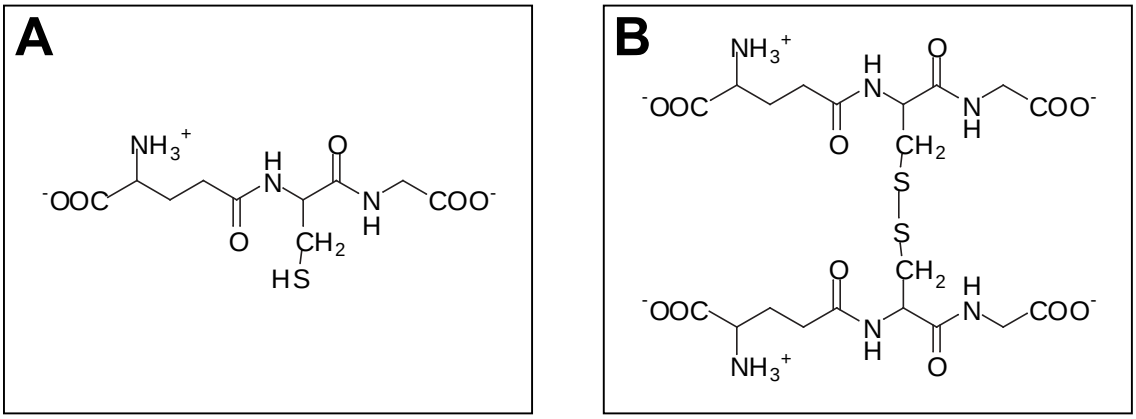


Abbildung 1: Struktur von Glutathion
A) reduzierter Zustand, B) oxidierter Zustand

Auch Ascorbinsäure (Vitamin C) ist eins der zentralen Antioxidantien. Es kann von vielen Organismen mit Hilfe der Gluconolactonoxidase aus Glucose synthetisiert werden; einige Spezies, wozu auch der Mensch gehört, sind jedoch auf eine Supplementierung von Ascorbat durch die Nahrung angewiesen. Ascorbat kann sowohl in seiner reduzierten als auch in seiner oxidierten Form (als Dehydroascorbat, Abbildung 2) auch gegen einen Konzentrationsgradienten von den Zellen aufgenommen werden. Obwohl der Dehydroascorbattransport schneller ist, wird die intrazelluläre Konzentration an Dehydroascorbat durch sofortige Reduktion sehr niedrig gehalten. Beide Transportsysteme sind natriumabhängig.

Ascorbat hat die höchste Radikalfängerkapazität und das am stärksten reduzierende Redoxpotential aller zellulären Antioxidantien; sein Recycling ist daher von primärer Bedeutung. Die Re-Reduktion von Dehydroascorbat kann entweder nicht-enzymatisch verlaufen, wobei Glutathion, das meistens in einer höheren Konzentration vorliegt, die Elektronen zur Verfügung stellt, oder enzymatisch über Dehydroascorbatreduktasen, einer Gruppe von Enzymen, die nicht vollständig charakterisiert sind. Sie verwenden entweder Glutathion oder NADH als Hydridionendonor. Auch die Ein-Elektronen-Reduktion des beim Kettenabbruch von Radikalkettenreaktionen durch Ascorbat entstehenden Ascorbylradikals kann enzymatisch über

die Semi-Dehydroascorbatreduktase, die ebenfalls NADH als Elektronendonor verwendet, oder nicht-enzymatisch durch Rekombination mit anderen Radikalen verlaufen. In Zellinien ist der Gehalt an Ascorbat extrem gering, weshalb es dort wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt (siehe Diskussion).

Andere wichtige Antioxidantien wie Vitamin E, Thioredoxin, Bilirubin, Melatonin, Coenzym Q, Harnsäure, Liponsäure und Carotinoide wirken auf eine ähnliche Art und Weise. Ihr Recycling verläuft ebenfalls über Ascorbat, Glutathion oder NAD(P)H.

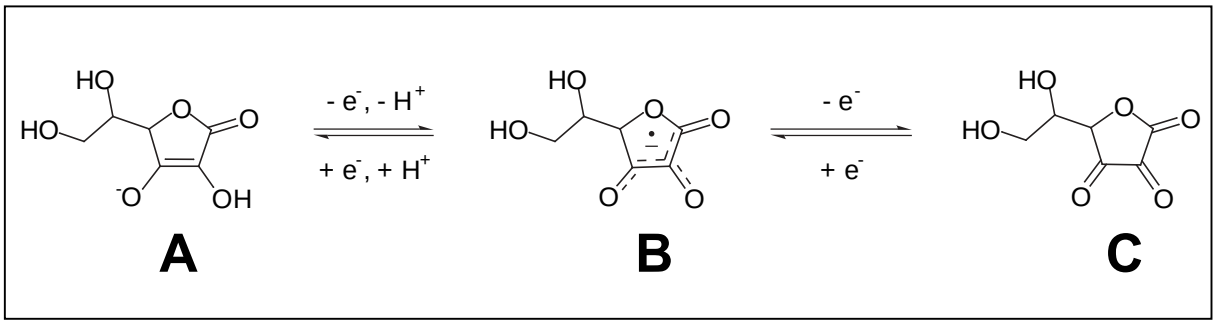


Abbildung 2: Struktur von Ascorbat
A) reduzierte Form, B) durch Aufnahme eines Elektrons entstehendes Ascorbylradikal, C) durch 2-Elektronen-Reduktion entstehendes Dehydroascorbat

Nahezu alle antioxidativen Mechanismen basieren auf Redoxreaktionen, in denen durch Elektronenübertragungen hochreaktive Spezies in moderat reaktive überführt werden. Daher kann die antioxidative Verteidigung nur gut funktionieren, wenn den Antioxidantien ausreichend Elektronen zum Regenerieren zur Verfügung stehen, also die reduktive Kapazität der Zelle ausreichend ist. Die Hauptelektronen-„speicher“ und -„verteiler“ sind Nicotinamidadenosindinukleotid (NAD^+/NADH) und Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat ($NADP^+$/NADPH). Da sie chemisch praktisch äquivalent sind, wird im folgenden die Form $NAD(P)^+$ – bzw. NAD(P)H für die reduzierte Form – verwendet. NAD(P)H spielt bei der Mehrzahl der unter Dehydrierung und Hydrierung verlaufenden Prozesse die Rolle des Wasserstoffüberträgers. Dabei wird Nicotinamidadenosindinukleotid, das *in vivo* überwiegend in der oxidierten Form vorliegt, im Katabolismus (Glykolyse, Citratcyclus usw.) reduziert und speist schließlich den Wasserstoff in die Atmungskette ein. Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat, das hauptsächlich in der reduzierten Form NADPH vorliegt, liefert für verschiedene Biosynthesen die benötigten Reduktionsäquivalente. Die (Re-)Reduktion des $NADP^+$ findet vorwiegend im Pentose-Phosphat-Zyklus statt. Bei diesen Redoxreaktionen geht der Nicotinamid-Teil durch Aufnahme eines Hydrid-Ions in ein

1-substitutiertes 1,4-Dihydronicotinsäureamid über; erfolgt diese Reduktion enzymatisch, handelt es sich um einen Zwei-Elektronen-Schritt [3]. Diese Art der Elektronenübertragung ist für Zellen essentiell, da damit sowohl verschiedenste Stoffwechselprozesse angetrieben als auch direkte Antioxidantien wie Glutathion regeneriert werden. Auch eine monovalente Reduktion des NAD(P)H unter Bildung von Radikalen rückt in letzter Zeit verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses: es konnte nachgewiesen werden, daß unter bestimmten Bedingungen NAD(P)H als direktes Antioxidans wirken kann [22, 23].

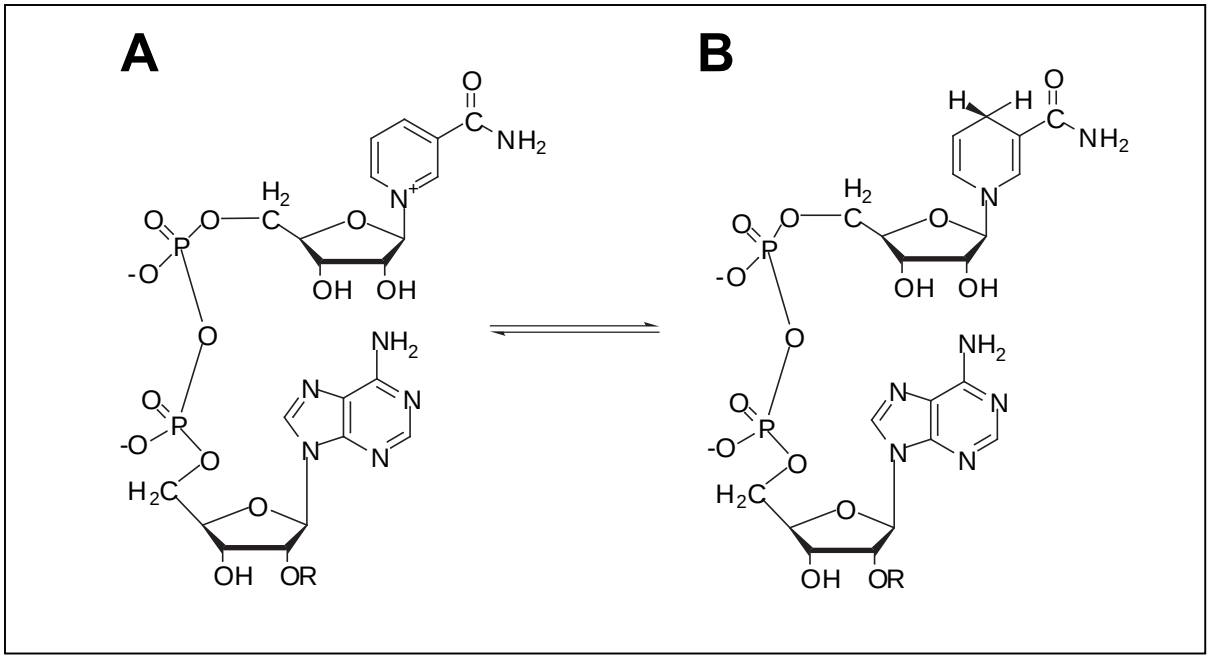


Abbildung 3: Struktur von NAD(P)$^+$ und NAD(P)H
Durch Aufnahme von Hydrid geht die oxidierte Form (A) des Nicotinamidringes in die reduzierte (B) über. R = H in NAD^+/NADH, R = PO_3^{2-} in $NADP^+$/NADPH

Der reduktive Zustand der Zelle ist nicht nur für die direkte Regulation der Menge an Antioxidantien entscheidend; eine Änderung des Redox-Gleichgewichtes kann auch verschiedenste zelluläre Prozesse in Gang setzen oder beeinflussen. So induziert die Oxidation von bestimmten Proteinen durch die Bildung von Disulfidbrücken Konformationsänderungen, die in Nicht-Säugersystemen zur Transkriptionsaktivierung verschiedener Gene führen können. Die Bedeutung von ROS als Signalmoleküle ist erst seit kurzem bekannt und Gegenstand intensiver Studien.

1.4 OXIDATIVER STREß UND MECHANISMEN DES ZELLUNTERGANGES

Ist die Störung in der prooxidativen/antioxidativen Balance der Zelle zugunsten der Prooxidantien so stark, daß sie potentiell zur Schädigung der Zelle führen kann,

spricht man von oxidativem Streß. Zellen, die oxidativem Streß ausgesetzt sind, können ihren Zustand reversibel temporär oder dauerhaft ändern; bei dauerhaften Veränderungen wie der Induktion von antioxidativen Verteidigungsmechanismen, „heat-shock“-Proteinen oder Cytochromen P450 spricht man von Adaption [16]. Ist eine solche Adaption aufgrund der Stärke oder der Art des oxidativen Stresses nicht möglich, kann der Zelluntergang durch einen apoptotischen oder einen nekrotischen Mechanismus erfolgen; auch Mechanismen, die sowohl apoptotische wie auch nekrotische Kennzeichen zeigen, wurden beobachtet.

Die molekularen Mechanismen der oxidativen Zellschädigung basieren größtenteils auf der primären Bildung von $H_2O_2/O_2^{-\cdot}$ und der oxidativen Wirkung der daraus entstehenden Spezies wie dem OH-Radikal. Eine der grundlegendsten Reaktionen ist dabei die Oxidation von SH-Gruppen, die sowohl in dem wichtigen zellulären Antioxidans Glutathion als auch in Proteinen und aktiven Zentren von Enzymen vorhanden sind. Eine Oxidation dieser SH-Gruppen führt zur Bildung von Disulfidbrücken, die entweder Glutathion und eine Protein-SH-Gruppe (gemischte Disulfide) oder zwei Protein-SH-Gruppen kovalent miteinander verbinden. Dadurch wird die Funktion der Proteine nachhaltig und oft irreversibel zerstört. So ist die Oxidation vicinaler SH-Gruppen in Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran ein wahrscheinlicher Auslöser des mitochondrialen Permeabilitätsüberganges (s.u.). Die weitreichendste Folge einer solchen SH-Gruppen-Oxidation ist die Dysregulation des zellulären Calciumstoffwechsels durch die Modifikation von Calciumtransportkanälen und -systemen und einem daraus resultierenden Einstrom von Calcium in das Cytosol. Da Calcium unter anderem in der Regulation verschiedenster Hydrolasen eine wichtige Rolle spielt, hat ein solch starker und plötzlicher Calciumanstieg im Cytosol für die Zelle fatale Folgen. Besonders die daraus resultierende Aktivierung der Phospholipase A_2, die die Spaltung von Membranphospholipiden katalysiert, kann zu einer Überproduktion freier Fettsäuren sowie von Hydrolyseprodukten von Membranlipiden führen, was eine verstärkte Bildung von Prostaglandinen und eine detergenzähnliche Membranzerstörung verursachen kann. Gleichzeitig können Calpaine aktiviert werden, eine Gruppe von Proteasen, die u.a. aktinbindende Proteine spalten und damit die Verankerung der Plasmamembran am Cytoskelett zerstören können. Als eine Folge davon ist starkes Membranblebbing zu sehen, das zusätzlich durch die Dissoziation von Aktinmikrofilamenten von α-Actinin gefördert wird. Neben der Lipid- und der Proteinzerstörung können durch einen Calciumanstieg auch calciumabhängige Endonukleasen aktiviert werden, die eine Fragmentierung

der DNA verursachen, die wiederum bei der Induktion der Apoptose als entscheidender Faktor gilt. Auch an der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore kann, neben anderen auslösenden Agentien, ein Anstieg der Calciumkonzentration beteiligt sein.

In Anwesenheit von $O_2^{-\cdot}$ bzw. H_2O_2 kommt auch dem chelatisierbaren Eisen eine erhebliche Bedeutung zu, da es, wie oben beschrieben, in der Fenton-Reaktion (Reaktion 2b) den Zerfall des eher reaktionsträgen H_2O_2 in das hochoxidierende OH-Radikal katalysieren kann. Die freie Membranpermeabilität von H_2O_2 und das Vorkommen chelatisierbaren Eisens in nahezu allen Zellkompartimenten bewirken bei einem Anstieg der H_2O_2-Konzentration die Bildung von OH-Radikalen in direkter Nachbarschaft wichtiger Biomoleküle, die dann durch die hohe Reaktivität des OH-Radikals, das praktisch am Ort seiner Entstehung weiterreagiert, oxidiert und für die Zelle unbrauchbar gemacht werden. So induziert die Reaktion von OH-Radikalen mit ungesättigten Fettsäuren eine Radikalkettenreaktion, in der sich Lipidperoxide und reaktive Aldehyde bilden. Diese Reaktion zerstört Membranlipide und kann damit auch zum Integritätsverlust sowohl von intrazellulären Membranen wie der Mitochondrienmembran als auch der Plasmamembran der Zelle führen. Ebenfalls von immenser Bedeutung für die Zelle sind die Reaktionen von OH-Radikalen mit Nukleinsäuren, die von der Addition an die Purin- oder Pyrimidinringe über die Wasserstoffatomabstraktion und die Bildung verschiedener Basenperoxide bis zur Fragmentierung der Desoxyribose und die Bildung kovalenter Bindungen zwischen DNA-Bestandteilen und den sie umgebenden Histonen („Cross-Linking”) reichen können und damit ein hohes mutagenes Potential tragen [16, 19]. Auch die oxidative Zerstörung von Proteinen kann, wenn Aminosäuren in oder nahe am aktiven Zentrum oder strukturell essentielle Aminosäuren betroffen sind, direkt oder durch sekundäre Prozesse tödliche Folgen für die Zelle haben. Hierbei sind neben der direkten Inaktivierung von Enzymen auch die Zerstörung von Rezeptorproteinen, Proteinen der Signaltransduktionswege und Transportproteinen problematisch.

Der Anstieg der $O_2^{-\cdot}$-Bildung kann, neben den erwähnten oxidativen Effekten, auch „reduzierenden Streß” auslösen. Dabei kann beispielsweise der chelatisierbare Eisenpool erhöht werden, indem ferritingebundenes Eisen oder Eisen aus Eisen-Schwefel-Clustermolekülen durch $O_2^{-\cdot}$ reduziert und dadurch freigesetzt wird [12]. Dies wiederum kann zu einer verstärkten Produktion von OH-Radikalen in der Fenton-Reaktion führen und die Zelle wird auf die oben beschriebene Weise geschädigt.

Verschiedene der beschriebenen Reaktionen, besonders die SH-Oxidation in Membranproteinen der mitochondrialen Membranen und ein Calciumanstieg zusammen mit anderen Faktoren, können zu einer Schädigung der Mitochondrien führen und den mitochondrialen Permeabilitätsübergang (Mitochondrial Permeability Transition, MPT) auslösen [24]. Nach der klassischen Theorie bildet sich dabei zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran eine Pore, die zum Zusammenbrechen des Protonengradienten und damit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt [25]. Eine Folge hiervon ist ein osmotisches Ungleichgewicht, das den Einstrom von Wasser in die mitochondriale Matrix verursacht. Dadurch entfaltet sich die innere Mitochondrienmembran und die Matrix schwillt stark an, was zum „Platzen" der äußeren Membran und der Freisetzung im Intermembranraum befindlicher Moleküle ins Cytosol führt [26, 27]. Einige dieser Moleküle, besonders Cytochrom c und AIF (Apoptosis Inducing Factor), sind Schlüsselmoleküle bei der Initiation einer Kaskade von Reaktionen wie der Aktivierung verschiedener Proteasen und Nukleasen, die die typisch apoptotischen Zeichen des Zelltodes wie Zellschrumpfung, „Blebbing" mit Bildung von apoptotischen Körperchen sowie Kernkondensation und -fragmentation verursachen [28].

Die Zelle besitzt neben ihrer klassischen antioxidativen Verteidigung diverse weitere Mechanismen zur Regulation des Zelltodes. Eine sehr wichtige Rolle spielen hier die Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie, die zum Teil pro- (z.B. Bid, Bax) und zum Teil antiapoptotische (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L) Wirkungen haben (zusammengefaßt in [29-31]). Die Mechanismen der Wirkungsweise dieser Proteine scheinen sehr vielfältig zu sein; so wurde neben einer Apoptoseregulation durch Hetero- und Homodimerbildungen, der Funktion als „Second Messenger" und einer Beteiligung an der Bildung von Ionenkanälen – und damit eine mögliche Beeinflussung der MPT – festgestellt, daß besonders Bcl-2, ein 24 kDa integrales Membranprotein, das in der inneren Mitochondrienmembran, der Membran des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran lokalisiert ist [32], den Redoxzustand in verschiedenen Zelltypen beeinflussen kann [33, 34]. So wurde beispielsweise bei einer Überexpression von humanem Bcl-2 in Rattenfibroblasten ein deutlicher Schutzeffekt gegen H_2O_2-induzierte Zellschädigung beobachtet, der sich eindeutig auf einen erhöhten Glutathiongehalt und einen daraus resultierenden verminderten Calciumanstieg zurückführen ließ. Ähnliche Effekte auf den Glutathiongehalt konnten auch in anderen Zelltypen beobachtet werden [35-44].

Bei ROS-abhängigen Zell- und Gewebeschädigungen ist oft nicht klar, welcher der beschriebenen Mechanismen – also Anstieg des Calciumspiegels oder eisenabhängige Bildung von Hydroxylradikalen – der eigentliche pathogenetisch entscheidende Faktor ist. So sehen einige Arbeitsgruppen bei der H_2O_2-induzierten Zellschädigung die Ursache für den Zelluntergang ausschließlich in einem Anstieg des cytosolischen Calciumspiegels [45-47], der zu einer Aktivierung von verschiedenen calciumabhängigen Prozessen und damit zum Zelltod führt [45, 48-50]; andere Arbeitsgruppen konnten dagegen nachweisen, daß die eigentlich entscheidende Reaktion die eisenkatalysierte Bildung von OH-Radikalen in einer fentonähnlichen Reaktion ist [51, 52]. Diese Ausschließlichkeit der Mechanismen wurde schließlich von Lomonosova et al. widerlegt: bei der Untersuchung der H_2O_2-induzierten Zellschädigung in kultivierten L929-Fibroblasten zeigte sich, daß der Mechanismus der Schädigung durch die Zugabe von Glucose von einem schnellen, calciumabhängigen in einen (langsameren) eisenabhängigen umgeschaltet werden kann [53]. Auch Rimpler [54] fand bei der Untersuchung der H_2O_2-induzierten Schädigung von Rat-1-Rattenfibroblasten eine solche Dualität des Schädigungsmechanismus. In beiden Fällen wurde eine Hemmung des calciumabhängigen Schädigungsweges durch die Zugabe von Glucose und der darauf folgenden Verbesserung der Glutathionreduktion bzw. der Erhöhung des Spiegels an reduziertem Glutathion beschrieben, die auf eine Erhöhung der NADPH-Bereitstellung über den Pentose-Phosphat-Weg zurückgeführt wurde. Eine ähnliche Beeinflussung des calciumvermittelten Schädigungsweges konnte im Rat-1-Modell auch durch die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 erzielt werden [54]. Gleichzeitig schien in beiden Modellen die eisenabhängige Komponente der H_2O_2-Schädigung durch die Zugabe von Glucose über einen unbekannten Mechanismus verstärkt zu werden. Auch schien sich die Zellschädigung besonders in L929-Zellen in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Glucose morphologisch stark zu unterscheiden; während die Morphologie der Zellen in Abwesenheit von Glucose relativ gut dokumentiert wurde, gibt es nicht viele Informationen über die Ausprägung der eisenabhängigen Schädigung in Anwesenheit von Glucose.

1.5 FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit soll die H_2O_2-induzierte Zellschädigung in L929-Fibroblasten genauer charakterisiert werden. Neben der Zugabe von Glucose soll auch durch eine regulierbare Überexpression von Bcl-2 in L929-Zellen der zelluläre Redoxzustand beeinflußt und die Effekte der unterschiedlichen Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten auf den Verlauf und die Morphologie der Schädigung untersucht werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die eisenabhängige Komponente der Schädigung. Zum besseren Verständnis des eisenabhängigen Mechanismus soll zusätzlich eine rein eiseninduzierte Schädigung und ihre Beeinflussung durch den zellulären Redoxstatus charakterisiert werden. Dazu wird ein Modell zur artifiziellen Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools in L929-Zellen durch Zugabe eines lipophilen Eisenkomplexes ohne primäre Erhöhung der Konzentration an $O_2^{-\cdot}$ und H_2O_2 verwendet und im Hinblick auf den Einfluß von Glucose auf die dadurch hervorgerufene Schädigung untersucht.

2. ERGEBNISSE

2.1 WASSERSTOFFPEROXID-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG KULTIVIERTER L929-FIBROBLASTEN

Um die Wirkung von H_2O_2 auf kultivierte Zellen (murine L929 Fibroblasten) *in vitro* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Experimente, in denen die H_2O_2-Zugabe als Bolus erfolgte, durchgeführt. Diese direkte Zugabe von H_2O_2 zu kultivierten L929-Fibroblasten in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer (KH) resultierte in einem konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust, der durch die Messung der Trypanblau-Aufnahme und der Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt wurde. Abbildung 4 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit anhand der LDH-Freisetzung; die mit Trypanblau erhaltenen Werte waren äquivalent.

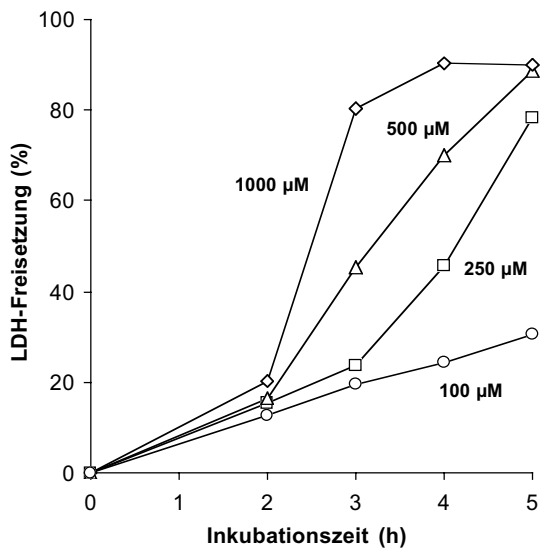


Abbildung 4: Konzentrationsabhängigkeit der Zellschädigung durch H_2O_2 in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer
L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert und H_2O_2 als Bolus in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Vitalität der Zellen wurde zu den indizierten Zeitpunkten über die Freisetzung der cytosolischen Lactat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ; die Konzentrationsabhängigkeit wurde in 4 Experimenten bestätigt. Wegen des zum Teil unterschiedlichen Zeitverlaufs in unterschiedlichen Passagen der Zellen wurde auf die Darstellung von Mittelwerten mit Standardabweichungen verzichtet.

Die experimentelle Durchführung von Experimenten mit H_2O_2 war sehr störanfällig. So spielte hier das Verhältnis Zellzahl zu H_2O_2-Stoffmenge, Gesamtvolumen, Zellzustand (Passage, Wachstumszustand etc.) ebenso eine den zeitlichen Verlauf der Schädigung bestimmende Rolle wie die genaue Zusammensetzung des Inkubationspuffers, der Additive und die Lagerungs- und Inkubationstemperatur. Auch Eisenkontaminationen, die durch multiple Quellen ins System gebracht werden können, beeinflußten stark die Haltbarkeit der H_2O_2-Stammlösung. Aufgrund dieser Faktoren wurde bei einigen Bedingungen darauf verzichtet, einen Zeitverlauf

inklusive statistischer Auswertung darzustellen; die dargestellten Effekte waren jedoch reproduzierbar und werden als repräsentative Kurven gezeigt.

Der Verlauf der Schädigung der Zellen durch H_2O_2 wurde von starken morphologischen Veränderungen begleitet, die in Abbildung 5 als Phasenkontrast-aufnahme dargestellt sind: die anfänglich spindelförmigen Zellen kugelten sich sehr schnell nach H_2O_2-Zugabe ab und bildeten Membranausbuchtungen, sogenannte „Blebs“, die im weiteren Verlauf von der Zelle abgeschnürt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß diese Vesikel Zellbestandteile und Organellen enthielten (siehe auch Abbildung 10).

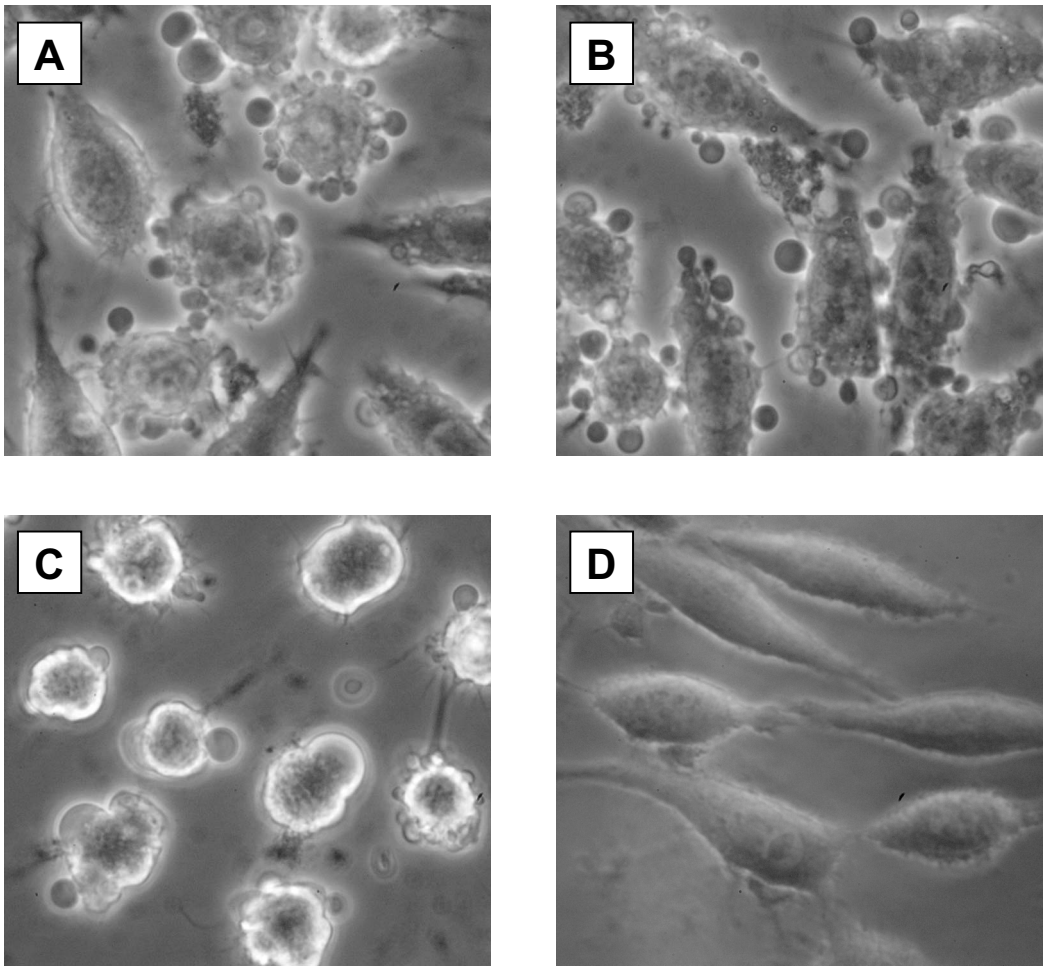


Abbildung 5: Morphologische Veränderungen bei Inkubation von L929-Zellen mit 250 µM H_2O_2 in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer
L929-Zellen wurden für 48 h auf Glasplättchen kultiviert und in Mikroskopkammern überführt. Zur Untersuchung der Morphologie wurden die Zellen in Krebs-Henseleit-Puffer mit 250 µM H_2O_2 inkubiert. Die Morphologie wurde auf einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet (ursprüngliche Vergrößerung 1000x). Schon nach 30 Minuten (A und B) zeigten die Zellen eine starke Abkugelung und ausgeprägtes Blebbing. Nach 60 Minuten (C) war der größte Teil der Blebs abgeschnürt und der überwiegende Teil der Zellen tot. Die Kontrolle in Krebs-Henseleit-Puffer zeigte nach einer Stunde (D) keine signifikanten Änderungen der Morphologie.

2.1.1 EINFLUß VON GLUCOSE AUF DIE H_2O_2-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG KULTIVIERTER L929-ZELLEN

Der H_2O_2-induzierte Vitalitätsverlust konnte durch Zugabe von 10 mM Glucose zum Inkubationsmedium drastisch vermindert und verzögert werden (Abbildung 6).

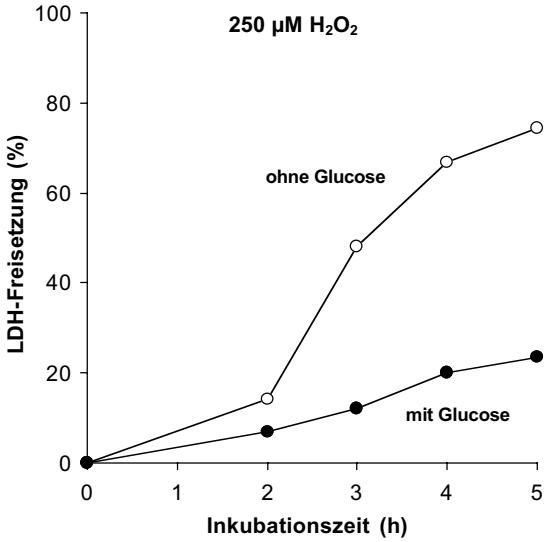


Abbildung 6: Protektion von L929-Zellen durch Zugabe von 10 mM D-Glucose zum Inkubationspuffer
L929-Zellen wurden 30 Minuten in Krebs-Henseleit-Puffer ohne und mit 10 mM Glucose inkubiert. 250 µM H_2O_2 wurden als Bolus zugegeben und die Vitalität der Zellen wurde zu den indizierten Zeitpunkten über die LDH-Freisetzung bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ; der Effekt wurde in 12 Experimenten bestätigt. Wegen des zum Teil unterschiedlichen Zeitverlaufs wurde auf die Darstellung von Mittelwerten mit Standardabweichungen verzichtet.

Auch morphologisch unterschied sich der Verlauf der Zellschädigung in Anwesenheit von Glucose stark von den im substratfreien Puffer beobachteten Effekten. So fand in Anwesenheit von Glucose praktisch kein „Blebbing“, das auffälligste morphologische Merkmal in Abwesenheit von Glucose, statt. Auch die damit einhergehende Abkugelung der Zellen war deutlich weniger ausgeprägt und wurde erst in einem sehr späten Stadium der Schädigung beobachtet; bis dahin war die spindelförmige Zellmorphologie nahezu unverändert erhalten. Sehr auffällig waren dagegen die intrazellulären Veränderungen: nach ca. einer bis anderthalb Stunden begannen sich rund um den Kern „Bläschen“ zu bilden, die sich nach und nach über das gesamte Cytosol verteilten (Abbildung 7).

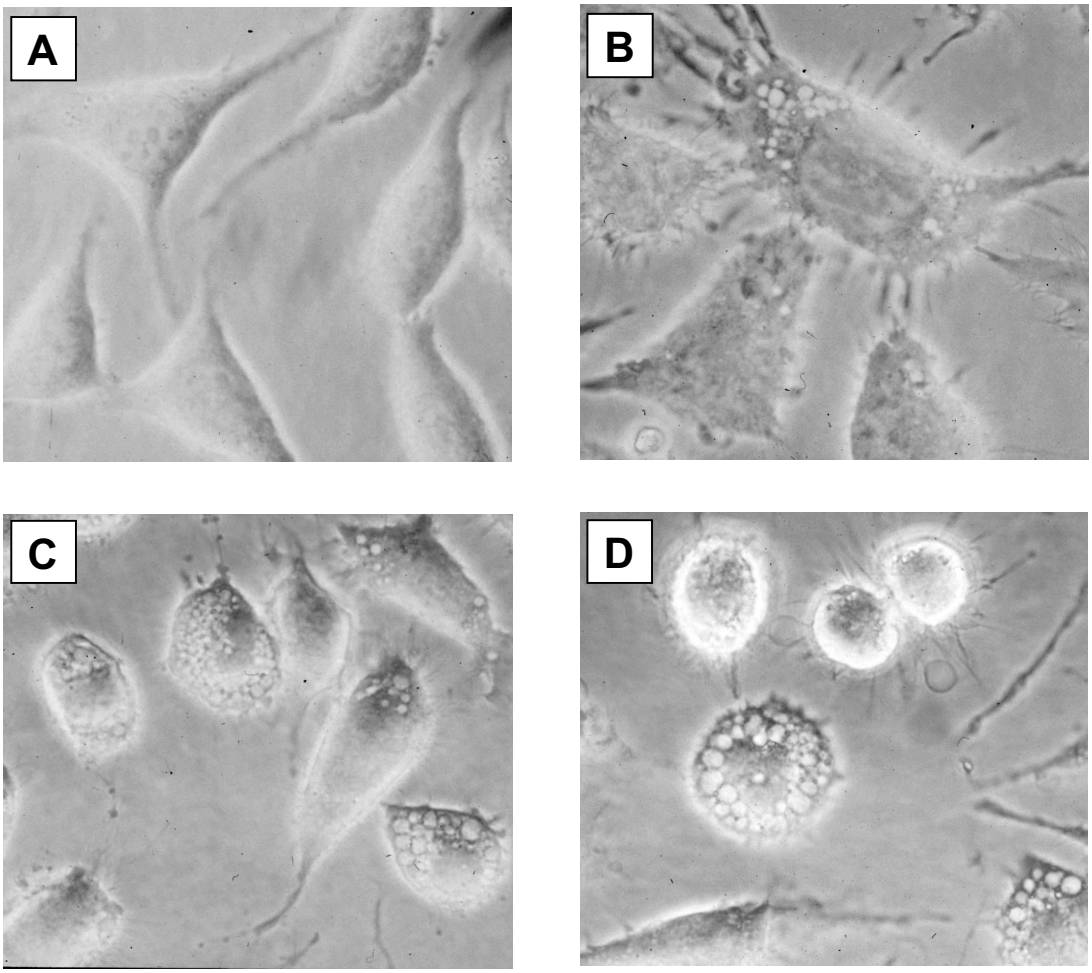


Abbildung 7: Morphologische Veränderungen durch die Inkubation mit H_2O_2 in Anwesenheit von Glucose
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden 30 Minuten in Krebs-Henseleit-Puffer in Anwesenheit von 10 mM Glucose vorinkubiert (A). Nach Zugabe von 250 µM H_2O_2 wurden die morphologischen Veränderungen nach 2 (B), 3 (C) und 4 (D) Stunden auf einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Die auffälligen intrazellulären „Bläschen" bildeten sich zuerst direkt am Kern und breiteten sich im Lauf der Zeit über das gesamte Innere der Zelle aus.

2.1.2 BETEILIGUNG DER MITOCHONDRIEN AN DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG

Das Erscheinungsbild der Zellschädigung in Abwesenheit von Glucose (Bildung und Abschnürung von Organellen-enthaltenden Blebs) ähnelt den bei apoptotischen Schädigungsmechanismen beschriebenen morphologischen Veränderungen, an deren Initiation Mitochondrien maßgeblich beteiligt sind. Auch das Auftreten der ubiquitär verteilten „Bläschen" innerhalb der Zellen bei der Schädigung in Anwesenheit von Glucose legt eine Beteiligung der Mitochondrien nahe.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden L929-Zellen in Anwesenheit der MPT-Poren-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Trifluoperazin (Tfp) mit H_2O_2 inkubiert. Während CsA, das beschriebenermaßen nur einen temporären Effekt ausübt [55], keine Wirkung zeigte (Daten nicht gezeigt), war die Kombination CsA/Tfp sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose protektiv (Abbildung 8).

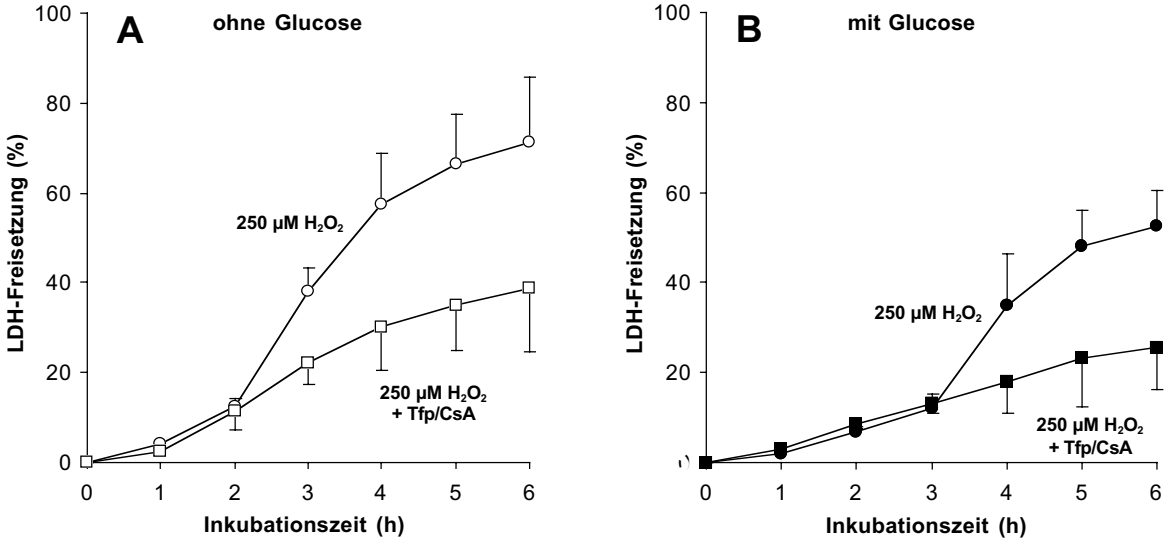


Abbildung 8: Protektion vor der H_2O_2-induzierten Zellschädigung von L929-Zellen durch Trifluoperazin und Cyclosporin A in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Glucose
Nach 30 min Vorinkubation in Anwesenheit von 5 µM Trifluoperazin (Tfp) und 1 µM Cyclosporin A (CsA) wurden die Zellen mit 250 µM H_2O_2 (als Bolus zugegeben) versetzt und die Vitalität der Zellen über die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 Experimenten.

Zur genaueren Charakterisierung der Rolle der Mitochondrien in den beiden Schädigungsmechanismen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt: der rot fluoreszierende Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM, Abbildung 9B und 10A), ein Rhodaminderivat, akkumuliert potentialabhängig in den Mitochondrien und erlaubt eine Beurteilung des Membranpotentials der angefärbten Mitochondrien; die TMRM-Färbung geht bei Verlust des Membranpotentials verloren. Dagegen bindet der grün fluoreszierende MitoTracker Green (Abbildung 9A) nach potentialabhängiger Akkumulation an der Innenseite der Matrixmembran und ermöglicht somit die Verfolgung mitochondrialer Veränderungen auch nach dem Verlust des Membranpotentials.

Abbildung 9 zeigt mitochondriale Färbungen in intakten Zellen: Die Mitochondrien waren im Ausgangszustand sehr fein, im gesamten Cytosol verteilt und wiesen eine relativ langgestreckte Struktur auf. Die starke und gleichmäßige TMRM-Fluoreszenz (Abbildung 9B) zeigt, daß alle Mitochondrien im Ausgangszustand intaktes Membranpotential aufwiesen.

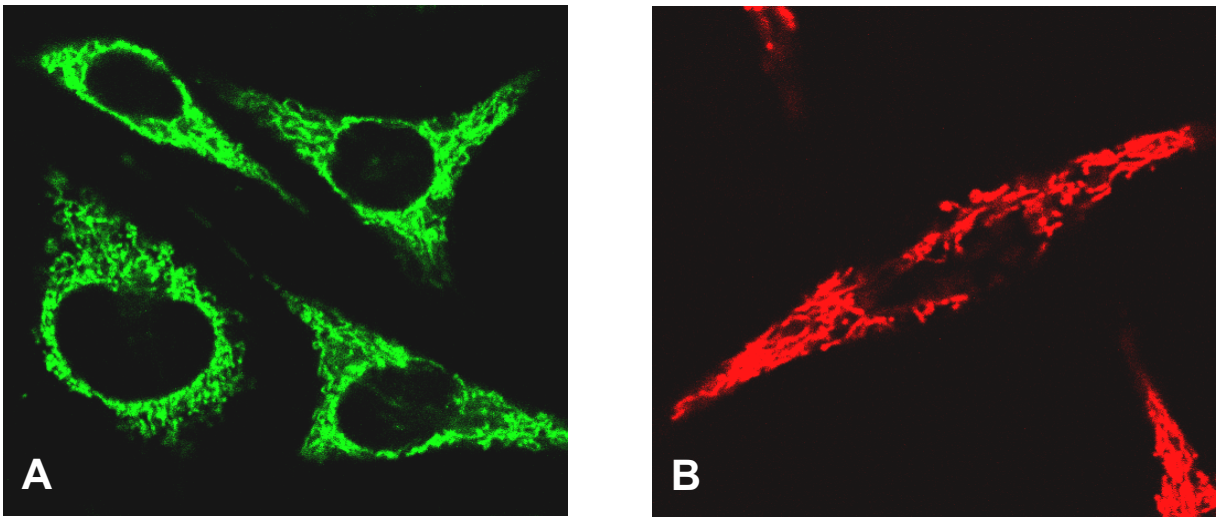


Abbildung 9: Laser-Scanning-Aufnahmen von Mitochondrien in intakten L929-Zellen
Die Morphologie der Mitochondrien in intakten L929-Zellen war unterschiedlich, der größte Teil der Mitochondrienpopulation zeigte jedoch ein langgestrecktes Erscheinungsbild. Die Mitochondrien waren gleichmäßig im ganzen Cytosol verteilt. (A) zeigt eine mitochondriale Färbung mit MitoTracker Green ($\lambda_{exc.}$ = 488 nm, $\lambda_{em.}$ = 505-550 nm), (B) zeigt die bei $\lambda_{exc.}$ = 543 nm angeregte und bei >560 nm detektierte TMRM-Fluoreszenz, die anzeigte, daß die Mitochondrien ein intaktes Membranpotential aufwiesen.

Da die Kombination Tfp/CsA signifikant protektiv sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose war, sollte (nach gängiger Theorie) ein Verlust des Membranpotentials durch MPT erfolgen, bevor die morphologischen Veränderungen (und natürlich auch der Zelltod) eintreten. Nach Nieminen et al. [56] kann der Verlauf der MPT durch eine Doppelfärbung mit Calcein, einem grün fluoreszierenden cytosolischen Farbstoff, und TMRM sichtbar gemacht werden.

Überraschenderweise zeigte diese Doppelfärbung in Abwesenheit von Glucose jedoch nur partiell das erwartete Bild (Abbildung 10): Nur bei ganz wenigen der vorher in der Calceinfärbung als Aussparungen sichtbaren Mitochondrien (<10%) ging die TMRM-Fluoreszenz verloren, während die Aussparung in der Calceinfärbung verschwand. Der größte Teil der Mitochondrien war auch nach Einsetzen des Blebbings und sogar nach Abschnürung einiger Blebs noch TMRM-positiv, hatte also noch ein hohes Membranpotential, und war in der Calceinfärbung deutlich als Aussparung erkennbar. Einige dieser intakten Mitochondrien konnten sogar innerhalb der abgeschnürten Blebs detektiert werden (Pfeile).

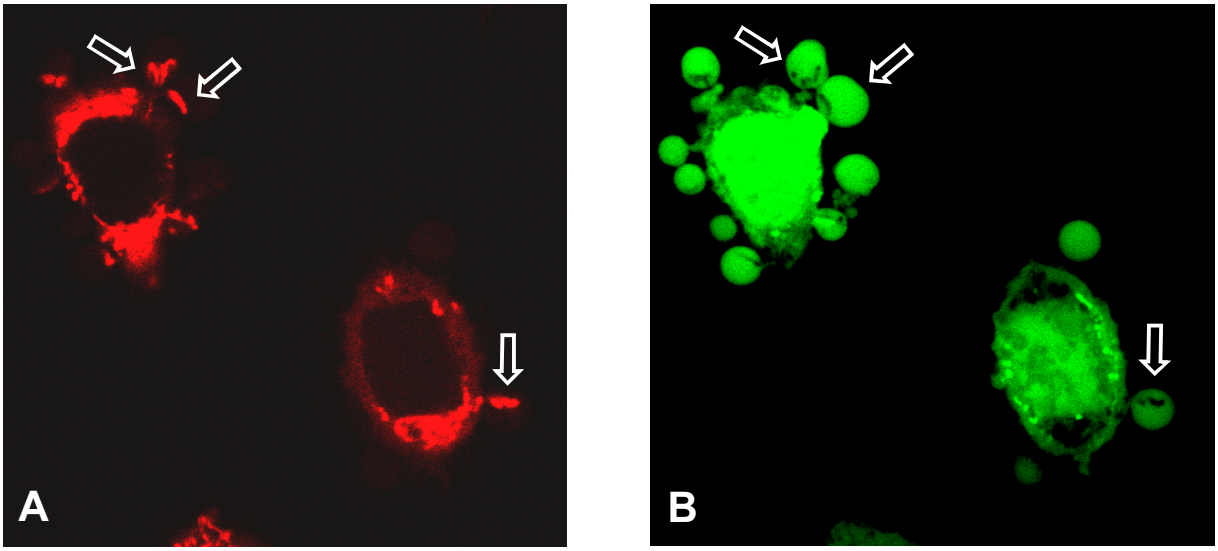


Abbildung 10: Mitochondriale Veränderungen nach 1 h Inkubation mit 100 µM H_2O_2 in Abwesenheit von Glucose
Die Färbung mit TMRM (A) zeigte, daß ein Teil der Mitochondrien noch über ein intaktes Membranpotential verfügte. In der parallelen Calceinfärbung (B) war eindeutig erkennbar, daß die morphologischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt schon stark ausgeprägt waren; die Aussparungen in den Blebs (Pfeile), die in der Gegenfärbung mit TMRM deutlich als Mitochondrien erkennbar sind (Pfeile in A) zeigten, daß Mitochondrien mit intaktem Membranpotential im Verlauf der Schädigung aus der Zelle ausgeschleust wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. TMRM wurde mit $\lambda_{exc.}$ = 543 nm angeregt und die Fluoreszenz durch einen 560 nm-Longpass-Emissionsfilter detektiert; Calcein wurde bei $\lambda_{exc.}$ = 488 nm angeregt und seine Fluoreszenz zwischen 505 und 550 nm detektiert.

In Anwesenheit von Glucose ergab sich ein völlig anderes Bild: Die Färbung mit Calcein zeigte zu Versuchsbeginn deutliche Aussparungen, die durch TMRM-Färbung als Mitochondrien identifiziert werden konnten. Im Verlauf der Inkubationszeit, jedoch deutlich vor Beginn der „Bläschenbildung“, wurde die TMRM-Färbung diffus, während die Calceinfärbung immer homogener erschien. Leider konnte der genaue Zeitpunkt einer möglichen MPT unter diesen Bedingungen jedoch nicht bestimmt werden, da die Intensität sowohl der Calcein- als auch der TMRM-Fluoreszenz stark abnahm; daher wurde der weitere Verlauf der mitochondrialen Veränderungen mit Hilfe des potentialunabhängigen MitoTracker Green verfolgt.

Abbildung 11 illustriert den Verlauf der mitochondrialen Veränderungen: die anfangs eher langgestreckten Mitochondrien (1) rundeten sich ab (2) und schwollen an (3), wobei sie ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe erreichen konnten (4). Interessanterweise konnten häufig in einer Zelle sowohl nahezu unveränderte als auch stark geschwollene Mitochondrien beobachtet werden (Abbildung 11B).

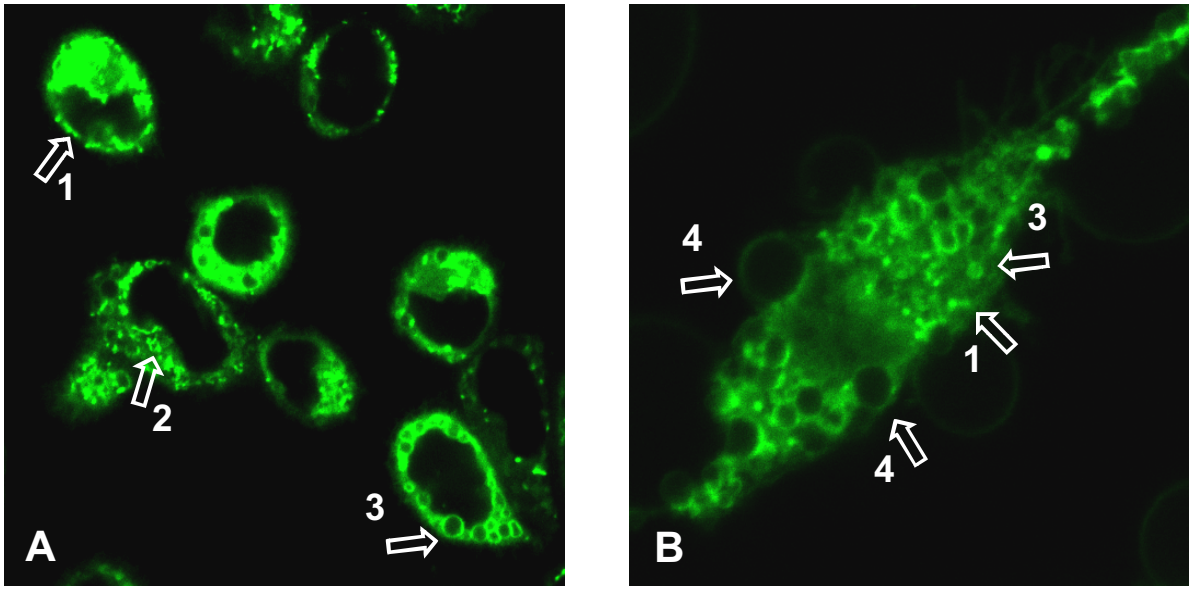


Abbildung 11: Mitochondriale Veränderungen nach 3,5 Stunden Inkubation mit 100 µM H_2O_2 in Anwesenheit von Glucose
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden mit MitoTracker Green und mit TMRM beladen und am Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Nach etwa einer Stunde war die TMRM-Fluoreszenz so schwach, daß sie nicht mehr darstellbar war; die weiteren Veränderungen wurden mit Hilfe des MitoTrackers beobachtet. Zur genaueren Beschreibung der Veränderung siehe Text.

Diese Ergebnisse – die Umverteilung der Calceinfluoreszenz, die Abnahme der TMRM-Fluoreszenz und das starke Anschwellen der Mitochondrien – deuten auf das Auftreten einer „klassischen“ MPT mit anschließender Schwellung der Mitochondrien hin.

2.1.3 CALCIUMABHÄNGIGKEIT DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG

Es ist beschrieben, daß eine Inkubation von L929-Zellen mit H_2O_2 zu einem Anstieg des cytosolischen Calciums führt, wobei dieser Anstieg in Anwesenheit von Glucose deutlich langsamer und weniger ausgeprägt verläuft als in Abwesenheit [53]. Auch die mitochondrialen Veränderungen – und besonders die MPT – werden häufig mit einer Störung der zellulären Calcium-Homöostase in Verbindung gebracht. Daher wurde hier der Einfluß des intrazellulären Calciumchelators Quin-2 (als Acetoxy-methylester in die Zellen geladen) sowohl auf die Vitalität der Zellen als auch auf die mophologischen Veränderungen untersucht. Abbildung 12 zeigt die Vitalität der Zellen bei H_2O_2-Zugabe nach einer Vorinkubation mit Quin-2-AM: sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose ist durch die Calciumchelatisierung ein protektiver Effekt erkennbar.

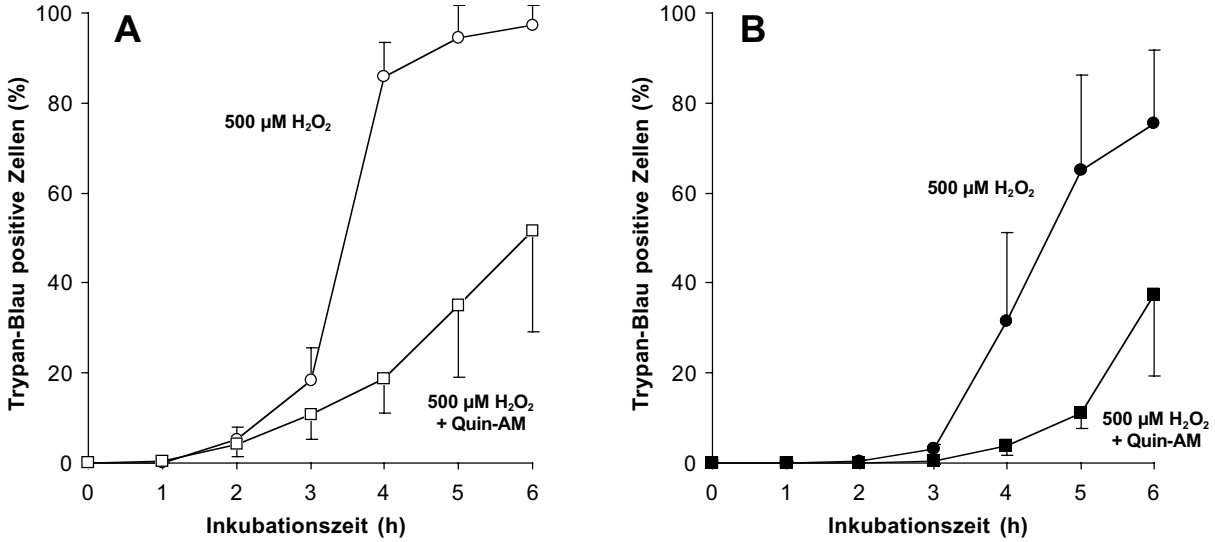


Abbildung 12: Calciumabhängigkeit der H_2O_2-induzierten Schädigung von L929-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Glucose
Nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit 10 µM Quin-2-Acetoxymethylester wurden die Zellen in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Glucose (10 mM) mit 500 µM H_2O_2 inkubiert und ihre Vitalität über die Fähigkeit, Trypanblau auszuschließen, ermittelt. Die gezeigten Kurven stellen Mittelwerte ± Standardabweichungen von 4 Experimenten dar.

Der Calciumchelator beeinflußte überraschenderweise die morphologische Erscheinung der H_2O_2-induzierten Zellschädigung in Abwesenheit von Glucose nur zeitlich; das Erscheinungsbild der Schädigung entsprach genau dem ohne Chelator. In Anwesenheit von Glucose dagegen war die morphologische Ausprägung der Schädigung sehr stark beeinflußt. Hier war die auffälligste Änderung nicht das Anschwellen der Mitochondrien, sondern die Ausbildung von filamentartigen Strukturen bei Erhalt der spindelförmigen Morphologie der Zellen sowie die „Zerklüftung" der äußeren Zellbegrenzung. Eine mitochondriale Schwellung konnte ebenfalls beobachtet werden; sie war jedoch deutlich geringer ausgeprägt und trat viel später auf als in Abwesenheit des Calciumchelators. Auch konnte sie erst nach Einsetzen der anderen morphologischen Veränderung beobachtet werden (siehe Abbildung 13).

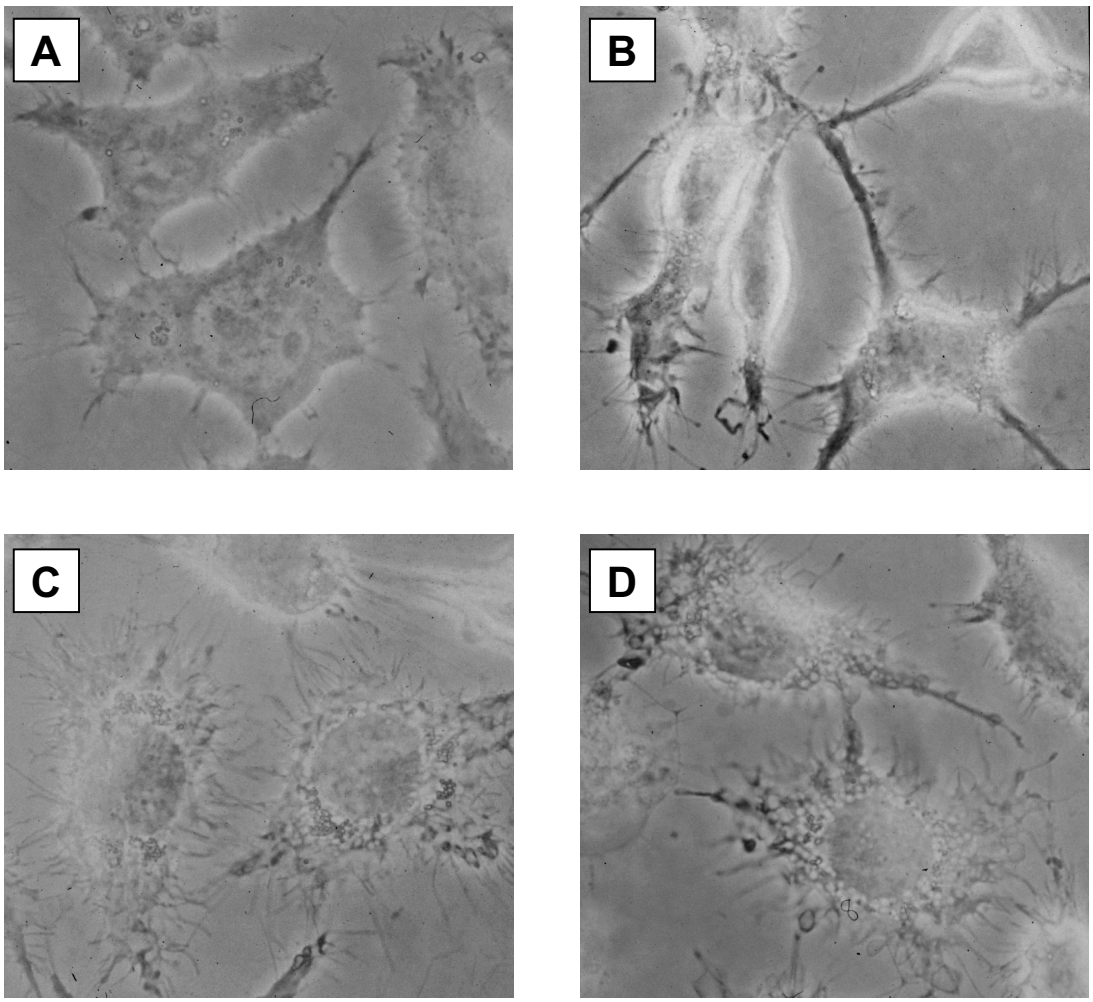


Abbildung 13: Einfluß des Calciumchelators Quin-2-AM auf das morphologische Erscheinungsbild der H_2O_2-induzierten Zellschädigung in Anwesenheit von Glucose
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden für eine Stunde in Krebs-Henseleit-Puffer mit 10 µM des Calciumchelators Quin-2-AM vorinkubiert. 30 Minuten vor Beginn des Experimentes wurde 10 mM Glucose zugegeben. Anschließend wurde ein Bolus von 250 µM H_2O_2 hinzugefügt und die Zellen inkubiert, bis der Zelltod eintrat (nicht gezeigt). Die Morphologie wurde auf einem Phasenkontrastmikroskop nach 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D) Stunden begutachtet. Der Zelltod trat bei dem überwiegenden Teil der Zellen nach ca. 4,5 bis 5 Stunden ein.

2.1.4 EISENABHÄNGIGKEIT DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG

Zur Charakterisierung der Eisenabhängigkeit des hier untersuchten Systems wurden L929-Zellen in Gegenwart des starken membrangängigen Eisenchelators 2,2´-DPD mit H_2O_2 inkubiert. In Abwesenheit von Glucose (250 µM H_2O_2) zeigte sich ein signifikant protektiver Effekt des intra- und extrazellulär vorliegenden Eisenchelators (Abbildung 14), der etwas schwächer war als der durch Calciumchelatisierung erzielte (vgl. Abbildung 12).

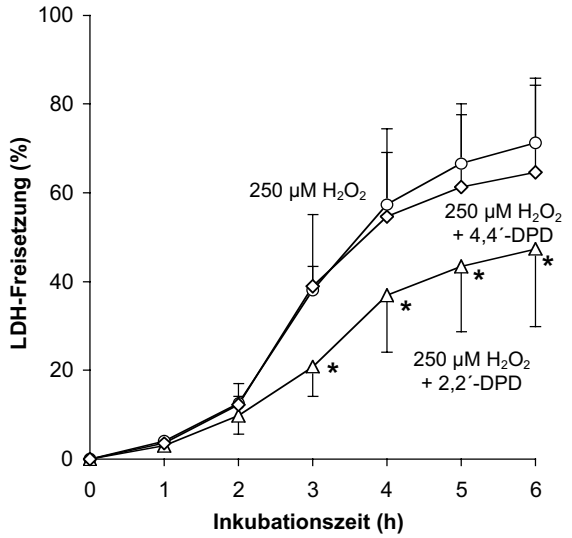


Abbildung 14: Einfluß der Eisenchelatisierung auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer
L929-Zellen wurden in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer mit 250 µM H_2O_2 in Anwesenheit von 100 µM des Eisen(II)chelators 2,2´-Dipyridyl bzw. seines nicht-chelatisierenden Isomers 4,4´-DPD inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde durch LDH-Freisetzung bestimmt und die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 4 Experimenten. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Zusatz.

In Anwesenheit von Glucose war dieser Schutzeffekt so deutlich verstärkt, daß während der verwendeten Inkubationszeit von 5 Stunden überhaupt keine Zellschädigung festgestellt werden konnte (Abbildung 15A). Wie stark diese Protektion tatsächlich war, wurde daraufhin in einem Langzeitversuch getestet: L929-Zellen wurden (in Anwesenheit von Glucose) mit und ohne 2,2´-DPD und 100 µM H_2O_2 inkubiert. Nach 1 bis 6 Stunden wurde das Inkubationsmedium entfernt, die Zellen vorsichtig gewaschen und normales Zellkulturmedium zugegeben. 24 Stunden nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und die Anzahl der Trypanblau positiven Zellen in Krebs-Henseleit-Puffer bestimmt. Wie Abbildung 15B zeigt, reichte in Abwesenheit des Eisenchelators bereits etwas mehr als eine Stunde Inkubation mit H_2O_2 aus, um einen praktisch vollständigen Vitalitätsverlust zu induzieren. Dagegen war der Schutzeffekt durch 2,2´-DPD so gut, daß selbst nach 6 h Inkubation mit H_2O_2 24 Stunden später nur knapp 30% der Zellen tot waren.

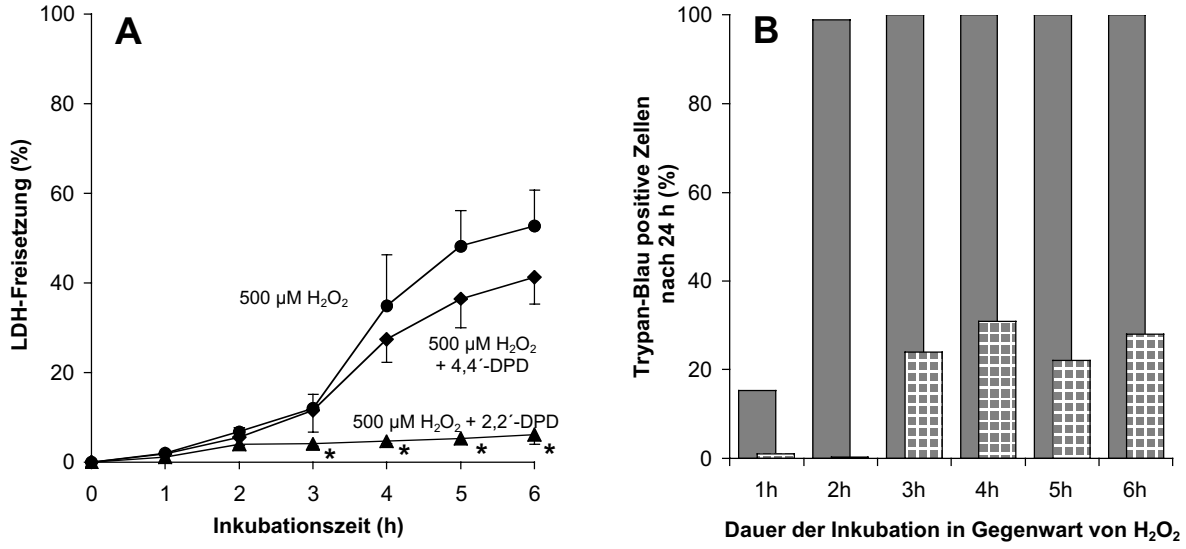


Abbildung 15: Einfluß der Eisenchelatisierung auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung in Anwesenheit von Glucose
Durch Zugabe von 100 µM des membranpermeablen Eisen(II)-Chelators 2,2´-DPD wurde die H_2O_2-induzierte Zellschädigung in Anwesenheit von Glucose nahezu vollständig gehemmt (A). Dagegen übte das nicht-chelatisierende 4,4´-DPD keinen signifikanten Effekt aus. Auch über längere Zeit schützte der Eisenchelator vor H_2O_2-Toxizität (B): die Zellen wurden 1 bis 6 Stunden mit H_2O_2 ohne (graue Fläche) und mit (schraffierte Fläche) 100 µM 2,2´-DPD inkubiert, das Inkubationsmedium durch Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, mit Krebs-Henseleit-Puffer bedeckt und ihre Vitalität mit Trypanblau bestimmt.

Verblüffenderweise hatte der durch die Eisenchelatisierung verursachte Schutzeffekt keinerlei Einfluß auf die morphologische Erscheinung der Zellschädigung (Abbildung 16). Auch in Anwesenheit von 2,2´-DPD schwollen, wie oben beschrieben, die Mitochondrien nach Verlust ihres Membranpotentials an; die Zellen verloren auch hier nach längeren Inkubationszeiten ihre spindelförmige Struktur und rundeten sich ab. Diese Morphologie blieb auch in den Langzeitversuchen erhalten, wobei aus experimentellen Gründen nicht festgestellt werden konnte, ob die Mitochondrien ihr Membranpotential wiederherstellen konnten. In Anbetracht der im Lichtmikroskop noch deutlich sichtbar geschwollenen Mitochondrien erscheint dies allerdings eher unwahrscheinlich.

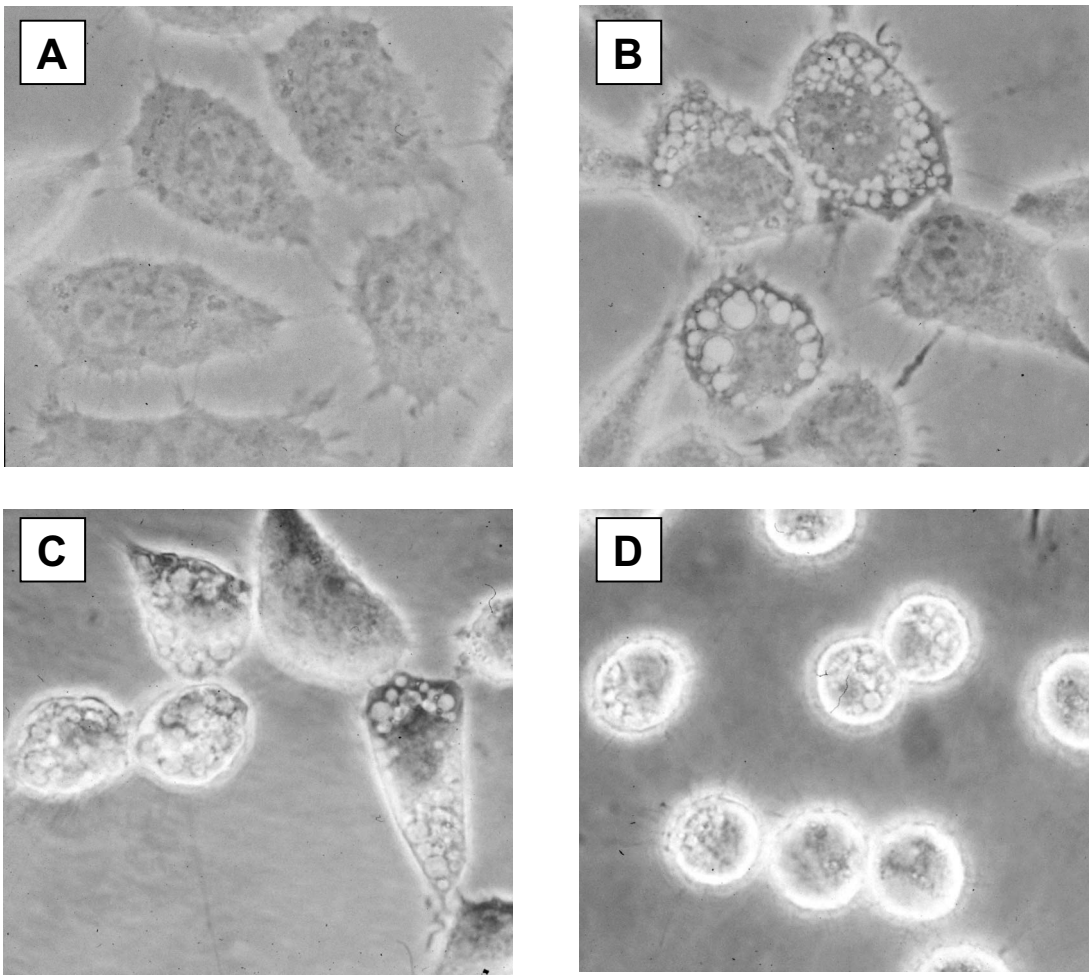


Abbildung 16: Morphologie der H_2O_2-induzierten Schädigung von L929-Fibroblasten in Anwesenheit von Glucose und des Eisenchelators 2,2´-DPD
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden nach 48 h 30 Minuten mit 10 mM Glucose und 100 µM 2,2´-DPD vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit von 250 µM H_2O_2 für weitere 6 Stunden inkubiert. Die Morphologie wurde auf einem Phasenkontrastmikroskop nach 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D) Stunden aufgezeichnet. Nach vier Stunden war bis zum Ende der Inkubationszeit keine weitere Änderung der Morphologie mehr zu detektieren (siehe auch „Langzeiteffekt von DPD“).

2.1.5 EINFLUß VON ANTIOXIDANTIEN AUF DIE H_2O_2-INDUZIERTE ZELLSCHÄDIGUNG

Die Verstoffwechselung von Glucose dient neben der Bereitstellung von ATP auch der Erhaltung der zellulären Reduktionskapazität, die bei oxidativen Zellschädigungen durch die reduktive Regeneration von Antioxidantien einen wichtigen Teil der zellulären Verteidigung darstellt. Daher sollten sich Zellen, in denen der Redoxzustand mit Hilfe von zugegebenen Antioxidantien bzw. Reduktionsmitteln verbessert wurde, ähnlich wie Zellen in Anwesenheit von Glucose verhalten. Leider gestaltete sich jedoch die Untersuchung dieser Einflüsse äußerst problematisch. Zwar übten sowohl Glutathion als auch *N*-Acetylcystein einen stark protektiven Effekt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Glucose aus (Abbildung 17); es ist jedoch bekannt, daß Glutathion in nicht-veresterter Form membranimpermeabel ist [21] und

demnach wahrscheinlich, daß der beobachtete Schutzeffekt von einer Verminderung der H_2O_2-Konzentration durch extrazelluläre Reaktion des H_2O_2 mit den SH-Gruppen des Glutathions hervorgerufen wird. Auch *N*-Acetylcystein reagiert extrazellulär mit H_2O_2, weshalb auch hier nicht beurteilt werden kann, zu welchem Anteil ein Schutzeffekt durch eine Verbesserung der zellulären Reduktionskapazität oder durch extrazelluläre Effekte entstand.

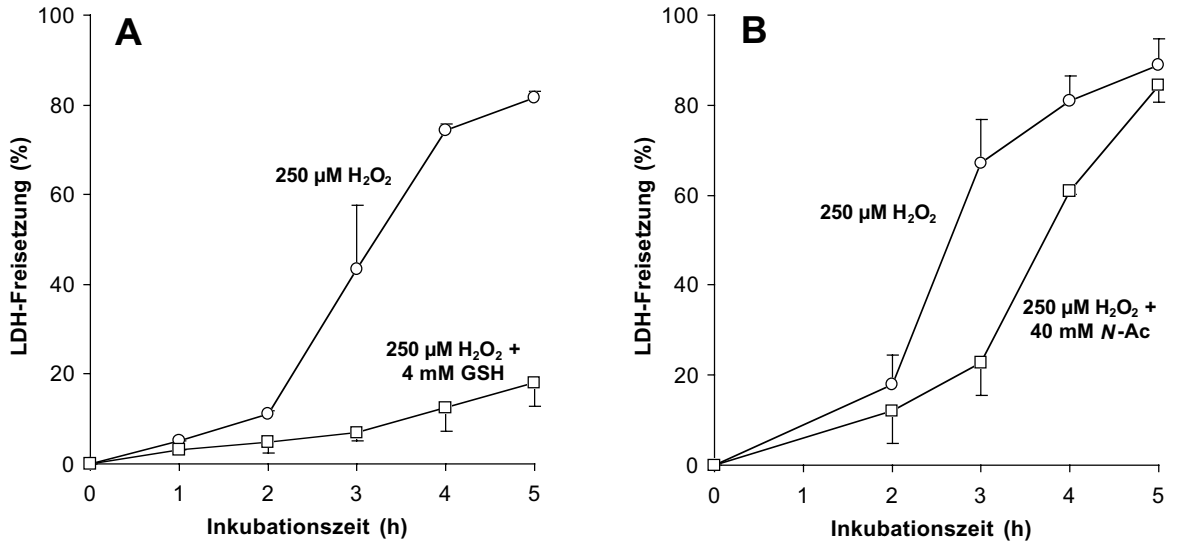


Abbildung 17: Effekt von Glutathion (GSH) und *N*-Acetylcystein (*N*-Ac) auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung
L929-Zellen wurden in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer in der Anwesenheit von 4 mM Glutathion (A) und 40 mM *N*-Acetylcystein (B) mit 250 µM H_2O_2 inkubiert und die Zellschädigung durch die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 (A) bzw. 4 (B) Experimenten.

2.1.6 BEEINFLUSSUNG DER H_2O_2-INDUZIERTEN ZELLSCHÄDIGUNG DURCH REGULIERTE ÜBEREXPRESSION DES ANTIAPOPTOTISCHEN PROTEINS BCL-2

Der antiapoptotische Einfluß des Proteins Bcl-2 wird möglicherweise über eine Modifikation des zellulären Redoxzustandes, insbesondere des Glutathiongehaltes, vermittelt, ein Effekt, der besonders im hier untersuchten System von Interesse war. Daher sollte ein regulierbares Expressionssystem für humanes Bcl-2 in L929-Zellen etabliert werden, in dem durch die Zugabe eines Antibiotikums (Tetracyclin) zum Kulturmedium die Expression des Proteins an- bzw. abgeschaltet werden konnte [57-59]. Diese Art der regulierten Expression versprach die Möglichkeit, den Einfluß des Proteins direkter und unter besserer Kontrolle untersuchen zu können als herkömmliche Expressionssysteme, da gewährleistet wird, daß der Insertionsort der

fremden DNA im Genom nicht zwischen Kontrolle und Testsystem variiert. Zu diesem Zweck wurden die L929-Zellen mit einem *Regulator-Plasmid*, das einen konstitutiv exprimierten, tetracyclinsensitiven Transaktivator trägt, und einem *Response-Plasmid*, in das das humane Bcl-2-Gen (hBcl-2) hinter einem „Tetracycline-Responsive Element“ (TRE) eingefügt wurde, kotransfiziert. Die Präparation des Vektors p(TRE)Bcl-2 wird im folgenden kurz beschrieben.

Der als „Template“ verwendete Vektor pSBC-bcl-2α (schematisch dargestellt in Abbildung 18A) enthielt die codierenden Sequenz des humanen Bcl-2α-Proteins inklusive flankierender, nicht-codierender Bereiche sowohl auf der 5´- als auch auf der 3´-Seite. Dies erlaubte, mit Hilfe geeigneter Primer (Abbildung 18B) in einer Polymerase-Ketten-Reaktion ein Fragment zu generieren, das direkt vor der codierenden Sequenz des Bcl-2-Gens eine Restriktionsschnittstelle (EcoRI) enthielt.

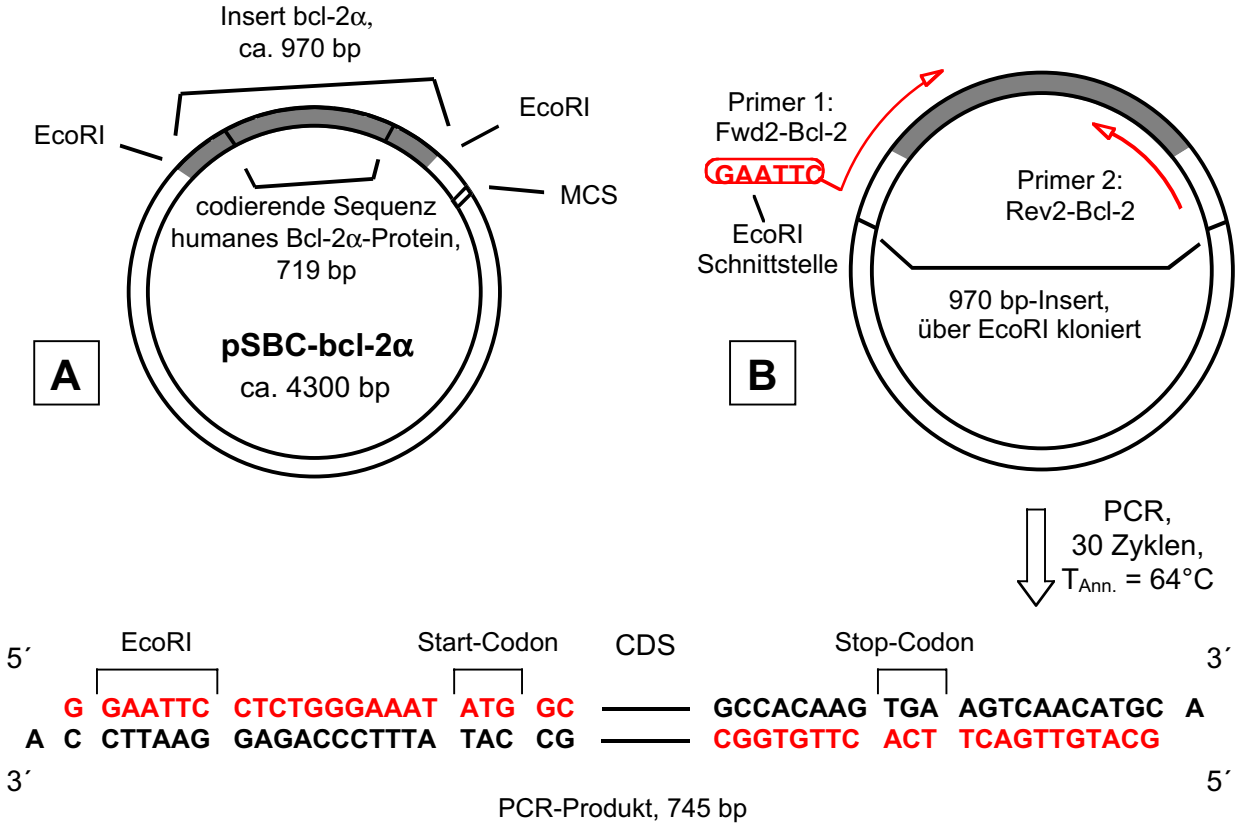
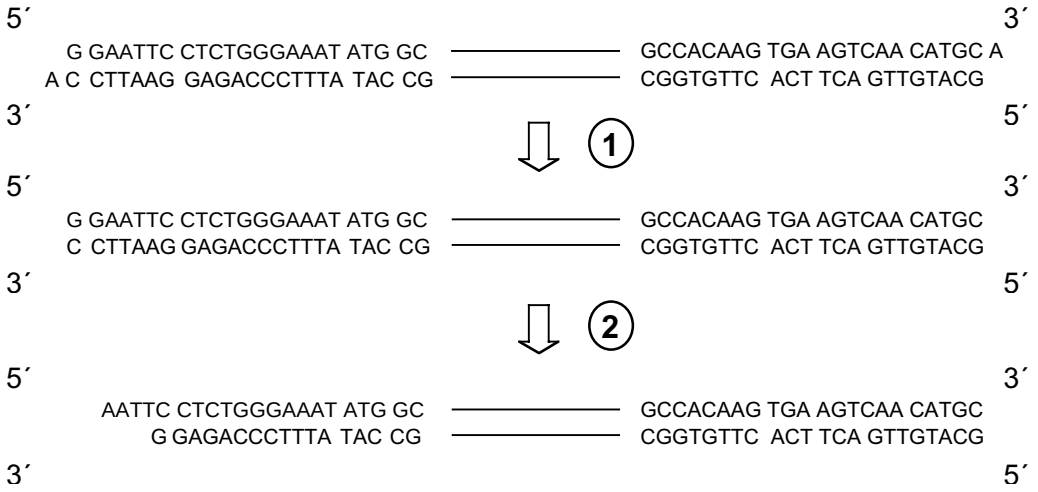


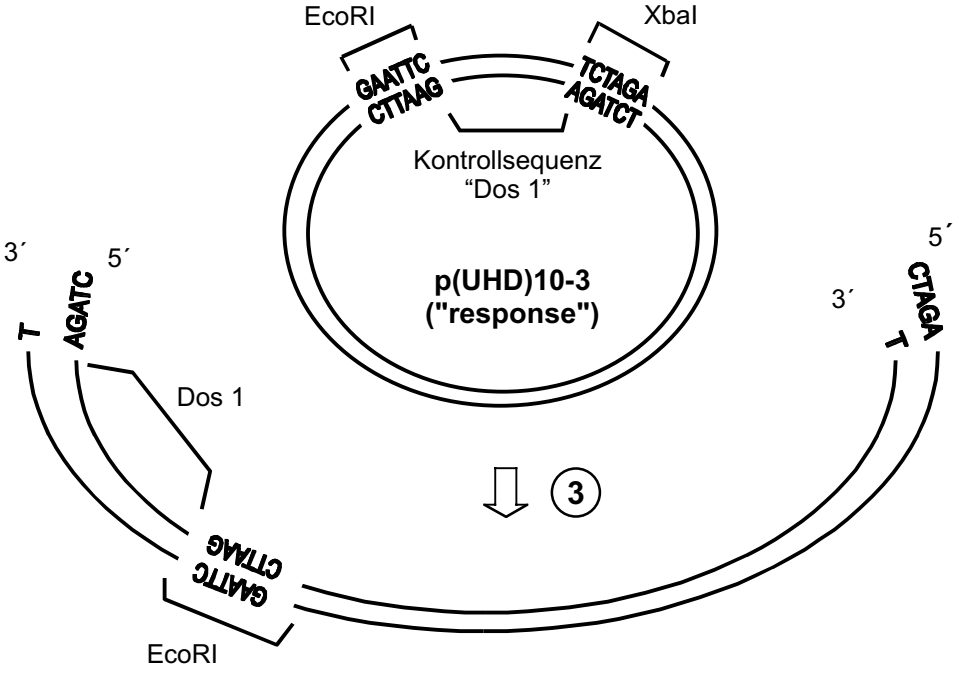
Abbildung 18: Isolierung der codierenden Sequenz des hBcl-2-Proteins aus dem Ausgangsvektor pSBC-bcl-2α
Der Ausgangsvektor wurde von Dr. W. Dirks, DSMZ, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Die schematische Darstellung (A) zeigt das über EcoRI eingefügte Insert mit der codierenden Sequenz des hBcl-2-Gens, und die Multiple Cloning Site (MCS). Für die Isolierung der codierenden Sequenz (B) wurden die Primer so ausgewählt, daß das entstehende Produkt jeweils einige Nukleotide “upstream” und “downstream” vom Start- bzw. Stop-Codon umfaßte; an der 5´-Seite wurde zusätzlich eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Das nach 30 Zyklen entstandene PCR-Produkt hatte eine Länge von 745 Basenpaaren.

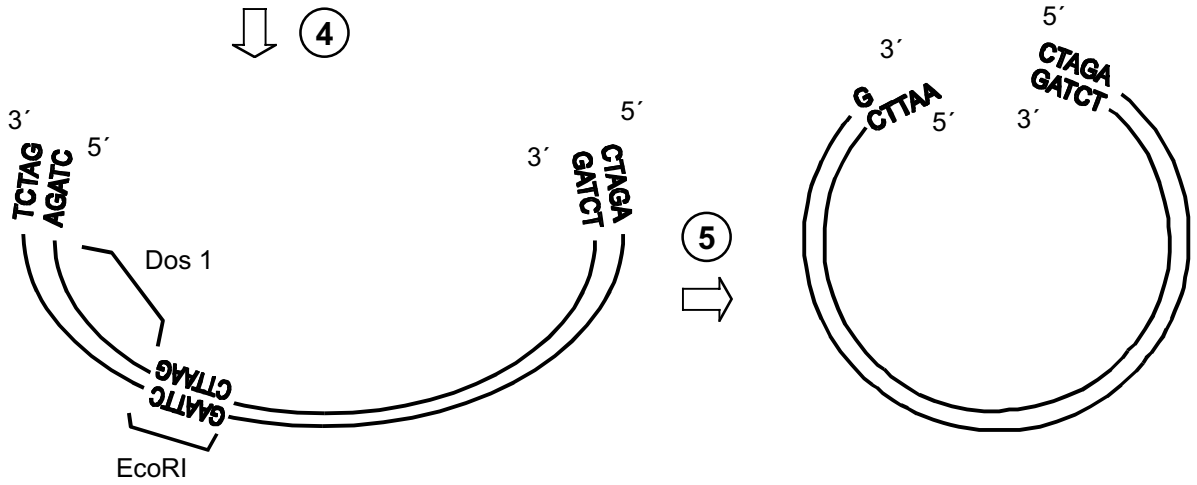
Nach Gelelektrophorese und Aufreinigung des Fragmentes wurden sowohl das PCR-Fragment als auch der Vektor p(UHD)-10-3 für die Klonierung modifiziert (Abbildung 19A und B) und anschließend ligiert (Abbildung 19C). Der Erfolg der Ligation wurde durch eine Transformation des neuentstandenen Vektors in kompetente Bakterien mit anschließender Amplifikation der Plasmid-DNA durch Restriktion und Sequenzierung überprüft (komplette Sequenz siehe Anhang II).

Abbildung 19: Klonierung des PCR-Fragmentes in den Vektor p(UHD)10-3
Die Legenden zu den einzelnen Teilabbildungen sind an die jeweiligen Abbildungsenden angefügt.

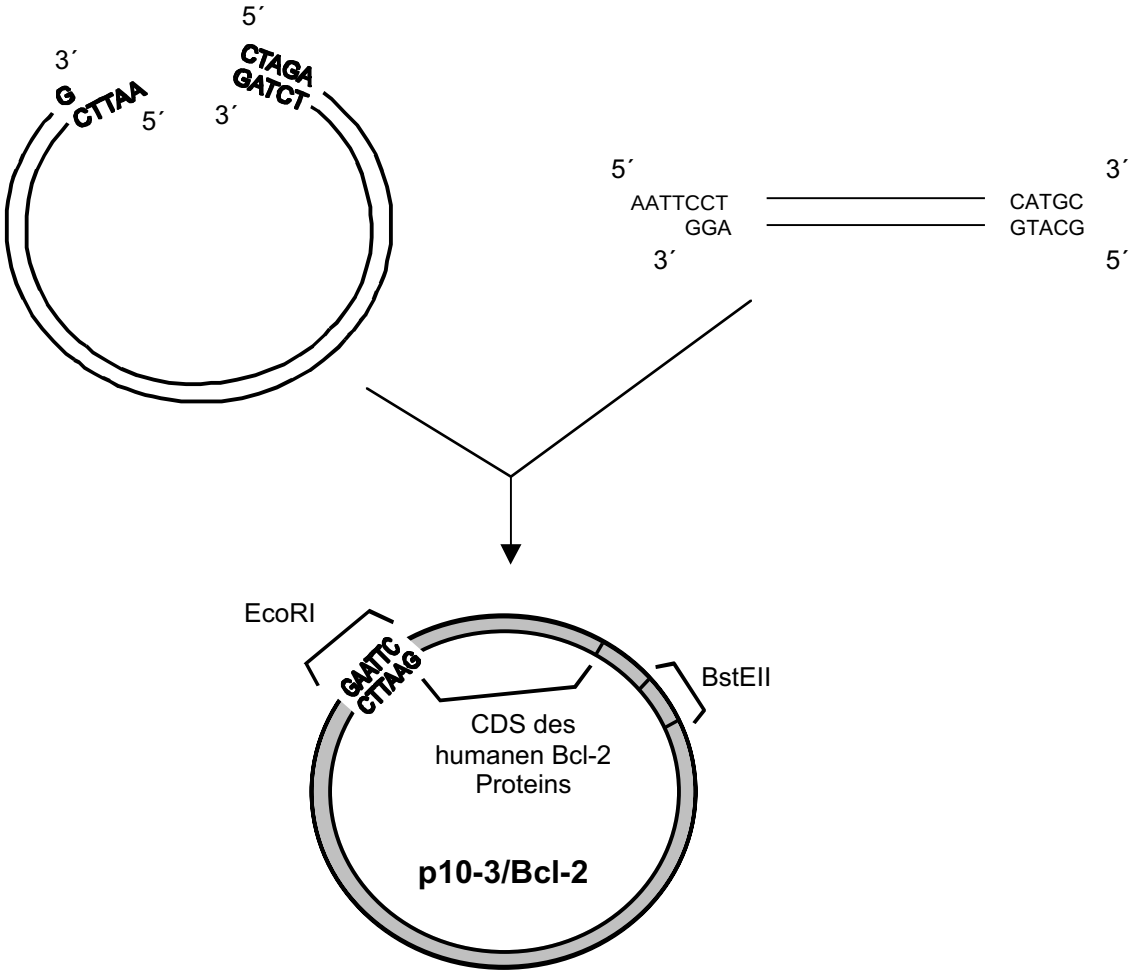


A: Modifizierung des PCR-Fragmentes für die Klonierung in den „Response"-Vektor des Tet-System
Die durch die Taq-Polymerase in der PCR am 3´-Ende jeden Stranges angefügten ungepaarten Nukleotide wurden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I abgedaut (1) und das nun „blunt-end" vorliegende Fragment mit EcoRI restringiert (2). Das entstandene Produkt besaß an der 5´-Seite ein 5´-überhängendes einzelsträngiges Ende („Sticky End") und ein doppelsträngiges Ende an der 3´-Seite („Blunt End").





B: Modifizierung des Response-Plasmids p(UHD)10-3 für die Klonierung
Der Vektor wurde durch Restriktion mit XbaI linearisiert (3) und die überhängenden Einzelstrangenden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt (4). Anschließend wurde durch Restriktion mit EcoRI die Kontrollsequenz „Dos 1“ entfernt (5) und die beiden entstehenden Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese getrennt.



C: Präparation des Vektors p10-3/Bcl-2
Das PCR-Fragment und der Vektor werden im molaren Verhältnis 10:1 zusammengegeben und ligiert. Der entstehenden Vektor wurde amplifiziert und mit einer Restriktionsanalyse (EcoRI/BstEII) überprüft.

Die Sequenzierung des Inserts zeigte bei Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Sequenzen [60-62] eine Abweichung an Position 519 (Abbildung 20). Dieser Austausch (Adenin gegen Guanin) würde bei Expression dieser Sequenz zu einem Aminosäureaustausch an Position 19 (Valin statt des korrekten Isoleucin) führen.

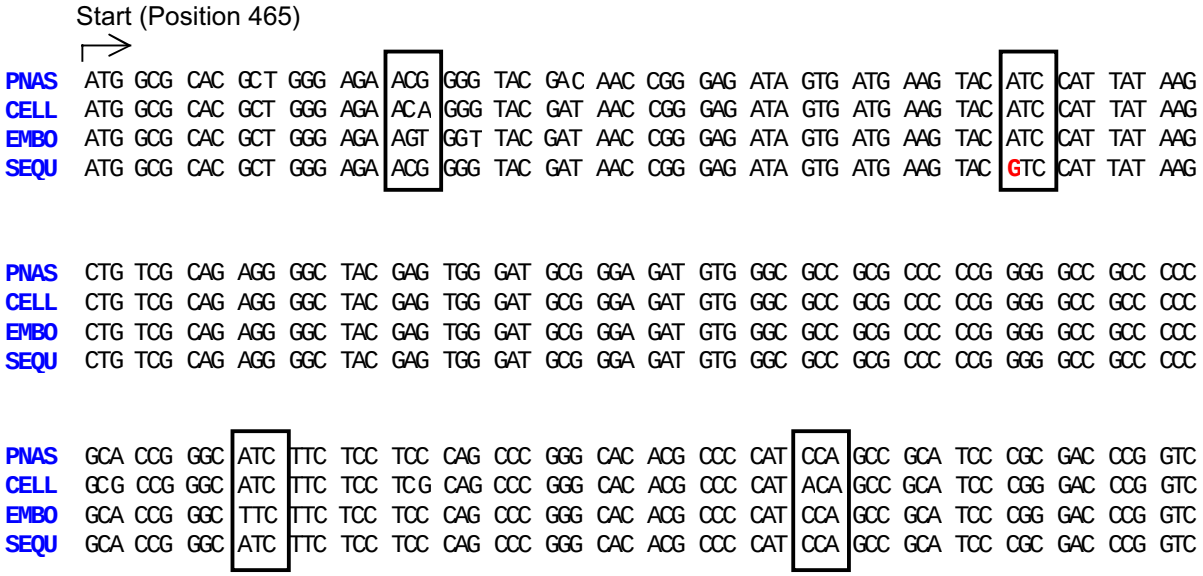


Abbildung 20: Vergleich der durch Sequenzierung erhaltenen Sequenz mit den in der Literatur veröffentlichten
Die drei in der Literatur veröffentlichten Sequenzen (PNAS = [60], Cell = [61], EMBO = [62]) zeigen in den schwarz umrandeten Codons Abweichungen voneinander, wobei immer zwei Sequenzen übereinstimmen. Der Austausch an Position 519 der eigenen Sequenz (rot markiert) weicht jedoch von allen anderen Sequenzen ab.

Ein Teil der physiologischen Wirkung von Bcl-2 basiert auf seiner Fähigkeit, sowohl Homo- als auch mit anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie Heterodimere zu bilden. Dafür werden die in Abbildung 21 gezeigten Strukturelemente gebraucht. Besonders entscheidend scheint hierbei der N-terminale Bereich A1 zu sein, in dem 24 Aminosäuren eine Helix bilden, von denen 5 – unter anderem auch Isoleucin 19 – für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen verantwortlich sind [63]. Mutationsanalysen zeigen, daß schon durch den Austausch einer Aminosäure in diesem Bereich die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 fast vollständig verloren geht.

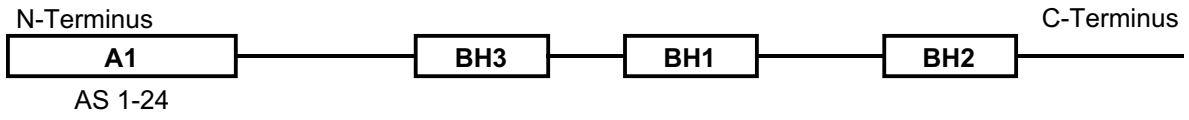
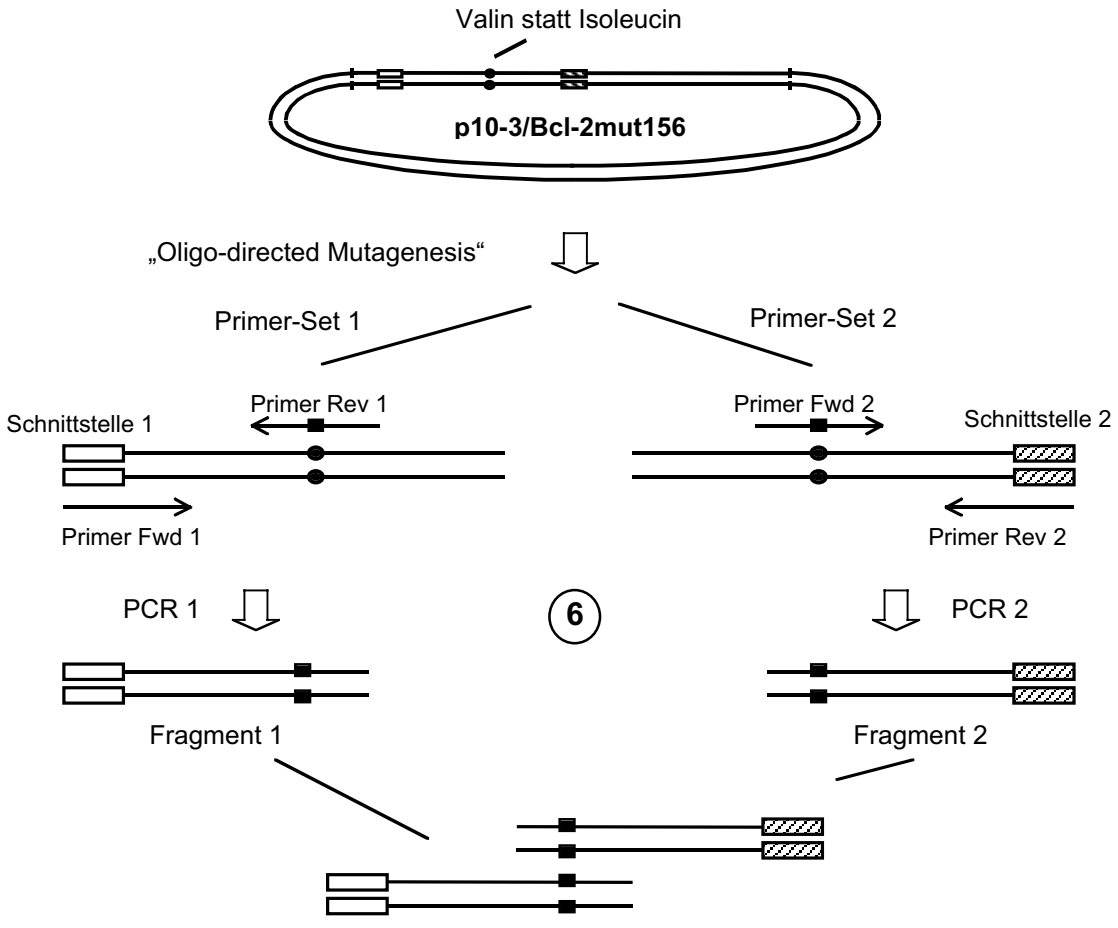


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Strukturelemente des Bcl-2-Proteins
Im Bereich A1, der aus 24 Aminosäuren (AS) besteht, die eine Helix bilden, sind 5 Aminosäuren für die Dimerenbildung nötig. Der Austausch von Isoleucin 19 gegen Valin verhindert diese Wechselwirkung.

Um ein funktionsfähiges Protein erhalten zu können, mußte das fehlerhafte Nukleotid ausgetauscht werden. Da zwei Restriktionsschnittstellen in der Nähe des auszutauschenden Nukleotids vorhanden waren, konnte die Methode der „Oligo-directed Mutagenesis“ verwendet werden (Abbildung 22). Hierzu wurden mehrere Sets von PCRs durchgeführt: Der erste Schritt (6) bestand aus zwei parallelen PCRs („upstream“ + „downstream“), wobei jeweils einer der Primer homolog zur jeweiligen Restriktionsschnittstelle war und der andere die zu korrigierende Sequenz (das falsche Nukleotid ist als Kreis eingezeichnet) mit dem richtigen Nukleotid, hier als Quadrat dargestellt, enthielt (zur Sequenz der Primer siehe Anhang I). Die beiden aus diesen PCRs entstandenen Produkte beinhalteten einen überlappenden Sequenzbereich, der das korrigierte Nukleotid enthielt. Für die nächste PCR (7) wurde diese Homologie ausgenutzt und die beiden Fragmente hybridisiert („Sequence Overlap Extension“). Das entstandene Produkt hatte nun sowohl 5´ wie auch 3´ eine Restriktionsschnittstelle und konnte nach Entfernen des fehlerhaften Bereiches aus dem Vektor leicht einkloniert werden (8). Eine anschließende Sequenzierung zeigte, daß die Reaktionen zum gewünschten Produkt geführt hatten. Abbildung 22 zeigt schematisch die beschriebenen Reaktionen.



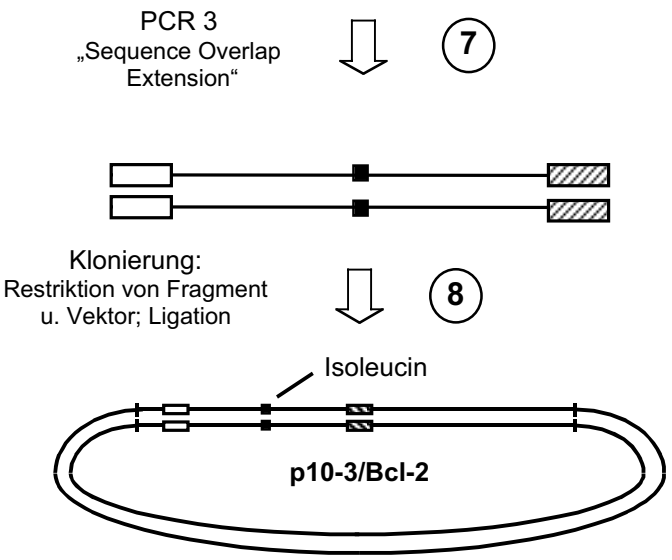


Abbildung 22: „Oligo directed Mutagenesis“ zur Ersetzung des fehlerhaften Nukleotides
Die Primer für die ersten beiden PCRs (6) enthielten jeweils eine zum fehlerhaften Nukleotid (als Kreis dargestellt) benachbarte Restriktionsschnittstelle und das korrigierte Nukleotid. Im zweiten Schritt wurde die Überlappung der beiden entstandenen Fragmente ausgenutzt, und jedes Fragment als Primer für das jeweilige andere verwendet (7). Das endgültige Fragment enthielt entsprechend auf jeder Seite eine Restriktionsschnittstelle und die „richtige“ Sequenz (als Quadrat dargestellt) und konnte leicht in den Vektor p10-3 einkloniert werden.

Nach Transfektion in L929-Zellen stellte sich heraus, daß die Transfektionseffizienz des Vektors p10-3/Bcl-2 sehr gering war (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde das Bcl-2-Insert in einen retroviral erzeugten Response-Vektor kloniert (Abbildung 23), der speziell für schwierige Transfektionen entwickelt wurde [64]. Dabei wurde durch eine PCR (9) am p10-3/Bcl-2-Template ein Fragment erzeugt, das durch Restriktion mit HindIII (10) für die Klonierung modifiziert wurde; da hier nicht Taq- sondern Pfu-DNA-Polymerase für die PCR verwendet wurde, entfiel das Entfernen der überhängenden Nukleotide. Der Vektor p(TRE) wurde mit BamHI geschnitten (11), die überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (12) und der linearisierte Vektor anschließend ebenfalls mit HindIII restringiert (13). Durch Ligation (14) entstand schließlich der Vektor p(TRE)Bcl-2. Nach Überprüfung des Erfolges der Klonierung nach Transformation und Amplifikation in kompetenten Bakterien durch Restriktion wurde die Sequenz durch Sequenzierung bei einem kommerziellen Anbieter (SeqLab) geprüft und bestätigt. Die gesamte Sequenz ist in Anhang II dargestellt. Abbildung 23 zeigt schematisch die zur Umklonierung nötigen Schritte und Reaktionen.

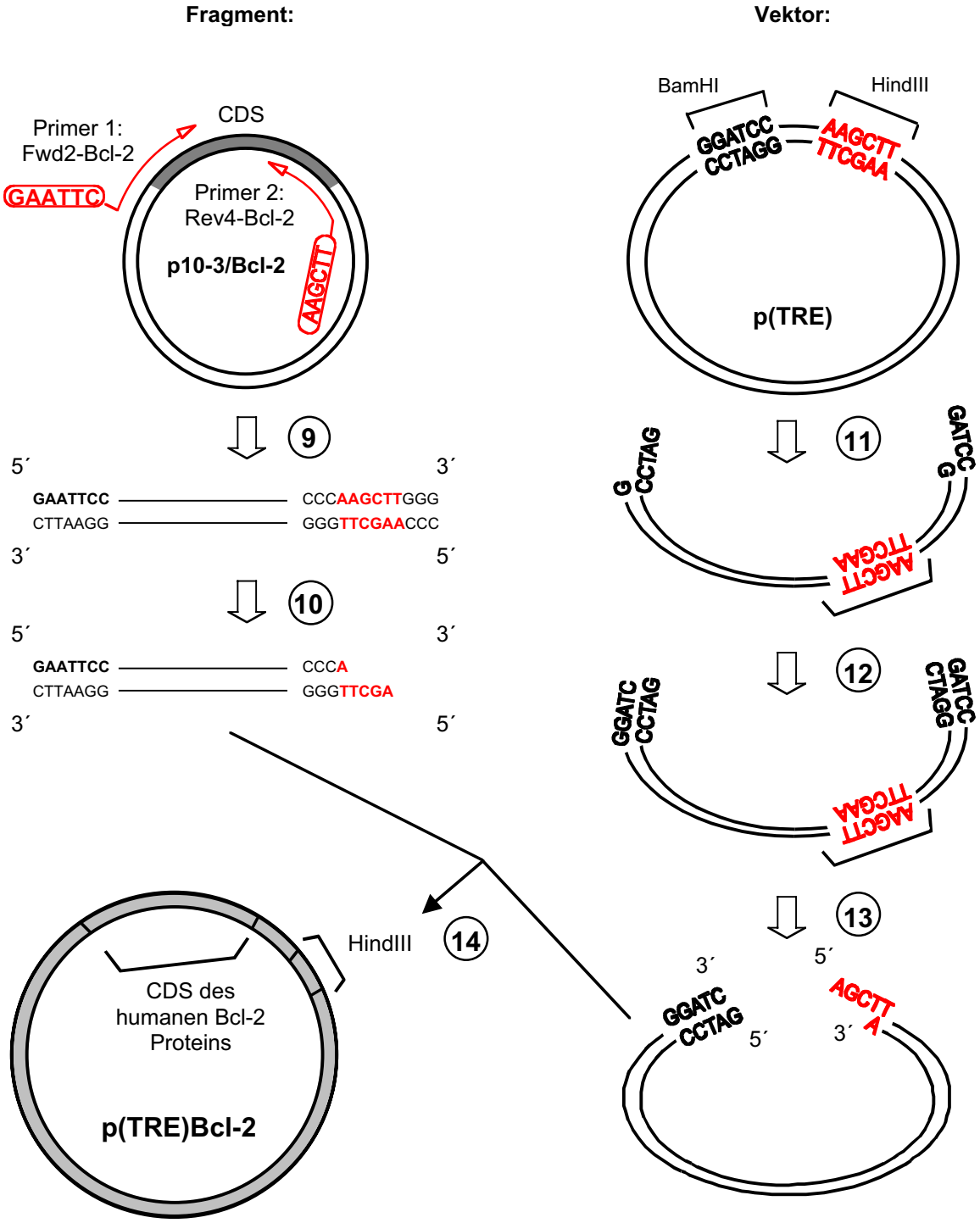


Abbildung 23: Umklonierung der codierenden Sequenz des Bcl-2-Gens in den retroviralen „Response"-Vektor p(TRE)
Die Klonierung des durch PCR am Vektor p(10-3)Bcl-2 entstandenen Fragmentes in den Vektor p(TRE) erfolgte durch folgende Modifikationen:
A) Fragment: Restriktion mit HindIII
B) Vektor: Restriktion mit BamHI, Auffüllen der Einzelstrangenden, Restriktion mit HindIII.
Dies erlaubte eine Ligation mit einem „Sticky End" und einem „Blunt End". Die vollständige Sequenz des Vektors ist in Anhang II dargestellt.

Die Transfektion erfolgte als Cotransfektion beider Plasmide – des Regulatorplasmids p(Tet-Off) und des Response-Vektors p(TRE)Bcl-2 – mittels des Transfektionsreagenzes LipofectAMINE®. Da beide Vektoren Resistenzgene gegen auch in Eukaryoten wirksame Antibiotika tragen, war die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellklone durch Zusatz der beiden Substanzen Geneticin und Hygromycin zum Kulturmedium möglich; entsprechend wurde die Kultivierung der Zellen nach der Transfektion nur in Anwesenheit dieser Antibiotika durchgeführt.

50 Zellklone wurden nach drei bis fünf Tagen isoliert und bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Anschließend wurden die Klone durch transiente Transfektion mit einem Reporterplasmid, das das Luciferasegen unter Regulation des TRE trug, auf die Aktivität des Transaktivators geprüft. Die Expression von Bcl-2 und deren Beeinflussung durch das Tetracyclinderivat Doxycyclin wurde durch einen Western-Blot überprüft. Abbildung 24 zeigt für den ausgewählten Klon #24 die Transaktivator-Aktivität im Luciferase-Assay (A) und die Expression von Bcl-2 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin in einem Western-Blot (B).

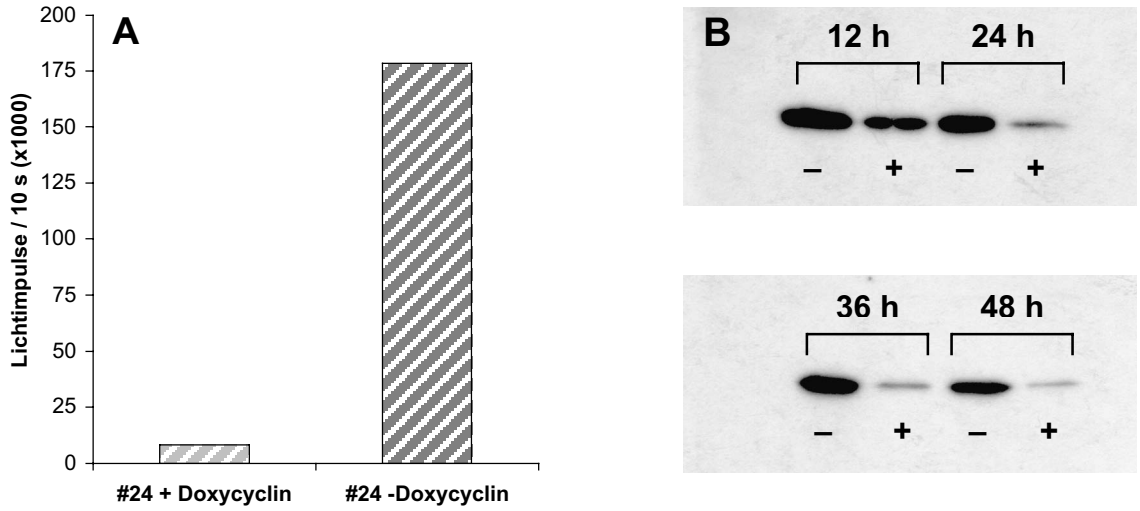


Abbildung 24: Nachweis der Expression des Transaktivators (A) und von Bcl-2 (B) in L929-Zellen
(A) Für den Nachweis der Expression des Tetracyclin-regulierbaren Transaktivators wurden die mit dem Tet-Off-System stabil transfizierten L929-Zellen zusätzlich transient mit einem Vektor transfiziert, der das Luciferase-Gen unter Kontrolle des TRE enthielt. Anschließend wurden die Zellen 48 h mit bzw. ohne Doxycyclin kultiviert und die Aktivität des Luciferase-Gens anhand der durch die Spaltung von Luciferin entstehenden Chemolumineszenz quantifiziert (repräsentative Auftragung).
(B) Die Expression von Bcl-2 wurde in einem Western-Blot nachgewiesen: nach 12, 24, 36 und 48 Stunden Inkubation mit (+) und ohne (-) 1 µg Doxycyclin/ml Medium wurden die Zellen lysiert und der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Je 30 µg wurden pro Bahn auf ein 20%iges SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Bcl-2-Bande wurde mit einem monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der spezifisch für das humane Bcl-2 Protein war, detektiert. Der Blot wurde mit dem WesternBreeze™-Kit entwickelt.

Da die Ergebnisse bei der Überprüfung der regulierbaren Bcl-2-Expression positiv waren, wurde der Glutathiongehalt von nicht-transfizierten Zellen, von transfizierten Zellen in Abwesenheit von Doxycyclin (Bcl-2-Expression) und von transfizierten Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin (Unterdrückung der Bcl-2-Expression) nach 24, 36 und 48 Stunden gemessen. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Glutathionmessung.

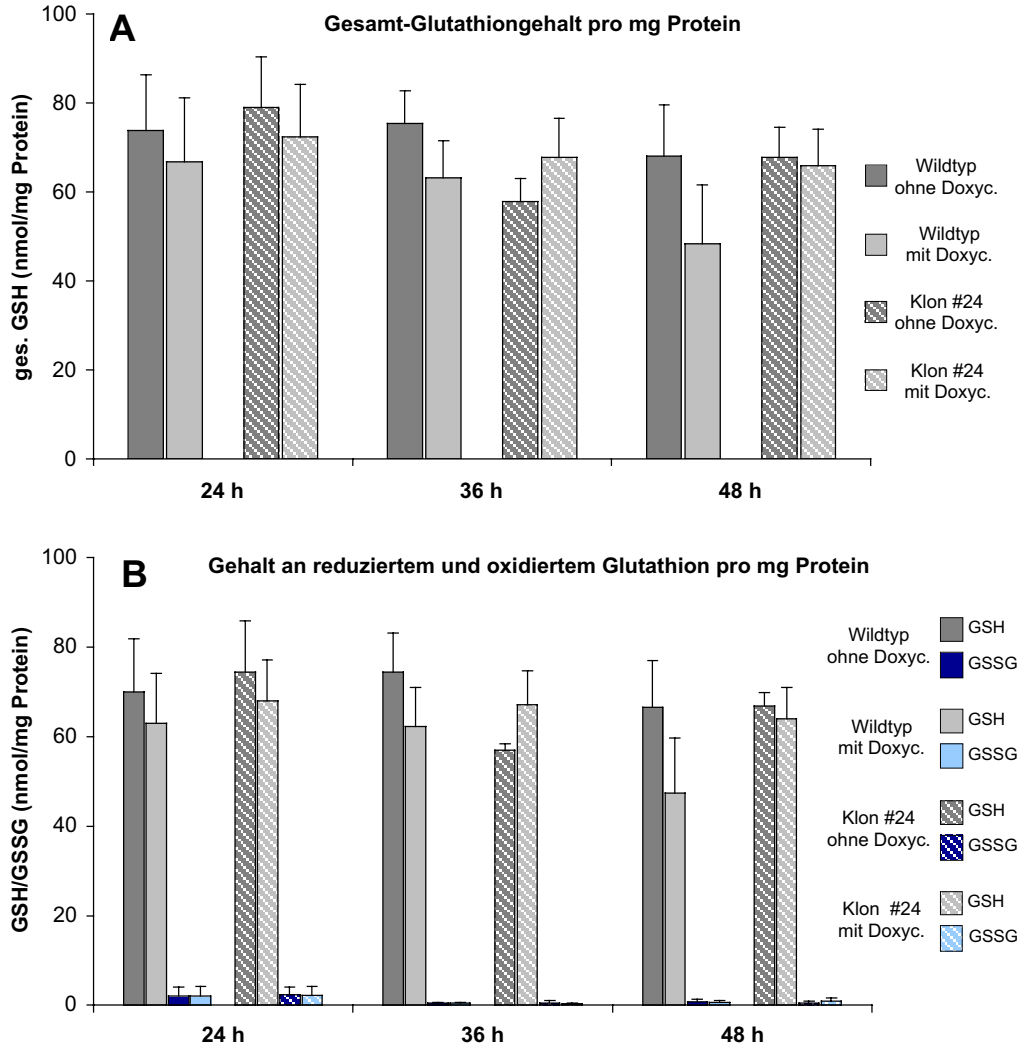


Abbildung 25: Gesamtglutathiongehalt (A) und Gehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion (B) in normalen und transfizierten L929-Zellen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin
L929-Zellen, inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin (Doxyc.), wurden nach 24, 36 und 48 Stunden lysiert und ihr Glutathiongehalt bestimmt. Abbildung A stellt den gemessenen Gesamtglutathiongehalt pro mg Protein dar; Abbildung B zeigt den reduzierten und den oxidierten Anteil. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 Experimenten.

Wie Abbildung 25 zeigt, konnte weder zwischen den nicht-transfizierten und den transfizierten Zellen noch zwischen dem induzierten und reprimierten Zustand bei den transfizierten Zellen ein signifikanter Unterschied im Glutathiongehalt

nachgewiesen werden. Allerdings war auffällig, daß tendenziell in Anwesenheit von Doxycyclin eine niedrigere Glutathionkonzentration gefunden wurde als in Abwesenheit.

Trotz dieses negativen Ergebnisses wurde Klon 24 auch in einem Vitalitätstest mit H_2O_2 eingesetzt (Abbildung 26), wobei neben dem Verhalten dieses Klons in An- und Abwesenheit von Doxycyclin auch die Vitalität nur mit dem Regulator-Plasmid transfizierter Zellen mit und ohne Doxycyclin untersucht wurde. Wie Abbildung 26 zeigt, war zwar die Schädigung des Bcl-2 exprimierenden Klons im Gegensatz zur Kontrolle etwas geringer, es konnte jedoch kein Unterschied in An- (keine Bcl-2-Expression) und Abwesenheit (Expression von Bcl-2) von Doxycyclin beobachtet werden.

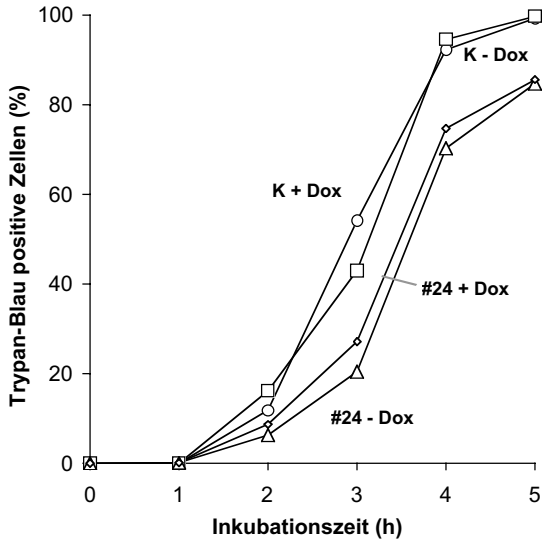


Abbildung 26: Einfluß von Bcl-2 auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung
Mit dem Tet-Off-System transfizierte L929-Zellen (#24) wurden nach 48 Stunden Kultivierung mit und ohne Doxycyclin mit 250 µM H_2O_2 in KH inkubiert und ihre Vitalität bestimmt. Parallel wurden zur Kontrolle nur mit dem Regulator-Plasmid transfizierte Zellen (ebenfalls nach 48 h mit bzw. ohne Doxycyclin) im gleichen Versuch eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ; ähnliche Ergebnisse wurden in 2 weiteren Experimenten erhalten.

PROBLEME DES VERWENDETEN MODELLS

Dieses negative Ergebnis kann natürlich so interpretiert werden, daß Bcl-2 keinen Einfluß auf den Glutathionspiegel und auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung im hier verwendeten Modell der kultivierten Fibroblasten ausübt. Um darüber jedoch eine eindeutige Aussage treffen zu können, sollten einige modellimmanente Besonderheiten in Betracht gezogen werden:

1. Die Transfektion der Zellen benötigt den Einbau fremder DNA-Bereiche in das eigene Genom. Da der Ort des Einbaus nicht gesteuert und nur schwierig festgestellt werden kann, ist es möglich, daß die neue DNA in ein wichtiges Gen oder einen essentiellen Regulatorbereich eingebaut wird, was ein normales Verhalten der Zellen

unmöglich machen kann. Dieses Problem wird im Tet-System dadurch verstärkt, daß zwei Fremd-DNA-Bereiche eingebaut werden müssen.

2. Fremde DNA wird häufig auch nach dem Einbau in das eigene Genom erkannt und im nächsten Teilungsprozeß nicht mehr repliziert. Um das auszuschließen, muß der Selektionsdruck während der gesamte Kultivierungszeit der Zellen aufrechterhalten werden, damit nur die Zellen überleben, die weiterhin beide Resistenzen exprimieren. Die Zellen müssen also die dauernde Anwesenheit von zwei für sie stark toxischen Substanzen tolerieren, was zu einem erheblichen ständigen Streß führt. Zusätzlich werden durch den Tod der Zellen, die die Resistenzgene nicht mehr tragen, Substanzen freigesetzt, die ebenfalls Streß bei den überlebenden Zellen induzieren können.

3. Das hier verwendete Tet-Off-System fordert zusätzlich zu Geneticin und Hygromycin auch die ständige Anwesenheit eines Tetracyclins, in diesem Falle Doxycyclin, damit die Transkription des zu untersuchenden Gens unterdrückt bleibt. Doxycyclin ist zwar – theoretisch – nicht toxisch für eukaryotische Zellen (Abbildung 27A), es bindet jedoch auch an deren Ribosomen und hemmt somit in gewissem Maße auch in den hier untersuchten Zellen die Translation, was natürlich wiederum den normalen Zellzyklus und damit die Teilungsrate und das Wachstum der Zellen stark beeinflußt (siehe Abbildung 27B).

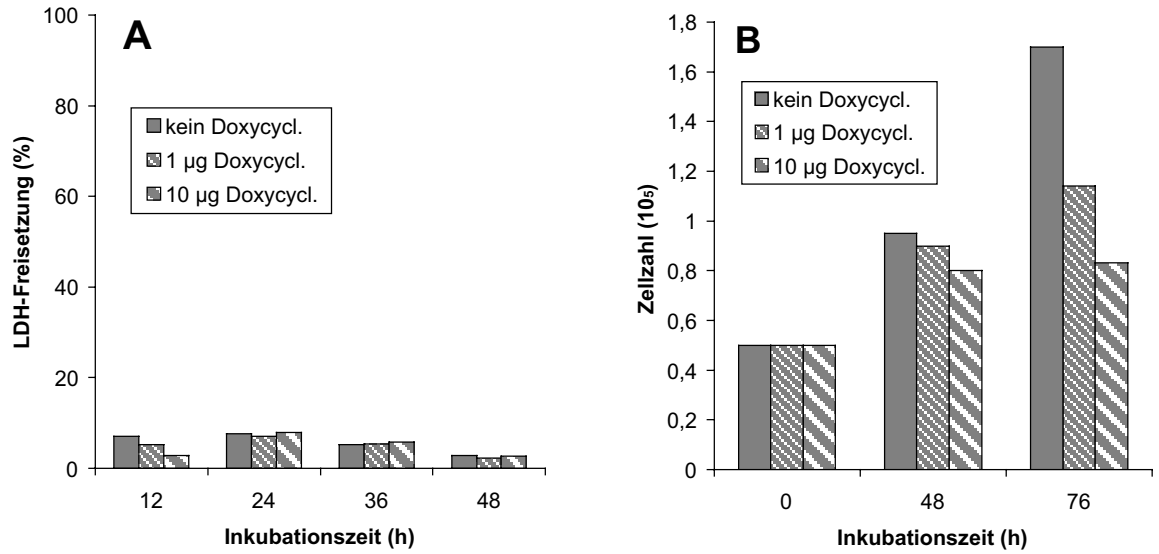


Abbildung 27: Einfluß von Doxycyclin auf Vitalität und Wachstum von L929-Zellen
L929-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin (Doxycl.) in Zellkulturmedium inkubiert. Zur Bestimmung der Vitalität wurde die LDH-Freisetzung gemessen (A). Zur Quantifizierung des Zellwachstums (B) wurden die Zellen durch Trypsinisierung vom Kulturgefäß gelöst und gezählt (repräsentatives Experiment).

Zusammenfassend kann hier also gesagt werden, daß das untersuchte System trotz des zweifelsfreien Nachweises des Bcl-2-Proteins im Western-Blot nicht für die Untersuchung komplexer zellulärer Vorgänge geeignet war, da die Expression von Bcl-2 bei weitem nicht der einzige modifizierte Faktor war. Die Etablierung dieses Systems greift so heftig in zelluläre Regulationsmechanismen ein, daß ein möglicher positiver Effekt von Bcl-2 auf den Redoxzustand der Zelle wahrscheinlich von den starken negativen Effekten unterschiedlichster Art verdeckt wird. Zwar ist die Möglichkeit der Kontrolle in diesem System im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen verbessert, die Einflüsse der An- und Abwesenheit von Doxycyclin können jedoch nicht ignoriert werden. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

2.2 EISENINDUZIERTE SCHÄDIGUNG VON KULTIVIERTEN ZELLEN

Die unterschiedlich ausgeprägte Eisenabhängigkeit der H_2O_2-induzierten Zellschädigung von L929-Zellen in An- und Abwesenheit von Glucose ließen es sinnvoll erscheinen, auch den Einfluß des zellulären Redoxstatus auf eine rein eiseninduzierte Zellschädigung zu untersuchen. Als Untersuchungsmodell wurden hier – wie bei der Untersuchung der H_2O_2-Schädigung – zunächst L929-Fibroblasten verwendet; Untersuchungen zur Eisentoxizität wurden jedoch auch in primären Rattenhepatozyten und in zwei Rattenleberendothelzellinien durchgeführt.

2.2.1 ERHÖHUNG DES CHELATISIERBAREN EISENPOOLS IN L929-ZELLEN

Die zelluläre Eisenaufnahme ist aufgrund der hohen potentiellen Toxizität intrazellulären Eisens sehr stark reguliert. Eine experimentelle akute Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools ist daher nur unter Umgehung der normalen Regulationsmechanismen möglich. Ein Weg, solch einen „Bypass“ zu erreichen, ist die Komplexierung von Eisen an einen oder mehrere – meist lipophile – Liganden, die dann eine Membranpermeabilität des Komplexes erlaubt. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von verschiedenen Eisensalzen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Modell wurden L929-Zellen mit verschiedenen Eisenkomplexen (Eisen(III)-8-Hydroxychinolin, Eisen(III)-Nitrilotriacetat und Eisen(III)-Pyrrolidindithiocarbamat [PDTC]) und Eisensalzen (Eisen(III)chlorid, Eisen(II)ammoniumcitrat [FAC], Eisen(III)citrat, Eisen(II)sulfat und Eisen(III)nitrat) inkubiert und die Vitalität der Zellen durch die Bestimmung der LDH-Freisetzung ermittelt. Der Verlauf der Vitalitätsmessung ist exemplarisch für einige Verbindungen in Abbildung 28 gezeigt. Wie deutlich erkennbar ist, war keins der Eisensalze und waren nur zwei der Eisenkomplexe überhaupt in der Lage, eine Zellschädigung auszulösen, wobei die Toxizität der Eisen-PDTC-Komplexes hauptsächlich auf die Eigentoxizität des Liganden zurückzuführen war (Daten nicht dargestellt). Der Komplex aus Eisen(III)chlorid und dem lipophilen Liganden 8-Hydroxychinolin (Fe(III)/8HQ) schien jedoch für die hier vorliegende Fragestellung geeignet zu sein und wurde deshalb für alle folgenden Versuche verwendet.

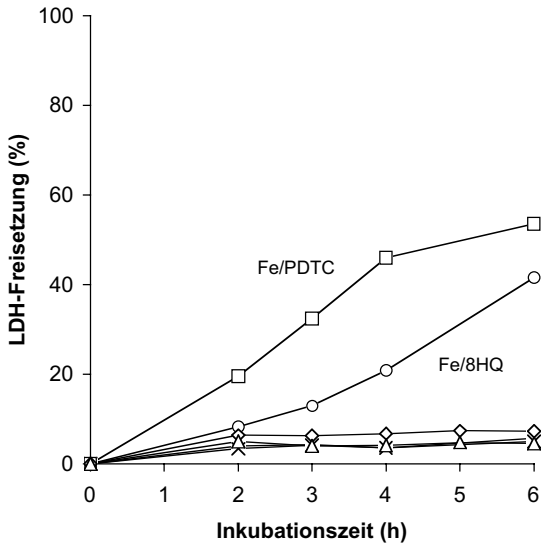


Abbildung 28: Test der Toxizität verschiedener Eisenverbindungen in L929-Zellen
L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer in Anwesenheit der indizierten Verbindungen inkubiert; die Vitalität wurde durch LDH-Freisetzung bestimmt.
Die Eisenverbindungen wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Eisenpyrrolidindithiocarbamat (Fe/PDTC, □), Eisennitrilotriacetat (Fe/NTA, ◇), Eisen(II)ammoniumcitrat (FAC, ×), Eisen(III)citrat (△) und Eisen(III)-nitrat (+) mit je 100 µM Eisen und Eisen/8-Hydroxychinolin (Fe(III)/8HQ, ○) mit 20 µM Eisen.

2.2.2 VERSTÄRKUNG DER EISENTOXIZITÄT DURCH D-GLUCOSE

Die Inkubation von L929-Fibroblasten mit 10 bis 30 µM Eisen in Form des membrangängigen Komplexes Fe(III)/8HQ (1:2) verursachte in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer einen konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust innerhalb von 5 Stunden (Abbildung 29A), wobei weder das Lösungsmittel DMSO noch der Ligand 8-Hydroxychinolin alleine toxisch waren (Daten nicht dargestellt). Im Gegensatz zur H_2O_2-induzierten Zellschädigung wurde der eiseninduzierte Vitalitätsverlust durch die Zugabe von 10 mM D-Glucose zum Inkubationsmedium dramatisch verstärkt und beschleunigt (Abbildung 29B).

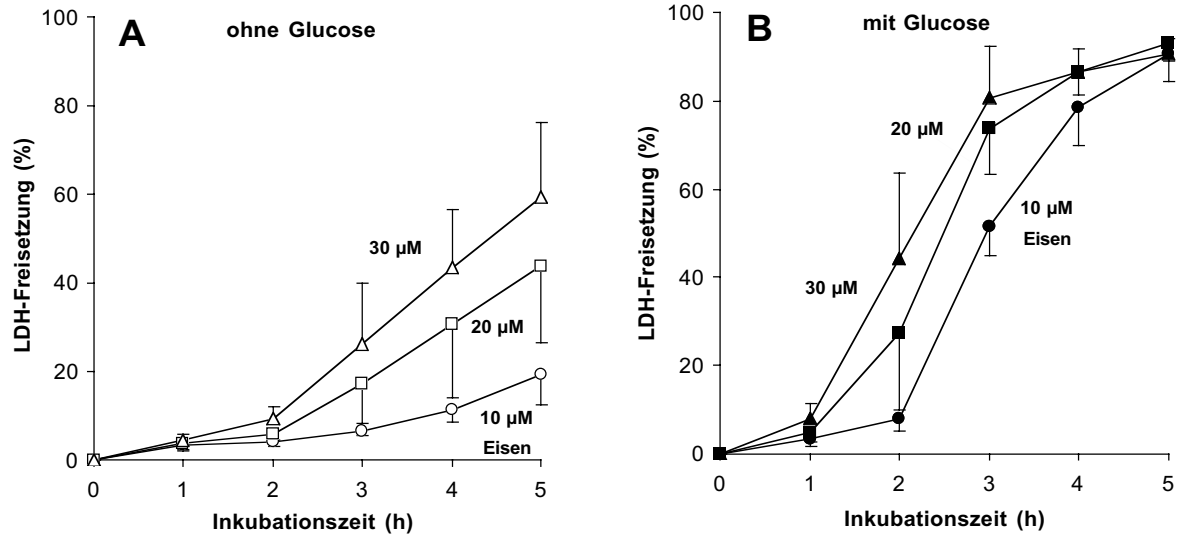


Abbildung 29: Konzentrationsabhängigkeit der Zellschädigung in Ab- und Anwesenheit von Glucose
L929 Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 10 mM D-Glucose inkubiert. Eisen wurde als Fe(III)/8HQ in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und die Zellschädigung über die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 4 Experimenten.

Im Gegensatz dazu waren das D-Glucose-Enantiomer L-Glucose und das Derivat 2-Desoxyglucose nicht in der Lage, die Eisentoxizität signifikant zu erhöhen (Abbildung 30). L-Glucose besitzt die gleichen chemischen Eigenschaften wie D-Glucose, kann aber in den Säugetierzellen nicht verstoffwechselt werden, da sie nicht von den Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels erkannt wird. 2-Desoxyglucose dagegen tritt zwar in die Glykolyse ein, kann aber nicht weiter verstoffwechselt werden.

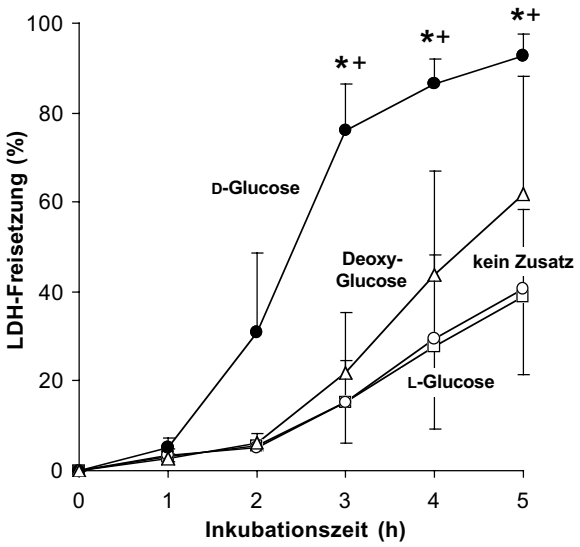


Abbildung 30: Effekte von D-, L- und Desoxy-Glucose auf die eiseninduzierte Zellschädigung
L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit Puffer ohne Glucose (○), mit 10 mM D-Glucose (●), mit 10 mM Desoxyglucose (Δ) oder mit 10 mM L-Glucose (□) inkubiert. 20 µM Eisen wurde als Eisen(III)/8-Hydroxychinolinkomplex (1:2) zugegeben und die Zellschädigung wurde durch die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 4 Experimenten. *Signifikanter Unterschied zur Inkubation ohne Glucose, +signifikanter Unterschied zur Inkubation mit L-Glucose.

Während L-Glucose keinen meßbaren Einfluß auf die Eisentoxizität hatte, wurde von Desoxyglucose eine geringe Verstärkung induziert, die aber ebenfalls nicht signifikant war. Der fehlende Effekt der beiden nicht-metabolisierbaren Zucker zeigte daher eindeutig, daß die Verstärkung der Eisentoxizität nicht auf einer (extrazellulären) chemischen Reaktion von Glucose mit dem Eisenkomplex beruhen konnte und schloß ebenfalls die unterschiedliche Osmolarität der Inkubationslösungen in An- und Abwesenheit von Glucose als ausschlaggebenden Faktor aus. Eine Metabolisierung von Glucose war demnach unabdingbar für den beobachteten toxizitätsverstärkenden Effekt.

2.2.3 VERSTÄRKUNG DES EISENINDUZIERTEN OXIDATIVEN STRESSES DURCH GLUCOSE

Hypoxische Bedingungen schützten die Zellen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose vor dem eiseninduzierten Vitalitätsverlust (Abbildung 31), ein Befund, der auf eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies auch an dieser eiseninduzierten Cytotoxizität hindeutete. Die starke Erhöhung der Eisentoxizität war

jedoch auch unter niedrigen Sauerstoffpartialdrücken (2 und 5%), also unter Sauerstoffkonzentrationen im physiologischen Bereich, deutlich ausgeprägt.

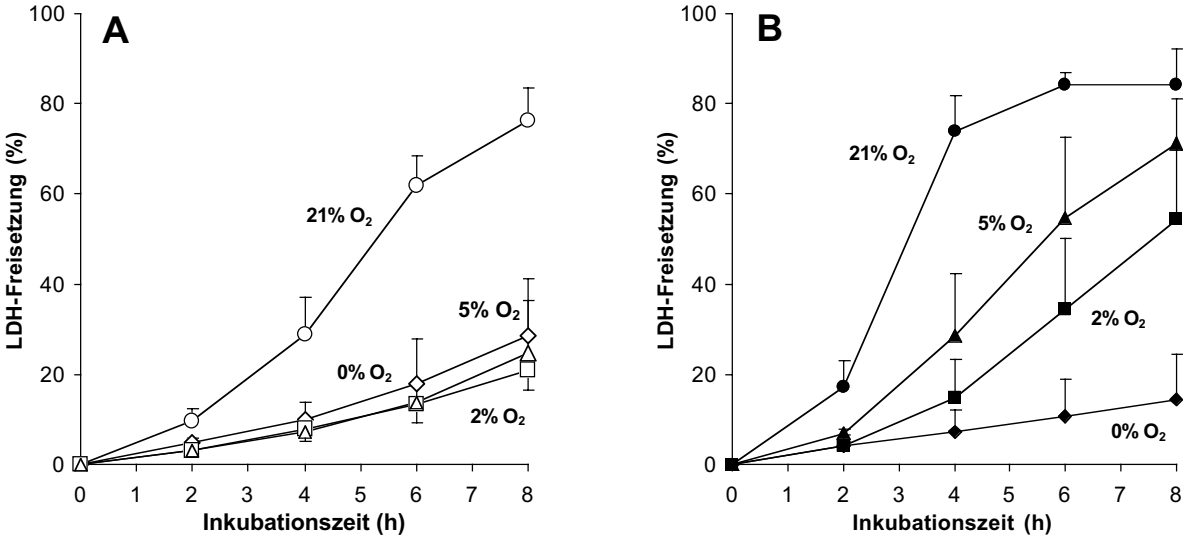


Abbildung 31: Abhängigkeit der eiseninduzierten Zellschädigung vom Sauerstoffpartialdruck in Ab- und Anwesenheit von Glucose
L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer mit 20 µM Eisen (als Eisen(III)/8-Hydroxychinolin-Komplex) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 mM D-Glucose bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken (0%, 2%, 5% und 21% O_2) inkubiert. Die Schädigung der Zellen wurde durch die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt und die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 Experimenten.

Die Vermutung, daß Glucose eiseninduzierten oxidativen Streß verstärkte, wurde durch fluoreszenzmikroskopische Messungen mit dem Farbstoff Dichlorodihydrofluorescein, der als Diacetat in die Zellen geladen werden kann, bestätigt. Dieser Farbstoff zeigt einen Fluoreszenzanstieg, wenn durch Oxidation das fluoreszierende (oxidierte) Produkt Dichlorofluorescein (DCF) aus dem nicht-fluoreszierenden (reduzierten) Edukt 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCHF) gebildet wird [65, 66]. Gab man nun Eisen zu mit DCHF beladenen L929-Zellen und inkubierte in Abwesenheit von Glucose, stieg die Fluoreszenz langsam an (Abbildung 32) bis der Zelltod eintrat, was auf eine Bildung von oxidierenden Spezies infolge der Eisenzugabe hindeutete. In Anwesenheit von Glucose verlief dieser Fluoreszenzanstieg – und damit die eisenabhängige Oxidation des Farbstoffes – deutlich schneller.

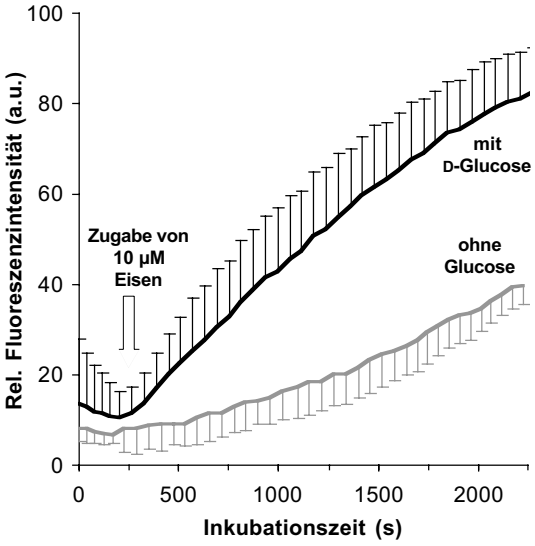


Abbildung 32: Effekt von Glucose auf die eisenabhängige Oxidation von Dichlorodihydrofluorescein
Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden für eine Stunde mit 10 µM Dichlorodihydrofluorescein (DCHF, als Diacetat angewendet) beladen und die Fluoreszenz auf einem digitalen Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{exc.}$= 488 ± 10 nm, $\lambda_{em.}$= 520 ± 20 nm) in Ab- (graue Linie) und Anwesenheit (schwarze Linie) von 10 mM D-Glucose aufgezeichnet. Nach 10 Minuten wurden 20 µM Eisen als Fe(III)/8HQ (Pfeil) zugegeben und die Oxidation des Farbstoffes (Fluoreszenzanstieg) wurde für weitere 2000 Sekunden aufgezeichnet. Die gezeigten Daten (in willkürlichen Einheiten, a.u.) sind Mittelwerte aus 4 Experimenten mit jeweils mindestens 20 Einzelzellen pro Messung.

2.2.4 AUSSCHLUß EINER MÖGLICHEN ENERGIEABHÄNGIGKEIT DER EISENTOXIZITÄTSVERSTÄRKUNG DURCH GLUCOSE

Neben dem Redoxstatus wird auch der Energiegehalt der Zellen durch die Verstoffwechselung von Glucose beeinflußt; die Toxizitätserhöhung war also möglicherweise auch ATP-abhängig. Daher wurden verschiedene Inhibitoren der Atmungskette eingesetzt: Oligomycin zur Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthase, Antimycin A zur Blockierung des Elektronenüberganges zwischen Cytochrom b und c und der Entkoppler CCCP (Daten nicht dargestellt). In keinem Fall wurde durch das Absenken des ATP-Spiegels ein Schutzeffekt erzielt; im Gegenteil wurde z.B. durch die Zugabe von Oligomycin ein leicht additiv-toxischer Effekt sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Glucose beobachtet. Ein durch Glucose möglicherweise verbesserter Energiestatus konnte also als entscheidender Faktor der Toxizitätsverstärkung ausgeschlossen werden.

2.2.5 EFFEKT VON D-GLUCOSE AUF DEN ZELLULÄREN REDOXSTATUS

Im allgemeinen wird angenommen, daß Eisen nur dann ROS-abhängige Zellschädigungen vermitteln kann, wenn es im reduzierten (zweiwertigen) Zustand vorliegt. Eine potentielle Verbindung zwischen der Metabolisierung von Glucose und der Eisentoxizität könnte demnach über den zellulären Redoxstatus bestehen. Da NAD(P)H der Hauptelektronenverteiler in der Zelle ist, kann der zelluläre NAD(P)H-Gehalt als „Marker“ für die allgemeine Reduktionskapazität der Zelle dienen [67].

Um einen möglichen Einfluß von Glucose auf den zellulären NAD(P)H-Gehalt sichtbar zu machen, wurde die Autofluoreszenz der Zellen bei $\lambda_{exc.}$= 365 ± 12,5 nm

und $\lambda_{em.}$= 450-490 nm bestimmt, die hauptsächlich von NADH und NADPH verursacht wird ([68]; Abbildung 33 zeigt eine Laser-Scanning-Aufnahme der NAD(P)H-Fluoreszenz von L929-Zellen).

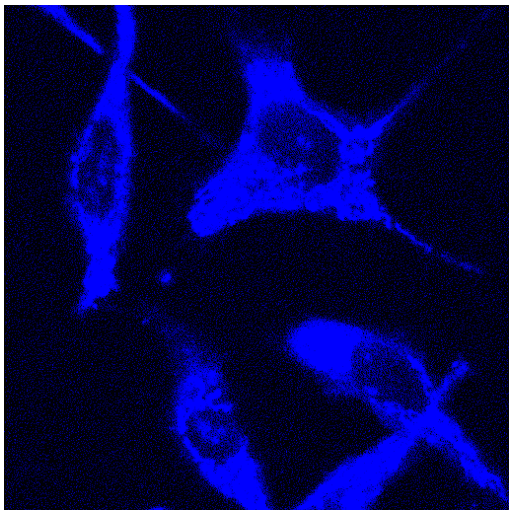


Abbildung 33: Verteilung der NAD(P)H-Fluoreszenz in L929-Zellen
Die Autofluoreszenz von auf Glasplättchen kultivierten L929-Zellen wurde bei einer Anregungswellenlänge λ_{exc} = 365 nm nach 48 Stunden auf einem Laser-Scanning-Mikroskop bei $\lambda_{em.}$ = 385-470 nm aufgezeichnet. Der Hauptanteil der beobachteten Fluoreszenz ist in den Mitochondrien lokalisiert; ein geringerer Anteil ist jedoch auch im Cytosol erkennbar.

Ohne Glucose erhielt man eine mittlere Fluoreszenzintensität (Abbildung 34), die für mindestens eine Stunde auf einem stabilen Niveau blieb. Wie erwartet verursachte die Zugabe von Glucose einen schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der nach etwa 5 Minuten einen stabilen Wert erreichte, der etwa doppelt so hoch lag wie der Ausgangswert.

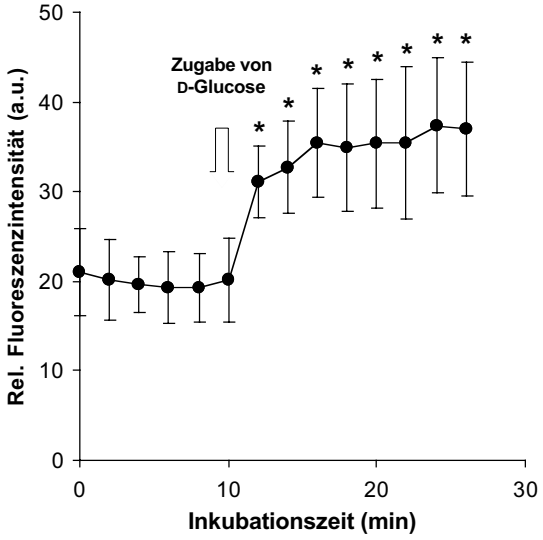


Abbildung 34: Effekt von Glucose auf den zellulären NAD(P)H-Gehalt
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden in glucosefreiem Krebs-Henseleit-Puffer 30 Minuten vorinkubiert und die zelluläre Autofluoreszenz ($\lambda_{exc.}$= 365 ± 12,5 nm, $\lambda_{em.}$= 450-490 nm) mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop in einem Abstand von 2 Minuten gemessen. Nach 10 Minuten wurden 10 mM Glucose (Pfeil) zugegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 Experimenten. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Glucose.

Zur Bestätigung, daß der gemessene Fluoreszenzanstieg tatsächlich eine Änderung des NAD(P)H-Gehaltes widerspiegelte, wurde mittels eines enzymatischen

Assays (Glutamat-Dehydrogenase) die Menge an reduziertem NAD(P)H im Zell-Lysat bestimmt. Nach einer 30-minütigen Inkubation in glucosefreiem Krebs-Henseleit-Puffer enthielten die Zellen 1,16 ± 0,18 nmol NAD(P)H pro mg Protein; in Anwesenheit von Glucose wurde ein 1,5fach höherer Gehalt an reduziertem NAD(P)H (1,74 ± 0,14 nmol NAD(P)H pro mg Protein) gefunden.

2.2.6 EINFLUß VON D-GLUCOSE AUF DIE EISENREDUKTION

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen nahe, daß die erhöhte Eisentoxizität in Anwesenheit von D-Glucose möglicherweise durch eine verstärkte Reduktion des Eisens in den hochreaktiven zweiwertigen Redoxzustand verursacht wird, wobei die verstärkte Verfügbarkeit von NAD(P)H und – infolgedessen – anderer Reduktionsäquivalente als entscheidender Mediator fungiert. Hierbei sind zwei „Szenarien" denkbar, eine höhere „steady-state"-Konzentration an Eisen(II) – also eine Verschiebung des Redoxzustandes des zellulären chelatisierbaren Eisens in Richtung des reduzierten Zustandes – oder ein beschleunigtes Redox-„Turnover", also eine schnellere Re-Reduktion des Eisens in den zweiwertigen Zustand nach der Partizipation in Redoxreaktionen. Unglücklicherweise ist die Bestimmung des Redoxzustandes des intrazellulären chelatisierbaren Eisens hochproblematisch.

Ein möglicher Einfluß von Glucose auf den Redoxzustand des chelatisierbaren Eisenpools wurde mit Hilfe von Elektronenspinresonanzmessungen (ESR) untersucht. In der ESR ergeben paramagnetische Spezies (also solche mit ungepaarten Elektronen) im Magnetfeld typische Signale, die anhand ihrer Form und Lage den jeweiligen Spezies zugeordnet werden können. Eisen(III) zum Beispiel ist bei einem g-Wert von 4,3 gut sichtbar. Bestünde nun ein Unterschied in der Steady-State-Konzentration an Eisen(II), sollte in Anwesenheit von Glucose weniger Eisen(III) gefunden werden als in Abwesenheit von Glucose. Bislang wurden ESR-Messung für eukaryotische Zellen jedoch ausschließlich in Zell- oder Gewebehomogenaten beschrieben. Diese Art von Probenpräparation (Homogenisierung und anschließendes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff) begünstigt eine künstliche Oxidation des Eisens und die Gefahr, daß das *in vivo* vorhandene Eisen(II)/Eisen(III)-Verhältnis zerstört wird, ist sehr groß. Daher wurde hier versucht, Gesamtzellmessungen durchzuführen, die das Eisen(II)/Eisen(III)-Verhältnis im Moment des Einfrierens widerspiegeln. Abbildung 35 zeigt exemplarisch Spektrogramme von Kontrollzellen sowie von eisenbeladenen Zellen: Während in den Kontrollen kein Signal zu finden

war, wiesen die eisenbeladenen Zellen ein Eisen(III)-Signal im erwarteten g-Bereich auf. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Signalgröße beim Vergleich der Zellen, die in Ab- und Anwesenheit von Glucose inkubiert worden waren, gefunden werden (Daten nicht dargestellt). Durch Zusatz des starken Eisen(III)-Chelators Desferrioxamin (Verschiebung des Gleichgewichtes) konnte die Fe(III)-Signalstärke um ein Vielfaches erhöht werden, was die These stützt, daß der größte Teil des chelatisierbaren Eisenpools auch im hier untersuchten System im zweiwertigen Zustand vorliegt.

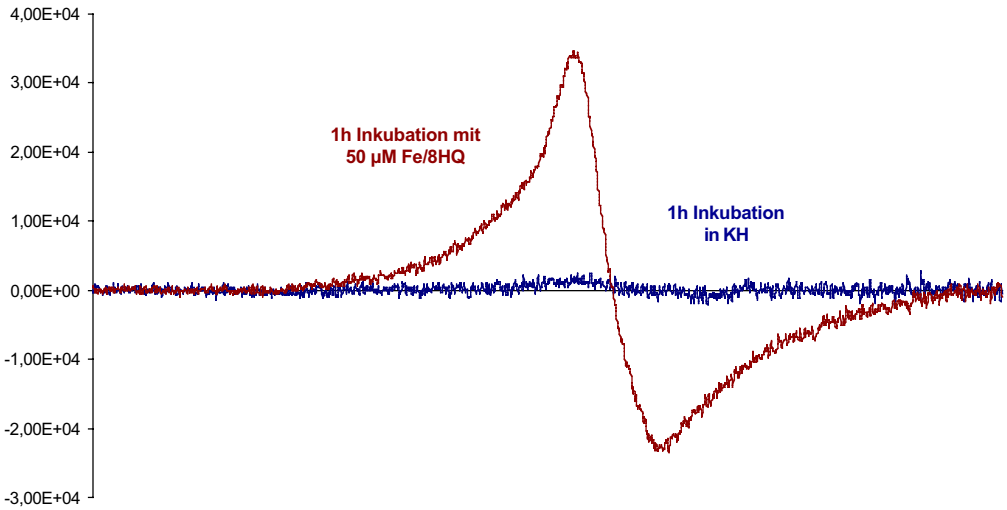


Abbildung 35: ESR-Spektren von L929-Zellen
Auf großen Kulturschalen (225 cm^2) kultivierte L929-Zellen wurden eine Stunde in Krebs-Henseleit-Puffer mit oder ohne Glucose ohne Zusatz von Eisen (blaue Linie) oder in Anwesenheit von 50 µM Fe(III)/8HQ (rote Linie) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Puffer abgesaugt und dreimal zügig und sorgfältig mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgeschabt, schnell in 600 µl KH resuspendiert und in 4-mm Suprasil Quarz-ESR-Röhrchen überführt, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Messungen erfolgten unter Stickstoffkühlung in einem Bruker ESP 300E X-Band Spektrometer. Die Abbildung zeigt exemplarische Spektren, die unter folgenden Bedingungen aufgenommen wurden: Center Field 1550 G, Sweep Width 600 G, Modulation Amplitude 19,473 G, Receiver Gain 1 x 10^5, Frequency 9,521723 GHz, Power 20 mW. Zwischen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Glucose inkubierten Zellen wurde kein deutlicher Unterschied in der Signalintensität festgestellt; eine quantitative Auswertung war jedoch nicht möglich.

Die Ergebnisse der ESR-Untersuchungen deuteten darauf hin, daß der entscheidende Unterschied nicht im „Steady-State-Level“ der beiden Eisenspezies lag. Um einen möglichen Einfluß von Glucose auf die Reduktionsgeschwindigkeit intrazellulären Eisens (und damit auf den „Redox-Turnover“) abschätzen zu können, wurde eine neue Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffes PhenGreen SK etabliert, der bisher als intrazellulärer Eisenindikator verwendet wurde [13, 14]. Das Verhalten dieses 1,10-Phenanthrolin-enthaltenden Fluorescein-Derivates in Gegenwart von

zwei- und dreiwertigem Eisen ist sehr unterschiedlich: in Anwesenheit von nur 2 µM Eisen(II) wurde die Fluoreszenz von 30 µM des Farbstoffes in einem zellfreien System bereits deutlich gequencht, wohingegen auch 10 µM Eisen(III) keinen signifikanten Einfluß auf die PhenGreen-Fluoreszenz ausübten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Effekte von Eisen(II) und Eisen(III) auf die PhenGreen SK-Fluoreszenz in einem zellfreien System

EISENKONZENTRATION (µM)	PHENGREEN SK-FLUORESZENZ (% der Anfangsfluoreszenz) nach Zugabe von	
	Fe(II)	Fe(III)
0	100	100
2	81.8 ± 2.1	100.7 ± 1.8
5	52.4 ± 2.1	100.9 ± 1.4
8	27.5 ± 3.0	103.6 ± 3.8
10	19.9 ± 1.1	98.6 ± 3.7

PhenGreen SK (30 µM) wurde in einem „cytosolischen" Medium, das die Komposition des Cytosols simuliert, bei 37°C gelöst. Eisen(II) und Eisen(III) wurden aus frisch präparierten Stammlösungen (Fe(II): 1 mM Eisen(II)ammoniumsulfat, 1 mM Trinatriumcitrat Dihydrat, 20 mM Ascorbat in 10 mM Imidazolpuffer, pH 7.0; Fe(III): 1 mM Eisen(III)chlorid-Hexahydrat in 10 mM Imidazolpuffer) bis zu einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Nach der Zugabe jeden Aliquots wurde das Medium sofort sorgfältig geschüttelt und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot (100 µl) des Mediums wurde auf ein Chelex-behandeltes Glasplättchen gegeben und die Fluoreszenz bei $\lambda_{exc.}$= 488 nm und $\lambda_{em.} \geq$ 505 nm mit einem Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Die relativen Emissionsintensitäten sind als Prozentsatz der initialen Fluoreszenzintensität (die jeweils auf 100% gesetzt wurde) angegeben. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 Experimenten.

Basierend auf diesem unterschiedlichen Verhalten wurde hier ein kinetischer Ansatz angewendet, in dem der Farbstoff nicht als Indikator für das Vorhandensein von zellulärem chelatisierbaren Eisen eingesetzt wurde, sondern zur Darstellung der Reduktion des Eisens – in einzelnen, vitalen Zellen und „online" – durch die Messung des zellulären PhenGreen SK-Fluoreszenzabfalles infolge der Bildung zweiwertigen Eisens. Abbildung 36A zeigt die Fluoreszenz PhenGreen SK-beladener Zellen, aufgenommen mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop. Nach 10 Minuten wurde 5 µM Fe(III)/8HQ zugegeben, was einen plötzlichen Abfall in der zellulären PhenGreen-Fluoreszenz verursachte (36B). Dieser Abfall zeigt eindeutig, daß das zugegebene dreiwertige Eisen intrazellulär zum zweiwertigen Eisen reduziert wurde, das wiederum in der Lage war, den Fluoreszenzabfall hervorzurufen.

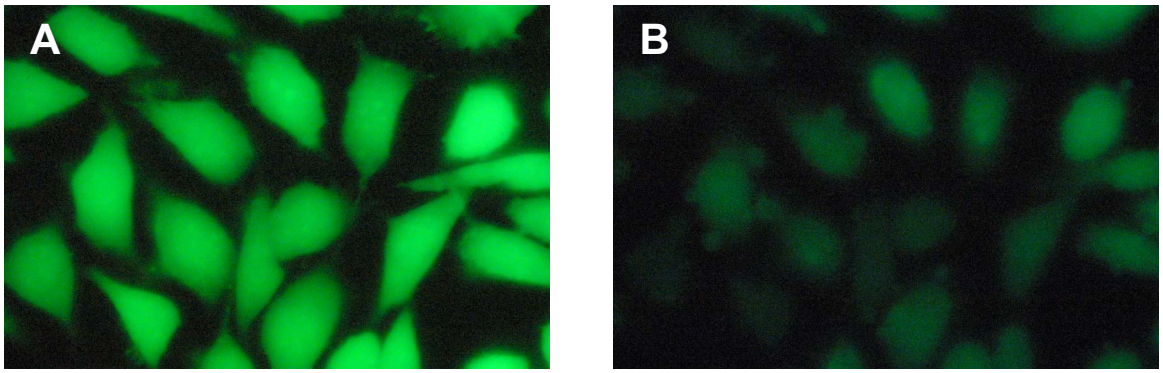


Abbildung 36: Zelluläre PhenGreen SK-Fluoreszenz vor und nach Zugabe von Eisen
Nach einer 15minütigen Beladung mit 60 µM PhenGreen SK wurde die Fluoreszenz ($\lambda_{exc.}$ = 488 ± 10 nm, $\lambda_{em.}$ = 520 ± 20 nm) von auf Glasplättchen kultivierten L929-Zellen auf einem digitalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (A). Nach der Zugabe von 5 µM Eisen als Fe(III)/8HQ nahm die zelluläre Fluoreszenz deutlich ab (B).

Die Anwesenheit von D-Glucose bewirkte im Vergleich zu den Werten, die in Zellen in substratfreiem Puffer erhalten wurden, eine erhebliche Steigerung der Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalles (Abbildung 37), wohingegen eine solche Beschleunigung der Eisenreduktion in Anwesenheit von L-Glucose nicht beobachtet werden konnte (Daten nicht dargestellt).

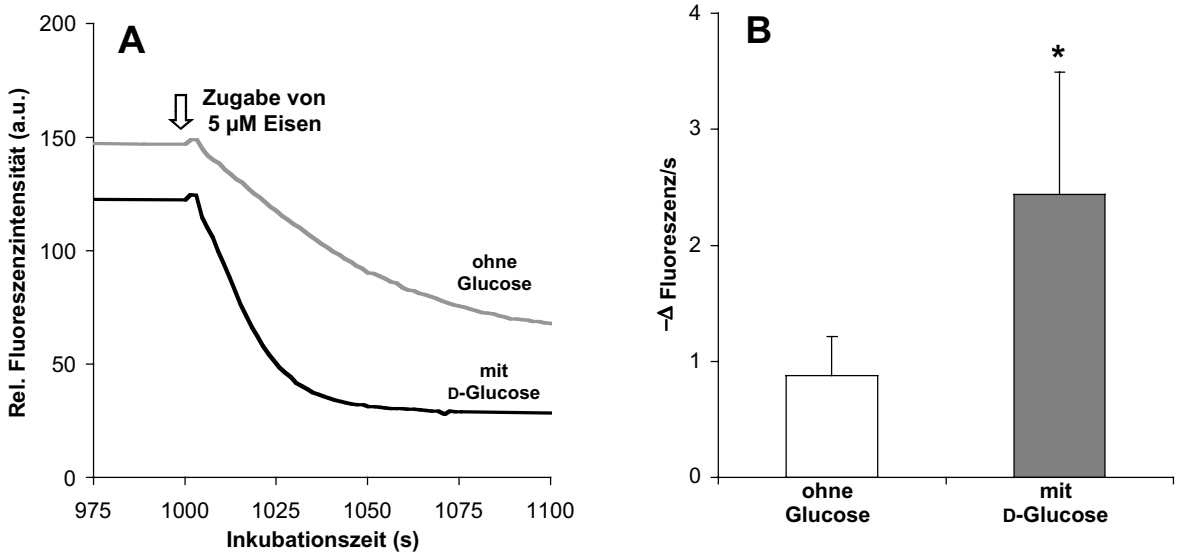


Abbildung 37: Effekt von Glucose auf die Geschwindigkeit der intrazellulären Eisenreduktion
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden 15 Minuten mit 60 µM PhenGreen SK-Diacetat beladen und ihre Fluoreszenz auf einem digitalen Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{exc.}$ = 488 ± 10 nm, $\lambda_{em.}$ = 520 ± 20 nm) aufgenommen. Nach 10 Minuten wurde 5 µM Eisen (als Fe(III)/8HQ) zugegeben (Pfeil) und der Fluoreszenzabfall aufgezeichnet. Abbildung A zeigt einen typischen Zeitverlauf einer Messung mit Zellen in Glucose-freiem Krebs-Henseleit-Puffer (graue Linie) und in mit 10 mM D-Glucose supplementiertem Krebs-Henseleit-Puffer (schwarze Linie). Abbildung B zeigt eine Auftragung der Steigung des initialen linearen Bereiches des Fluoreszenzabfalles nach Eisenzugabe. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit 10-15 Einzelzellmessungen pro Experiment. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Glucose.

Da Glucose den zellulären Redoxstatus über NAD(P)H beeinflußt, ist es wahrscheinlich, daß die Eisenreduktion – direkt oder über andere Reduktionsmittel – mit der NAD(P)H-Oxidation gekoppelt ist. Diese Annahme wurde durch den Befund bestätigt, daß die Zugabe von Fe(III)/8HQ den zellulären Gehalt an NAD(P)H signifikant sowohl in der Ab- als auch in der Anwesenheit von Glucose verminderte (Abbildung 38).

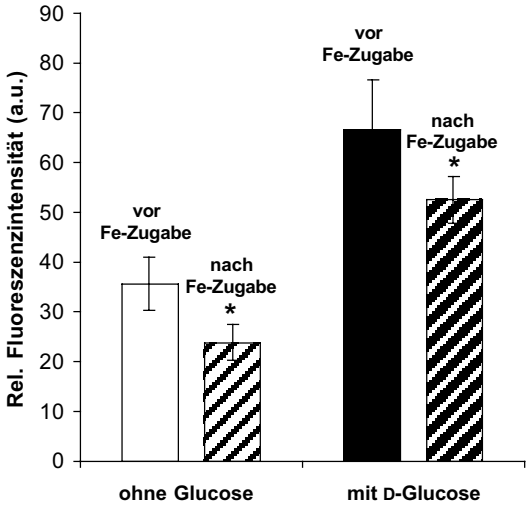


Abbildung 38: Effekt von Eisen auf den zellulären NAD(P)H-Gehalt
Auf Glasplättchen kultivierte L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer mit oder ohne Glucose vorinkubiert und die zelluläre Autofluoreszenz ($\lambda_{exc.}$ = 365 ± 12,5 nm, $\lambda_{em.}$ = 450-490 nm) mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop in einem Abstand von 2 Minuten gemessen. Nach 30 Minuten wurden 20 µM Eisen (als Fe(III)/8HQ) zugegeben. In der Abbildung sind die Werte direkt vor und 2 Minuten nach der Eisenzugabe dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 Experimenten. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation vor der Eisenzugabe.

2.2.7 EINFLUß VON ASCORBAT UND GLUTATHION AUF DIE EISENREDUKTION

Da NAD(P)H seinen Effekt auf die Eisenreduktion wahrscheinlich teilweise oder hauptsächlich über die Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbat, die bekanntermaßen Eisen reduzieren können [16], vermittelt, stellte sich die Frage, ob Eisenreduktion nicht nur (indirekt) über eine Erhöhung des zellulären NAD(P)H-Gehaltes, sondern auch durch eine direkte Erhöhung der Menge an zellulärem Ascorbat bzw. Glutathion zu beschleunigen ist. Tatsächlich führte in Abwesenheit von Glucose sowohl die Zugabe des membranpermeablen Glutathion-Ethylesters als auch eine Vorinkubation mit Ascorbat zu einer beschleunigten Eisenreduktion (Abbildung 39A), ein Hinweis darauf, daß beide, Glutathion und Ascorbat, als Reduktionsmittel fungieren können.

Wurden andererseits Zellen zusätzlich zu Glucose mit Ascorbat supplementiert, konnte kein weiterer Anstieg der Reduktionsgeschwindigkeit des Eisens beobachtet werden (Abbildung 39B). Auch beeinflußte eine Glutathion-Depletion durch eine Vorinkubation mit BSO (Abbildung 39C) oder die Verhinderung der Glutathion-Re-Reduktion durch Hemmung der Glutathionreduktase mit BCNU (Daten

nicht dargestellt) die Eisenreduktion weder in Ab- noch in Anwesenheit von Glucose signifikant. Dieses Fehlen jeglichen Effektes dieser Variationen in der Verfügbarkeit von Reduktionsmitteln impliziert, daß der entscheidende Faktor für die Eisenreduktion NAD(P)H ist und daß der finale Elektronenüberträger variabel sein kann.

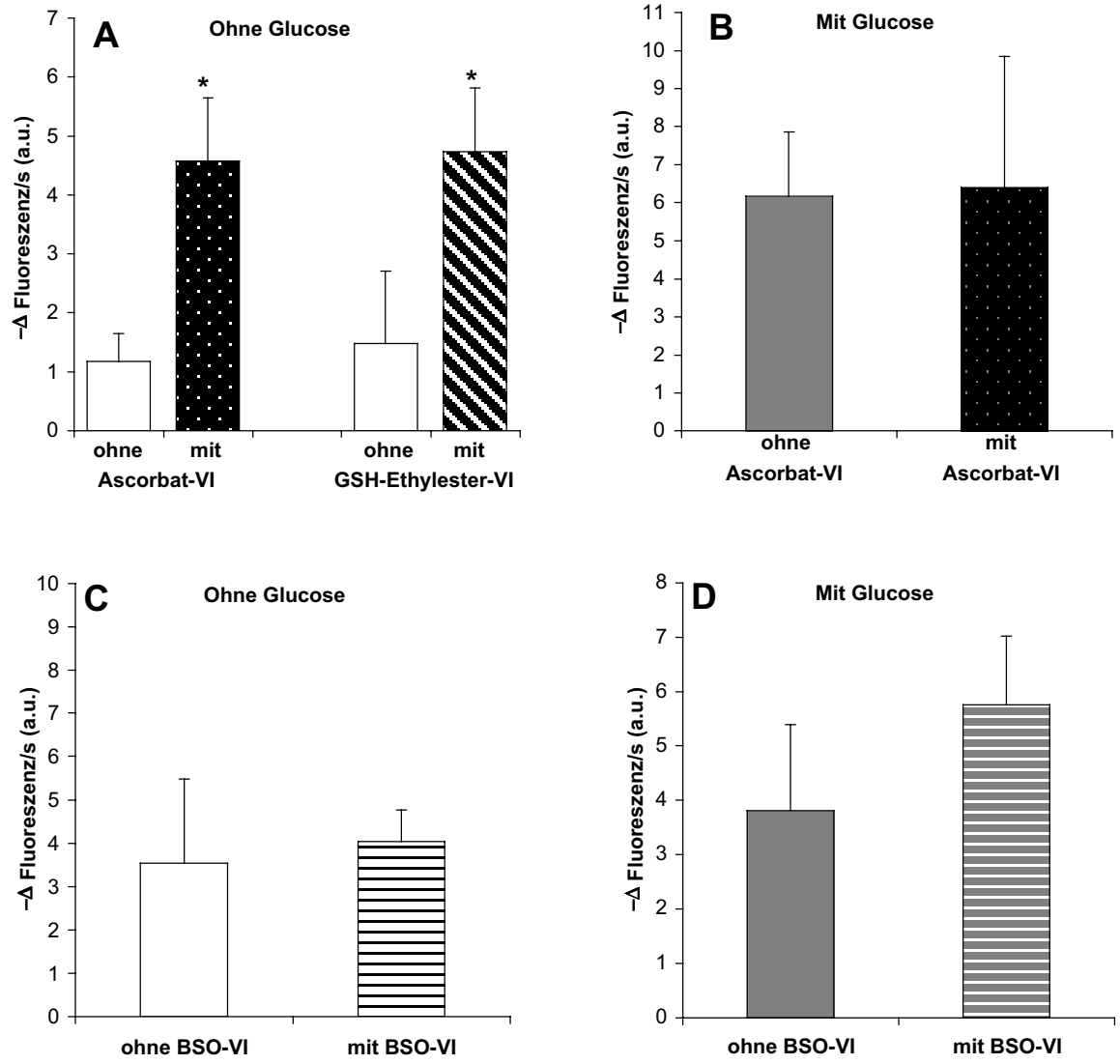


Abbildung 39: Effekt von Ascorbat und Glutathion auf die Geschwindigkeit der intrazellulären Eisenreduktion

Die Abbildung zeigt den initialen Fluoreszenzabfall von mit PhenGreen SK beladenen L929-Zellen nach Eisenzugabe (siehe auch Legende zu Abbildung 37) nach einer Vorinkubation (Vl) mit Ascorbat (24 h, 0,2 mM [A und B]), Glutathion-Ethylester (1 h, 4 mM [A]) und BSO (20 h, 0,5 mM [C und D]). In jedem Experiment wurden 10-15 Einzelzellen gemessen und alle Experimente an mindestens 2 verschiedenen Tagen wiederholt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 4 (A) bzw. 3 (B, C und D) Experimenten. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Zusatz.

2.2.8 EINFLUß VON REDUKTIONSMITTELN AUF DIE EISENTOXIZITÄT

Wenn die beschleunigte Eisenreduktion der Grund für die Verstärkung der Eisentoxizität durch Glucose ist, sollten andere zelluläre Reduktionsmittel, besonders die NAD(P)H-abhängigen Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbat, die ebenfalls in der Lage waren, die Eisenreduktion zu beschleunigen, auch einen ähnlichen Effekt auf die Eisentoxizität ausüben. Tatsächlich verstärkten sowohl eine Vorinkubation mit Glutathion-Ethylester als auch eine Vorinkubation mit dem unspezifischen SH-Gruppen-Donor *N*-Acetylcystein die Eisentoxizität in einem ähnlichen Maße wie Glucose (Abbildung 40). Glutathion selbst, das nicht membrangängig ist und somit als Kontrolle für mögliche extrazelluläre Effekte fungierte, hatte keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen (Daten nicht dargestellt). Weder eine Glutathion-Depletion durch BSO-Vorinkubation noch eine Hemmung der Glutathion-Reduktase durch BCNU eliminierten jedoch die durch Glucose hervorgerufene Toxizitätsverstärkung (Abbildung 40), ein Befund, der durch den fehlenden Effekt auf die Eisenreduktion erklärt werden kann (Abbildung 39; BCNU-Daten nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu Glutathion-Ethylester und *N*-Acetylcystein verursachte eine Vorinkubation der Zellen mit Ascorbat keine Erhöhung der Toxizität in Abwesenheit von Glucose (Abbildung 40), trotz des Faktes, daß die Eisenreduktion durch Ascorbat beschleunigt wurde. Zusätzlich zu Glucose angewendet bewirkte eine Ascorbat-Vorinkubation sogar einen partiellen protektiven Effekt gegen die starke Glucose-induzierte Toxizitätserhöhung. Im Gegensatz dazu führte eine Zugabe von Glucose zu Ascorbat-beladenen Zellen jedoch immer noch zu einer deutlichen Verstärkung der Eisentoxizität (Abbildung 40). Diese Befunde lassen sich wahrscheinlich dadurch erklären, daß Ascorbat als Anti- und als Prooxidans wirken kann. Der Effekt einer Vorinkubation mit Ascorbat wird hingegen eindeutig durch den Einfluß von Glucose überdeckt, ein Befund, der wiederum die zentrale Rolle des NAD(P)H herausstreicht.

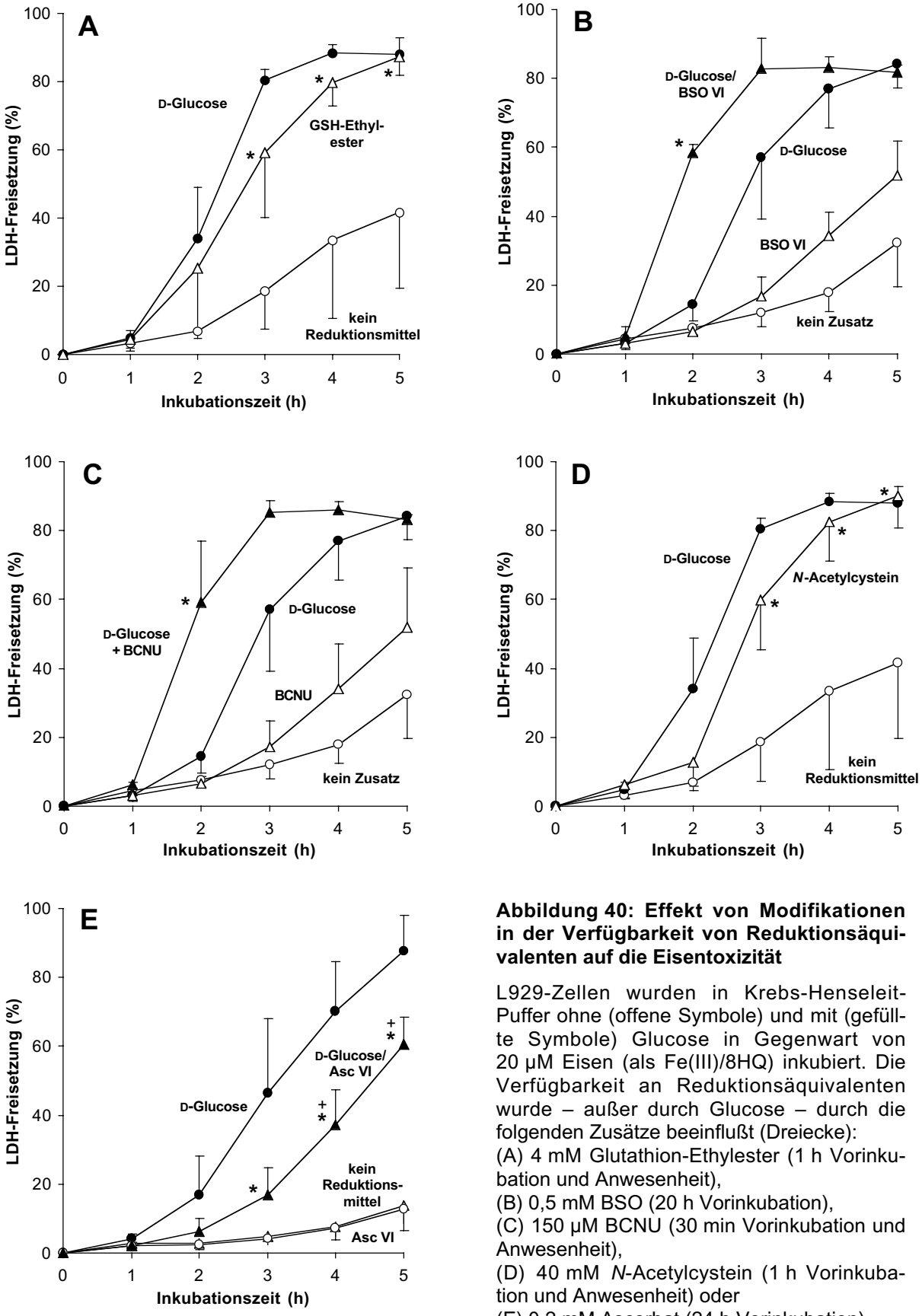


Abbildung 40: Effekt von Modifikationen in der Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten auf die Eisentoxizität

L929-Zellen wurden in Krebs-Henseleit-Puffer ohne (offene Symbole) und mit (gefüllte Symbole) Glucose in Gegenwart von 20 µM Eisen (als Fe(III)/8HQ) inkubiert. Die Verfügbarkeit an Reduktionsäquivalenten wurde – außer durch Glucose – durch die folgenden Zusätze beeinflußt (Dreiecke):
(A) 4 mM Glutathion-Ethylester (1 h Vorinkubation und Anwesenheit),
(B) 0,5 mM BSO (20 h Vorinkubation),
(C) 150 µM BCNU (30 min Vorinkubation und Anwesenheit),
(D) 40 mM *N*-Acetylcystein (1 h Vorinkubation und Anwesenheit) oder
(E) 0,2 mM Ascorbat (24 h Vorinkubation).
Die Zellschädigung wurde durch LDH-Freisetzung bestimmt. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 (B und C) oder 4 Experimenten. *Signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Zugabe von Reduktionsmittel, $^{+}$signifikant unterschiedlich zur Inkubation mit Glucose.

2.2.9 EISENTOXIZITÄT IN ANDEREN KULTIVIERTEN ZELLEN

L929-Zellen gehören als immortalisierte Fibroblasten zu den artifizielleren Zellkulturmodellen. Daher stellte sich die Frage, ob die hier beobachtete Verstärkung der Eisentoxizität durch die Zugabe von Glucose ausschließlich im hier verwendeten Modell zu beobachten war oder ob ein ähnlicher Effekt auch in anderen kultivierten Zellen auftrat. Hierzu wurden primäre Rattenhepatozyten und zwei Rattenleberendothelzellinien ebenfalls mit dem hier verwendeten Eisen/8-Hydroxychinolinkomplex inkubiert.

Abbildung 41 zeigt die Vitalität von Hepatozyten bei Zugabe des Eisenkomplexes in An- und Abwesenheit von Glucose. Deutlich erkennbar ist auch hier eine Verstärkung der Eisentoxizität durch die Zugabe von Glucose; allerdings ist sie nicht so stark ausgeprägt wie bei L929-Zellen.

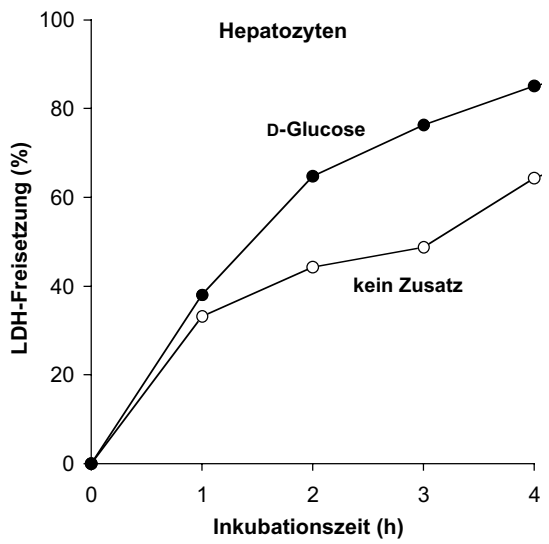


Abbildung 41: Eiseninduzierte Zellschädigung von Hepatozyten in An- und Abwesenheit von 10 mM D-Glucose
Primäre Rattenhepatozyten wurden für 4 h in Krebs-Henseleit-Puffer in Anwesenheit von 10 µM Fe(III)/8HQ ohne (○) und mit (●) 10 mM D-Glucose inkubiert und die Zellschädigung über die Freisetzung der cytosolischen LDH bestimmt (repräsentatives Experiment).

Die Untersuchung der eiseninduzierten Schädigung von zwei Rattenleberendothelzellinien gestaltete sich dagegen schwieriger: während der Kurvenverlauf in Anwesenheit von Glucose gut reproduzierbar war, variierte die Ausprägung der Schädigung in substratfreiem Puffer extrem stark (Abbildung 42 zeigt zwei beispielhafte Kurven).

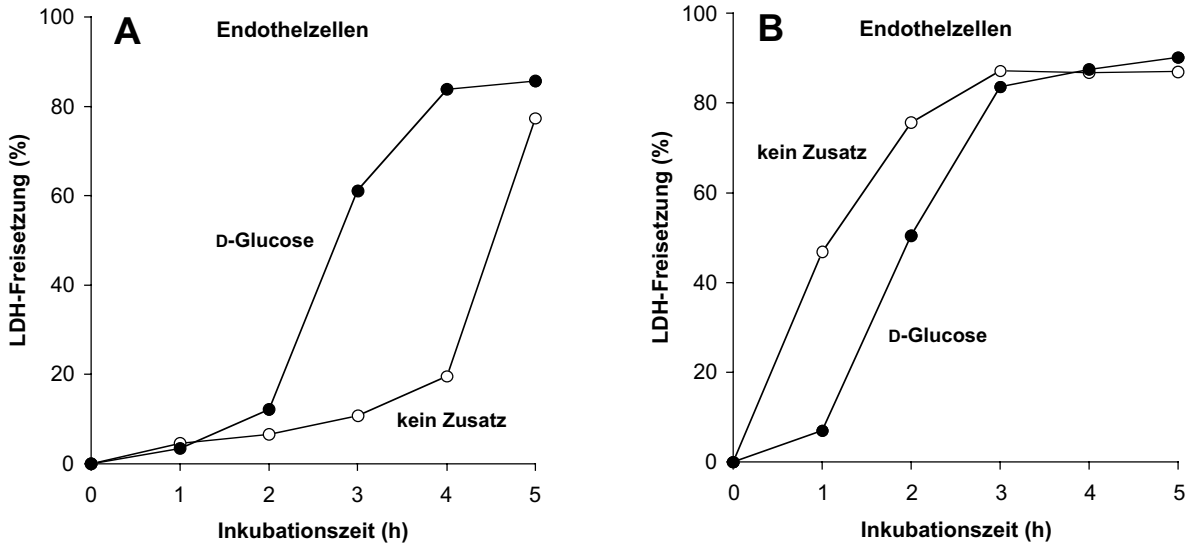


Abbildung 42: Variation der eiseninduzierten Schädigung von Rattenleberendothelzellen in Abwesenheit von Glucose
Die Abbildung zeigt die Schädigung von kultivierten Rattenleberendothelzellen in Krebs-Henseleit-Puffer nach Zugabe von 10 µM Fe(III)/8HQ mit (●) und ohne (○) 10 mM D-Glucose. Während der Verlauf der Schädigungskurve in Anwesenheit von Glucose nur leicht variiert, ist die Schädigung in Abwesenheit von Glucose sehr unterschiedlich ausgeprägt.

Erste Experimente deuteten darauf hin, daß die Zugabe von Glucose auch in Endothelzellen den zellulären Gehalt an NAD(P)H erhöht (Daten nicht dargestellt); aus experimentellen Gründen konnte der Anstieg jedoch nicht quantifiziert werden. Die Varianz im Schädigungsverlauf in Abwesenheit von Glucose könnte also ebenfalls über Veränderungen im Redoxstatus der Zellen erklärt werden; es ist beispielsweise bekannt, das der Redoxstatus mit Wachstumsphase oder Nahrungszustand von Zellen variieren kann [69-73].

Auch die schwache Ausprägung der Toxizitätsverstärkung durch Glucose in Hepatozyten paßt in das hier gezeichnete Bild, da Hepatozyten als Primärzellen nicht so stark auf Substrate zur Aufrechterhaltung ihres Redoxzustandes angewiesen sind wie immortalisierte Zellinien. Hierbei spielen wahrscheinlich zwei Faktoren eine wichtige Rolle: Hepatozyten haben einen sehr hohen Glykogengehalt, so daß sie auch in substratfreiem Puffer genügend Glucose zur Verfügung haben, und sie sind als Primärzellen, die sich in nahezu physiologischem Zustand befinden, nicht an Ascorbat verarmt, so daß Schwankungen in der reduktiven Kapazität leichter aufgefangen werden können.

2.2.10 KÄLTEINDUZIERTE VERSTÄRKUNG DER EISENTOXIZITÄT IN HEPATOZYTEN UND LEBERENDOTHELZELLEN

Eine Erhöhung der eiseninduzierten Zellschädigung in Hepatozyten und Leberendothelzellen konnte nicht nur durch Variation des Inkubationsmediums, sondern auch durch Veränderung der Inkubationstemperatur induziert werden: inkubierte man Hepatozyten oder Endothelzellen bei 4°C statt bei 37°C in Anwesenheit des Komplexes Fe(III)/8HQ, wurde die unter normalen Inkubationsbedingungen moderate Eisentoxizität deutlich verstärkt (Abbildung 43).

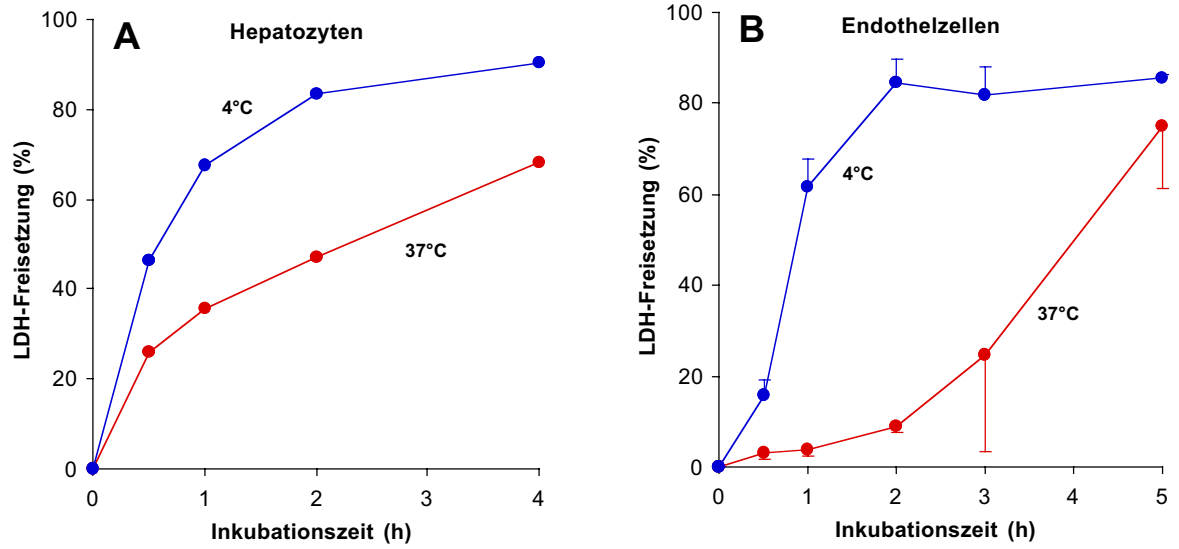


Abbildung 43: Einfluß der Temperatur auf die eiseninduzierte Zellschädigung in Hepatozyten (A) und Leberendothelzellen (B)
Nach einer Stunde Abkühlung jeweils in Zellkulturmedium (A: L-15, B: RPMI) wurden 5 µM (A) bzw. 10 µM (B) Eisen als Fe(III)/8HQ zugeben und die Zellen in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in Luft bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Schädigung der Zellen wurde über die LDH-Freisetzung bestimmt. Die in A gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ (1 Experiment mit Doppelwerten von 3 Experimenten); B zeigt Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 4 Experimenten.

Wie die meisten zellulären Prozesse werden auch viele Zellschädigungen in der Kälte verlangsamt, wozu z.B. die hypoxische Schädigung von Hepatozyten und LLC-PK1-Zellen [74] und die H_2O_2-induzierte Schädigung von Hepatozyten und Leberendothelzellen (T. Li, U. Rauen, unveröffentlichte Ergebnisse) gehören. Diese Verstärkung der Eisentoxizität in der Kälte könnte darauf hindeuten, daß die Kälte die eisenabhängige Schädigung ebenfalls über eine Erhöhung des zellulären Reduktionszustandes beeinflußt. Zur genaueren Untersuchung dieses Effektes wurden beide Zelltypen getrennt voneinander untersucht:

Hepatozyten:

Neben einer verstärkten Bereitstellung des redoxaktiven zweiwertigen Eisens können ROS-vermittelte Schädigungen auch durch eine Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes beeinflußt werden. Der Sauerstoffverbrauch von kultivierten Zellen ist bei 4°C geringer als bei 37°C. Daher wurde hier untersucht, ob der perizelluläre Sauerstoffpartialdruck eine Rolle bei der Erhöhung der Eisentoxizität spielt. Wurden die Hepatozyten also nicht in Ruhe, sondern unter ständigem Schütteln in der Wärme und in der Kälte inkubiert, wurde die zuvor gezeigte Sensitivierung nicht mehr beobachtet (Abbildung 43); die Schädigung war hier sogar bei den warm inkubierten Zellen stärker ausgeprägt als in den kalt inkubierten.

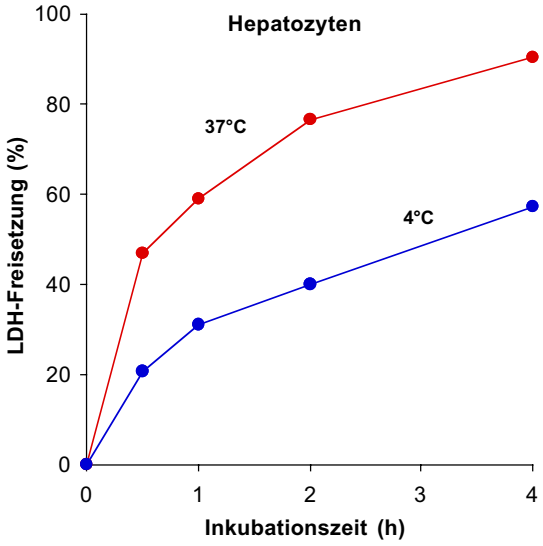


Abbildung 44: Temperaturabhängigkeit der eiseninduzierten Schädigung in Hepatozyten bei ständiger Durchmischung des Inkubationsmediums
Hepatozyten wurden unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Legende zu Abbildung 43), jedoch unter ständigem leichten Schütteln der Kulturgefäße bei 37°C und bei 4°C inkubiert und die Schädigung der Zellen wiederum durch die Freisetzung der LDH bestimmt (repräsentatives Experiment von 3 Experimenten).

Eine Erklärung hierfür ist in der starken metabolischen Aktivität der Hepatozyten zu suchen: sie verbrauchen bei 37°C sehr schnell einen großen Teil des im Medium gelösten Sauerstoffs und erniedrigen damit den perizellulären pO_2, wodurch sich im Medium ein Sauerstoffkonzentrationsgradient bildet – mit der niedrigsten Sauerstoffkonzentration in direkter Nachbarschaft der Zellen und der höchsten an der Flüssigkeitsoberfläche –, was wiederum zu einer Verminderung von ROS-vermittelten Schädigungen wie der hier untersuchten führen kann. In der Kälte, wo der gesamte Stoffwechsel verlangsamt wird, findet diese Verminderung des perizellulären pO_2 nicht bzw. sehr viel langsamer statt; dadurch ist der Gradient nicht so stark ausgeprägt und es steht mehr Sauerstoff zur Verfügung, was die resultierende ROS-abhängige Zellschädigung erhöht. Gleicht man die Gradientenbildung – also die Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes in der unmittelbaren

zellulären Umgebung – durch Durchmischen des Mediums aus, wird der erwartete Schädigungsverlauf erhalten. Die Sensitivierung für Eisen bei 4°C läßt sich also komplett über den höheren perizellulären Sauerstoffpartialdruck erklären und es gibt in Hepatozyten keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Redoxstatus.

Endothelzellen:

Auch hier wurde die Abhängigkeit der Schädigung von der Sauerstoffsättigung des Mediums untersucht; da die hier verwendeten Endothelzellen jedoch – wie die meisten Zellinien – ihre Energie größtenteils glykolytisch gewinnen und dadurch einen sehr niedrigen Sauerstoffverbrauch haben, wurde erwartungsgemäß kein signifikanter Unterschied der Zellschädigung in ruhenden und geschüttelten Kulturen festgestellt. Auffällig war dagegen, daß die deutliche und signifikante Steigerung der Toxizität in der Kälte nur in Anwesenheit von Glucose, also in Krebs-Henseleit-Puffer mit Glucose oder in Zellkulturmedium, reproduzierbar war. Zusammen mit den im Vergleich von substratfreiem/glucosesupplementiertem erhaltenen Ergebnissen (Abschnitt 2.2.10) deutete dieser Befund tatsächlich auf einen Einfluß des Redoxstatus der Zellen, der in Anwesenheit von Substrat im Inkubationsmedium zugunsten der reduktiven Seite verschoben ist, bei dieser Schädigung hin.

Die Messung des Redoxstatus über den Marker NAD(P)H gestaltete sich jedoch bei den Inkubationsbedingungen schwierig, da die Fluoreszenz des reduzierten NAD(P)H sehr stark temperaturabhängig war. Daher wurde der NAD(P)H-Gehalt der Zellen enzymatisch bestimmt: es konnte kein Unterschied in der NAD(P)H-Menge pro mg Protein gefunden werden (4°C: 1,40 nmol/mg Protein, 37°C: 1,43 nmol/mg Protein). Entsprechend wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Trotz dieses Ergebnisses kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Sensitivierung der Zellen durch die Kaltinkubation möglicherweise dennoch über den Redoxstatus vermittelt wurde; aufgrund der problematischen mikroskopischen Messung konnte beispielsweise nicht beobachtet werden, ob eine Veränderung der Kompartimentierung des reduzierten NAD(P)H bei der Kaltlagerung (mitochondrial/cytosolisch) eintritt, was ebenfalls zu einer veränderten Redoxkapazität der Zellen führen könnte. Ebensowenig konnte bei den hier verwendeten Ansätzen beurteilt werden, ob die chemische Umgebung des NAD(P)H, also z.B. die assoziierten Liganden, durch die Kälte beeinflußt wurden.

3. DISKUSSION

Kultivierte Zellen wie die hier hauptsächlich verwendete Fibroblastenzellinie L929 stellen ein gutes, wenn auch artifizielles, Modellsystem für die Untersuchung komplexer zellulärer Vorgänge dar. Besonders die Untersuchung eines Einflusses des Redoxzustandes wird dadurch vereinfacht, daß die Zellen nur geringe Glykogenspeicher besitzen, eine niedrige Stoffwechselaktivität haben und auch an Reduktionsmitteln wie Ascorbat stark verarmt sind. Daher kann der zelluläre Redoxstatus sehr einfach durch die Zugabe eines Substrates (D-Glucose) verändert werden. In den meisten Fällen sorgt eine Versorgung mit Substrat für eine Verbesserung der Verteidigungskapazität der Zellen, wie auch hier bei der H_2O_2-induzierten Schädigung beobachtet werden konnte. Erstaunlicherweise bot sich bei der rein eiseninduzierten Schädigung jedoch ein vollständig anderes Bild: die von Fe(III)/8HQ ausgeübte Toxizität wurde durch die Zugabe von D-Glucose zum Inkubationsmedium dramatisch verstärkt. Die hier gezeigten Daten deuten stark darauf hin, daß dieser Anstieg der Toxizität durch eine verstärkte Reduktion (und Re-Reduktion) des dreiwertigen Eisens innerhalb der Zelle durch eine erhöhte Verfügbarkeit zellulärer Reduktionsäquivalente vermittelt wird.

Um Eisentoxizität durch eine Manipulation des zellulären chelatisierbaren Eisenpools und nicht durch einen extrazellulären Angriff auf die Plasmamembran zu induzieren, wurden die Zellen mit Hilfe des Komplexes Fe(III)/8HQ mit Eisen beladen. Die Bindung an das relativ kleine und lipophile 8-Hydroxychinolin machte das Eisen membranpermeabel und erlaubte so die strikt regulierte zelluläre Eisenaufnahme zu umgehen, wohingegen Eisensalze wie Eisen(III)chlorid, Eisen(II)-sulfat und Eisen(II)ammoniumsulfat oder Eisen gebunden an Nitrilotriessigsäure nicht mit vergleichbarer Geschwindigkeit in die Zelle eindringen konnten (Experimente in isolierten Hepatozyten [13] und U. Rauen, F. Petrat, H. de Groot, zur Veröffentlichung eingereicht) und auch – im Gegensatz zu dem membranpermeablen Eisenkomplex – keine nennenswerte Toxizität in L929-Zellen induzierten (siehe auch Abbildung 28).

Die Bestimmung der Größe des intrazellulären chelatisierbaren Eisenpools (für eine Übersicht siehe [15]) ist bereits sehr schwierig und die Bestimmung des Redoxzustandes des chelatisierbaren Eisens ist sogar noch problematischer. ESR-Spektroskopie, die einzige bisher beschriebene Methode, die es erlaubt, zwischen

dreiwertigem und – durch die Zugabe von spezifischen Chelatoren, die das Gleichgewicht verschieben – zweiwertigem Eisen zu unterscheiden, ist in der Literatur für Gesamtzellmessungen nur für Bakterien [12] und Hefen [75] beschrieben. In Säugetierzellen wurden diese Messungen bislang ausschließlich an Homogenaten durchgeführt. Während der Probenpräparation für diese Messungen (Homogenisierung gefolgt von Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wie beschrieben in [7, 76-78]) ist die Gefahr einer artifiziellen Oxidation des zweiwertigen Eisens sehr groß. Außerdem kann, wie auch hier gezeigt, durch ESR-Spektroskopie nur eine „Momentaufnahme“ des Redoxzustandes gemacht werden, und weder die Beobachtung von schnellen Änderungen der Oxidationsstufe noch Messungen in lebenden Zellen sind möglich. Genauso können fast alle Methoden, die auf dem Gebrauch von spezifischen Chelatoren für zwei- und dreiwertiges Eisen basieren [6, 7, 78-81], nur an Zellhomogenaten angewendet werden, in denen das Fe(II)/Fe(III)-Verhältnis, das in lebenden Zellen vorliegt, nicht aufrechterhalten wird. Fluoreszenzindikatoren bilden eine attraktive Alternative, da sie sensitiv sind und die Anwendung in lebenden Zellen erlauben. So ist für den Fluoreszenzfarbstoff Calcein vor einigen Jahren beschrieben worden, daß er für die Bestimmung zweiwertigen chelatisierbaren Eisens geeignet sei [82, 83]; neuere Studien warfen jedoch Zweifel an der Spezifität dieses Assays auf [15, 84] und es wurde sogar vorgeschlagen, Calcein als Indikator für dreiwertiges Eisen einzusetzen [84]. Wir entwickelten hier einen methodischen Ansatz, der auf der unterschiedlichen Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffes PhenGreen SK bei Bindung von zwei- und dreiwertigem Eisen basiert; dieser Ansatz erlaubt, die intrazelluläre Reduktion von Eisen in vitalen Zellen „online“ und auf Einzelzellebene darzustellen.

Mit dieser neuen Herangehensweise konnten wir zeigen, daß das in die Zelle eindringende dreiwertige Eisen intrazellulär zu zweiwertigem Eisen reduziert wird (Abbildungen 36 und 37). Dieser Befund wird durch Beobachtungen in der Literatur gestützt, die beschreiben, daß – unter physiologischen Bedingungen – der größte Teil des zellulären chelatisierbaren Eisens in der zweiwertigen Oxidationsstufe vorliegt [11, 12]. Die Reduktion des Eisens wurde durch die Anwesenheit von Glucose stark beschleunigt. Da die daraus resultierende erhöhte Verfügbarkeit von zweiwertigem Eisen wahrscheinlich die Produktion von reaktiven und zellschädigenden Spezies in Fenton-ähnlichen Reaktionen und damit auch die Re-Oxidation des zweiwertigen Eisens in den dreiwertigen Zustand verstärkt, ist es naheliegend, daß Glucose nicht nur die initiale Reduktion des in die Zelle eindringenden Eisens

beschleunigt, sondern auch das anschließende „Redox-Turnover“ des Eisens verstärkt. Dieser Schluß wurde auch durch die Ergebnisse der ESR-Messung bestätigt, die keinen signifikanten Unterschied in der „Steady-State“-Konzentration an dreiwertigem Eisen zeigten.

Die Agenzien, die im allgemeinen für die zelluläre Reduktion von Eisen verantwortlich gemacht werden, sind die NAD(P)H-abhängigen Reduktionsmittel Ascorbat und Glutathion. Ascorbat ist bekanntermaßen ein sehr starkes extra- und intrazelluläres Reduktionsmittel für dreiwertiges Eisen. In Kombination mit Eisen(III) wird es häufig benutzt, um extrazellulär oxidierende Eisen(II)-Systeme zu bilden (wie z.B. das „Udenfriend“-System [16]) und es wird normalerweise auch als das primäre intrazelluläre Reduktionsmittel für Eisen beschrieben. Nach Beladung von L929-Zellen mit Ascorbat konnte auch tatsächlich eine Beschleunigung der Eisenreduktion im hier verwendeten System beobachtet werden. Diese Zellinie besitzt jedoch unter physiologischen Bedingungen nur sehr geringe Konzentrationen an Ascorbat (weniger als 0,1 nmol pro mg Protein [C.-D. Badrakhan, M. Kirsch, H. de Groot, unveröffentlichte Daten], was einer Konzentration von < 12 µM – bei einem angenommenen Verhältnis von ~ 8,5 µl/mg Protein [85-87] – entspricht). Diese geringen Ascorbatgehalte sind auch für andere Zellinien beschrieben [88, 89]. Daher ist es unwahrscheinlich, daß Ascorbat – trotz seines hohen Reduktionspotentials – bei normalen Kulturbedingungen das Hauptreduktionsmittel in unserem experimentellen System ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Beschleunigung der Eisenreduktion in Anwesenheit von Glucose darauf zurückzuführen ist, daß das zelluläre Ascorbat schneller und besser regeneriert wird und damit in ausreichender Menge für die Reduktion zur Verfügung steht. Gegen diese These spricht allerdings der Befund, daß das zusätzlich zur Verfügung gestellte Ascorbat in Anwesenheit von Glucose keine weitere Beschleunigung der Reduktion induzierte (Abbildung 39B).

Reduziertes Glutathion ist ebenfalls in der Lage, Eisen, das an die verschiedensten zellulären Liganden gebunden ist, zu reduzieren. Wir konnten hier zeigen, daß (intrazelluläres) Glutathion sowohl die Eisenreduktion beschleunigen (Abbildung 39A) als auch die Eisentoxizität erhöhen kann (Abbildung 40A). Es ist – wie in der Einleitung beschrieben – bekannt, daß Glucose das GSH/GSSG-Verhältnis in L929-Zellen erhöhen und die Aufrechterhaltung dieses Verhältnisses unter oxidativen Bedingungen stark verbessern kann [53], Effekte, die höchstwahrscheinlich auf einer verstärkten Verfügbarkeit von NADPH beruhen. Bei einem GSH-Gehalt von 1,35 ±

0,50 nmol pro 10^5 Zellen [53] (bei einem angenommenen Zellvolumen von 3,5 pl [85-87] äquivalent zu einer Konzentration von ungefähr 4 mM) ist die Wahrscheinlichkeit, daß GSH das Hauptreduktionsmittel für die intrazelluläre Eisenreduktion in unserem System ist, sehr hoch. Einschränkend ist jedoch zu bedenken, daß eine Glutathion-Depletion in Anwesenheit von Glucose keinen Einfluß auf die Reduktionsgeschwindigkeit von Eisen hatte (Abbildung 39D), und daß weder die Glutathion-Depletion durch BSO noch die Hemmung der Glutathion Re-Reduktion durch BCNU den verstärkenden Effekt von Glucose auf die Eisentoxizität (Abbildung 40B und C) eliminierten, was den Schluß zuläßt, daß zumindest ein von Glutathion unabhängiger Elektronendonor zu dem verstärkenden Effekt von Glucose beiträgt.

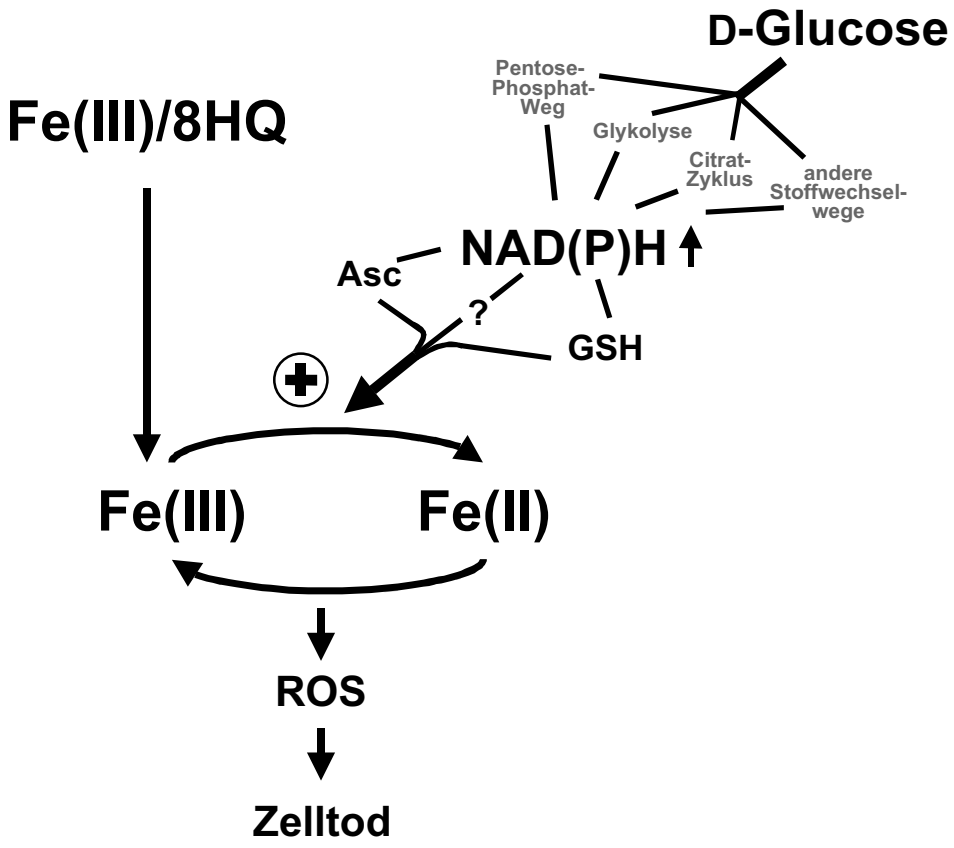
Beide Reduktionsmittel, GSH und Ascorbat, hängen schlußendlich von NAD(P)H als Elektronendonor ab; außerdem scheint die Eisenreduktion eng mit der NAD(P)H-Oxidation verknüpft zu sein. Zusätzlich sollte auch ein direkter Elektronentransfer von NAD(P)H zum Eisen in Betracht gezogen werden. Das Ein-Elektronen-Redoxpotential von NAD(P)H ist (in wäßriger Lösung und unter Standardbedingungen) positiver als das von Glutathion (-0,3 V vs -0,9 V [16, 90]); theoretisch ist aber eine Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) möglich, wie auch für die fentonabhängige DNA-Schädigung in *in vitro*-Systemen beschrieben wurde [91, 92]. In zellulären Systemen werden Redox-Potentiale durch verschiedenste Faktoren beeinflußt, aber auch hier erscheint eine direkte Reduktion von Eisen durch NAD(P)H möglich; ein solcher Mechanismus wurde als wichtiger Faktor in der H_2O_2-Toxizität in *E. coli* beschrieben [67, 93]. Eine potentielle Rolle von NAD(P)H als direktes Reduktionsmittel im hier vorliegenden System wird durch den Befund gestützt, daß die Zugabe von Glucose und der dadurch hervorgerufene Anstieg des NAD(P)H-Gehaltes ausreicht, um die Eisenreduktion zu beschleunigen und die Eisentoxizität stark zu verstärken, unabhängig davon, ob weitere zelluläre Reduktionsmittel erhöht (Zusatz von Ascorbat) oder vermindert (Glutathion-Depletion durch BSO) werden. Neben dieser direkten Reaktion ist ein Elektronentransfer von NAD(P)H über Enzyme oder Cofaktoren vorstellbar und sogar wahrscheinlich [94].

Auch wenn alle drei Reduktionsmittel an der Eisenreduktion beteiligt sein können, ist der relative Beitrag jedes einzelnen wahrscheinlich beeinflußt durch Änderungen im zellulären Umfeld und abhängig vom Wachstumszustand der Zelle und den experimentellen Bedingungen, da die Redoxpotentiale besonders in komplexen zellulären Systemen von vielerlei Faktoren wie der Menge an Reduktions-

mittel, der Metallkonzentration oder der intrazellulären chemischen Umgebung, wie dem pH-Wert und den an das Metall gebundenen Liganden, abhängen. Entsprechend ist es möglich, daß Ascorbat, das wegen seiner niedrigen Konzentration das unwahrscheinlichste Hauptreduktionsmittel in unserem System ist, in anderen Zelltypen das wichtigste ist. Alle möglichen Szenarien erfordern jedoch NAD(P)H als zentralen Elektronenverteiler, d.h. daß die Eisenreduktion unabhängig vom direkten Reduktionsmittel auf jeden Fall von einer Metabolisierung von Glucose beeinflußt wird.

Die cytotoxischen Effekte einer erhöhten Verfügbarkeit von chelatisierbarem Eisen wurden hier bei einer Zellschädigung ohne einen primären Anstieg der Bildung von $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ untersucht, eine Art der Zellschädigung, die möglicherweise von einer direkten Reaktion von molekularem Sauerstoff mit Eisen – wie von Qian und Büttner [95] vorgeschlagen – verursacht wird. Eine ähnlich veränderte Eisenreduktion, die von der Verfügbarkeit von NAD(P)H abhängt, könnte jedoch auch andere Arten von eisenabhängigen oder eisenvermittelten Schädigungen wie die H_2O_2-induzierte Zellschädigung (s.u.) beeinflussen.

In experimentellen Modellen für oxidative Zellschädigungen wie dem vorliegenden ist eine erhöhte antioxidative Kapazität nicht nur kein Vorteil für die Zelle, sondern kann sogar der Grund für eine schwere und rapide Schädigung sein. Wenn Antioxidantien als Reduktionsmittel wirken können und so den „Redox-Turnover“ von katalytisch aktiven Übergangsmetallen, deren reduzierte Form an Reaktionen beteiligt ist, die aggressive oxidierende Spezies bilden, erhöhen, wird möglicherweise ein prooxidativer Effekt durch einen Anstieg der reduktiven Kapazität der Zelle verursacht (siehe auch Schema 2). Solch ein paradox scheinender Mechanismus wurde auch für Ascorbat in Kombination mit Eisen [16, 96] und für Thiol-Reagenzien, besonders Glutathion und Cystein, beschrieben, die sowohl eine Eisencytotoxizität [97] als auch die Toxizität von Selen [98] und die kupferabhängige DNA-Schädigung in zellfreien Systemen [99] erhöhen können, wahrscheinlich ebenfalls durch ein beschleunigtes „Redox-Turnover“. Ähnlich wie bei den als *Prooxidantien* fungierenden *Antioxidantien* erscheint es auf den ersten Blick paradox, daß mehr *Reduktions*äquivalente *oxidativen* Streß erhöhen können; dieser Effekt kann jedoch durch die beschleunigte Erzeugung des schädigenden zweiwertigen Eisens und den erhöhten Redoxzyklus, wie in Schema 2 dargestellt, erklärt werden.



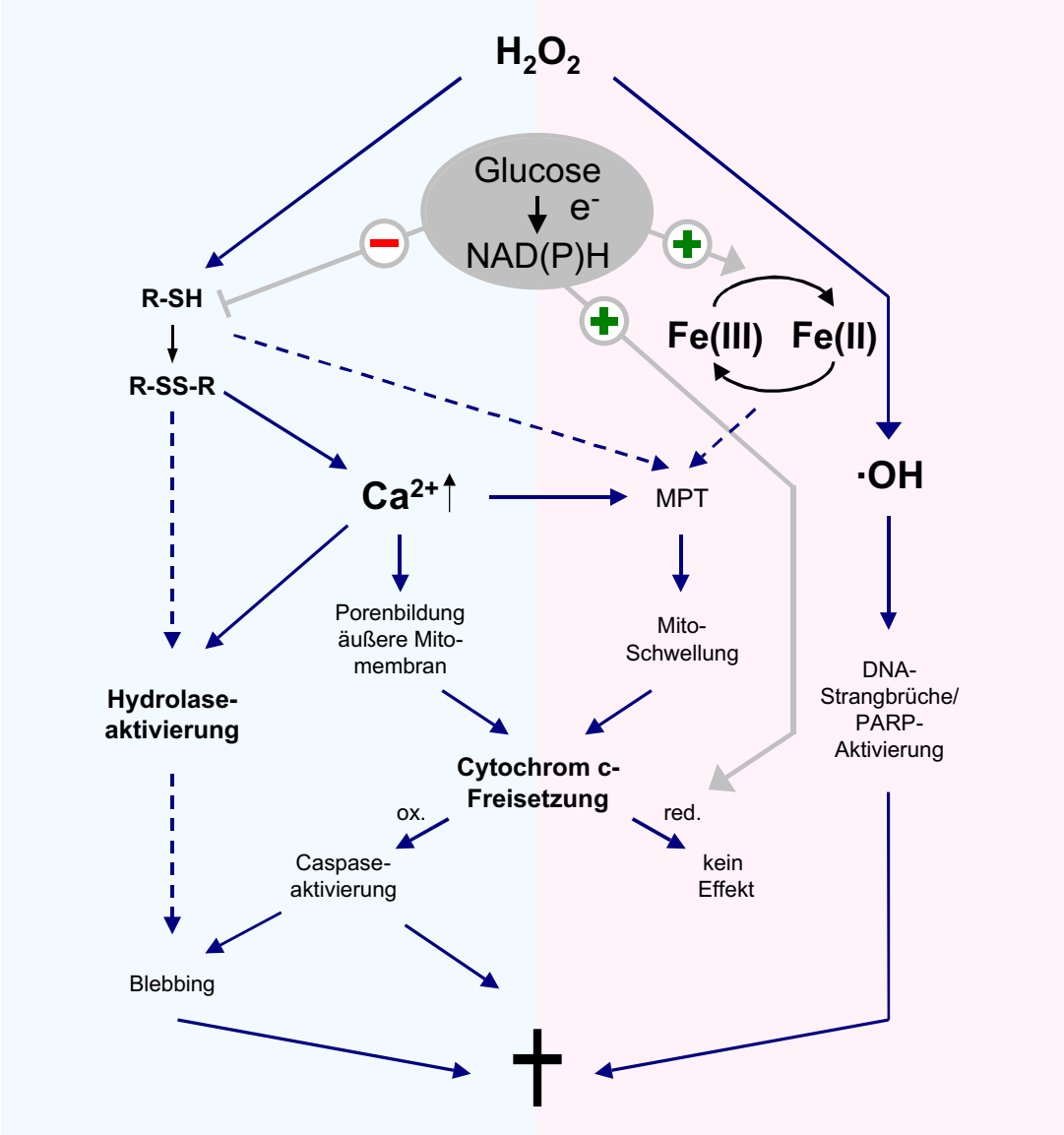
Schema 2: Vorgeschlagener Mechanismus für die glucoseinduzierte Verstärkung der Eisentoxizität
Nach dem Eintritt in die Zelle wird das dreiwertige Eisen (zugegeben als membranpermeabler Komplex aus $FeCl_3$ und 8-Hydroxychinolin, Fe(III)/8HQ) zu zweiwertigem Eisen reduziert, durch die Teilnahme an ROS-bildenden Reaktionen wieder re-oxidiert und anschließend zum zweiwertigen Zustand re-reduziert. Dieser Redoxzyklus wird beschleunigt durch die Zugabe von D-Glucose, deren Metabolisierung den zellulären Gehalt des zentralen Elektronen„providers" NAD(P)H erhöht. Die schlußendliche Reduktion des dreiwertigen Eisens kann durch Glutathion (GSH), Ascorbat (Asc) und möglicherweise sogar durch NAD(P)H selbst erfolgen.

Trotz des eher artifiziellen Modellsystems kultivierter, immortalisierter Fibroblasten, das zur Aufklärung des beschriebenen Mechanismus diente, scheint der hier gefundene Effekt generellerer Natur zu sein: eine ähnliche Toxizitätsverstärkung konnte unter bestimmten Bedingungen auch in kultivierten Rattenleberendothelzellen – die zwar als Zellinie geführt werden, jedoch noch ein relativ hohes Maß an Differenzierung besitzen – und sogar an primären Rattenhepatozyten, die praktisch noch im „physiologischen" Zustand vorliegen, durch die Zugabe von Glucose induziert werden.

Während die Zugabe von Glucose und damit ein erhöhter NAD(P)H-Gehalt bei der eiseninduzierten Schädigung eine toxizitätsverstärkende Wirkung hatte, bewirkte die Anwesenheit von Glucose bei der H_2O_2-induzierten Schädigung eine ausgeprä-

te Verlangsamung des Zelluntergangs. Dieser Schutzeffekt war weder auf einen verstärkten H_2O_2-Abbau durch Glucose noch auf eine Reaktion des H_2O_2 mit anderen extrazellulären Komponenten zurückzuführen [53]. Ein ähnlicher Schutzeffekt durch Glucose wurde auch für die H_2O_2-induzierte Schädigung von Rat-1-Fibroblasten [54] und andere Schädigungsauslöser in diversen Zellinien berichtet, unter anderem für die Alloxan-induzierte Hamster-β-Zell-Schädigung [100], die NO-basierte Schädigung einer humanen Endothelzellinie aus dem Dickdarm [101] und die MPP^+-vermittelte Apoptose in PC 12-Zellen [102].

Die H_2O_2-induzierte Schädigung von L929-Zellen basiert, wie von Lomonosova et al. gezeigt wurde [53], auf einem calcium- und einem eisenabhängigen Mechanismus, wobei der calciumabhängige Weg bei substratfreier Inkubation schneller abläuft als der eisenabhängige. Das zentrale Element des calciumabhängigen Mechanismus ist dabei die Oxidation verschiedener SH-Gruppen von essentiellen Calciumtransportsystemen im endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien und der Plasmamembran [45, 103]; die dadurch induzierten Sekundäreffekte sind sehr vielfältig und prägen die morphologische Erscheinung der Schädigung (s.u.). Die eisenabhängige Schädigungskomponente basiert auf der Bildung von OH-Radikalen aus H_2O_2 und zweiwertigem Eisen in der Fenton-Reaktion; auch der morphologische Verlauf der Schädigung unterscheidet sich stark von dem unter substratfreien Bedingungen (s.u.). Eine Veränderung des zellulären Redoxzustandes, wiederum durch die Zugabe von Glucose induziert, wirkt sich auf beide Teile der Schädigung aus: wird die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten durch die Zugabe von Glucose zum Inkubationsmedium verbessert und die Konzentration des Elektronenverteilers NAD(P)H erhöht, wird die SH-Gruppen-Oxidation vermindert, was dazu führt, daß der Calciumeinstrom ins Cytosol stark verlangsamt wird, also die calciumabhängige Komponente der Schädigung gehemmt ist. Gleichzeitig wird durch die erhöhte Konzentration an NAD(P)H nach dem in Schema 2 dargestellten Mechanismus die (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens beschleunigt. Dies verstärkt den eisenabhängigen Schädigungsweg, so daß in Anwesenheit von Glucose der eisenabhängige Mechanismus die Ausprägung der Zellschädigung bestimmt (Schema 3).



Schema 3: Dualität der Mechanismen der H_2O_2-induzierten Zellschädigung in L929-Zellen
Die Schädigung von L929-Zellen durch H_2O_2 kann durch einen calciumabhängigen und einen eisenabhängigen Mechanismus erfolgen. In Abwesenheit von Glucose (linke Seite, blau unterlegt) tragen beide Teile zur Schädigung bei, wobei der calciumabhängige Weg deutlich schneller ist. Dieser Teil der Schädigung ist von einem starken Calciumanstieg geprägt, der jedoch – entgegen der klassischen Apoptosetheorie – keine MPT auslöst. Die folgenden morphologischen Veränderungen (Blebbing, Zellschrumpfung, Kerndeformation) hängen jedoch möglicherweise dennoch mit einer Cytochrom c-Freisetzung zusammen, die durch eine Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran ermöglicht wird. Auch der eisenabhängige Weg trägt in Abwesenheit von Glucose zur Zellschädigung bei. In Anwesenheit von Glucose (rechte Seite, rot unterlegt) wird dieser eisenabhängige Mechanismus durch eine erhöhte Verfügbarkeit von zweiwertigem Eisen deutlich verstärkt, während der calciumabhängige durch die verbesserte antioxidative Kapazität der Zelle gehemmt wird, so daß in Anwesenheit von Glucose der eisenabhängige Mechanismus der Hauptschädigungsweg ist. Auch hier steigt jedoch das cytosolische Calcium an und induziert im Zusammenspiel mit anderen Faktoren eine MPT mit anschließender Schwellung der Mitochondrien und der Freisetzung von Cytochrom c, das jedoch, durch die verbesserte reduktive Kapazität der Zelle, in reduzierter Form keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen ausübt.

Die morphologische Erscheinungsform des Zelluntergangs wird, wie schon erwähnt, ebenfalls stark vom zellulären Redoxzustand geprägt. Die Zugabe von H_2O_2 in Abwesenheit von Glucose, also unter oxidativen Bedingungen, verursacht die

Induktion morphologischer Veränderungen, die typischerweise einen apoptotischen Schädigungsweg charakterisieren, darunter starkes Membranblebbing, Abschnürung der „Blebs“ unter Einschluß intakter Organellen (Mitochondrien), Schrumpfung der Zellen und Deformation der Zellkerne (unveröffentlichte Ergebnisse). Eine solche Zellschädigung beinhaltet – nach klassischer Theorie – auch das Einsetzen des mitochondrialen Permeabilitätsüberganges, was zum Anschwellen der Mitochondrien und der daraus resultierenden Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren wie z.B. AIF führt. Diese Proteine können dann die Caspase-Kaskade auslösen, die die Bildung von apoptotischen Körperchen, eine DNA-Fragmentierung und schließlich den Zelltod induziert. Obwohl die hier untersuchte Zellschädigung in Abwesenheit von Glucose eindeutig Merkmale zeigt, die durch die Freisetzung von Cytochrom c ausgelöst werden – wie die Abschnürung apoptotischer Körperchen und Hinweise auf eine Zerstörung des Zellkerns –, fehlt jeglicher Hinweis auf eine mitochondriale Schwellung, die unausweichliche Folge einer MPT. Nach allgemeiner Theorie ermöglicht jedoch erst diese Schwellung, verursacht durch eine Entfaltung der Christae der inneren und anschließende Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, die Freisetzung des im Intermembranraumes lokalisierten Cytochrom c. Dinsdale und Martinou [104, 105] bieten jedoch ein von der MPT unabhängiges Modell an, in dem die Cytochrom c-Freisetzung unter Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie durch die Bildung einer spezifischen Pore in der äußeren Mitochondrienmembran unter Erhalt des mitochondrialen Membranpotentials ermöglicht wird. Daß diese Beschreibung möglicherweise auch für das hier verwendete Modellsystem zutrifft, wird von dem Befund gestützt, daß Mitochondrien mit intaktem Membranpotential innerhalb der apoptotischen Körperchen gefunden werden können.

Im Gegensatz dazu zeigt der morphologische Verlauf der eisenabhängigen Schädigungskomponente, also die Zellschädigung unter stärker reduktiven Bedingungen in Anwesenheit von Glucose, eine extreme Schwellung der Mitochondrien ohne weitere apoptotische Kennzeichen. Eine Aktivierung von Effektor-Caspasen als Ursache für den Zelluntergang ist daher unwahrscheinlich; trotzdem ist eine Cytochrom c-Freisetzung, betrachtet man das Ausmaß der mitochondrialen Schwellung (die wahrscheinlich – aufgrund des fehlenden Membranpotentials schon in der Anfangsphase der Schwellung – nicht auf einer Megamitochondrienbildung [106], sondern auf einer „klassischen“ MPT beruht), wahrscheinlich. Auch dieses schein-

bare Paradoxon ist möglicherweise auf einen Einfluß der verbesserten reduktiven Kapazität der Zellen in Anwesenheit von Glucose zurückzuführen: Hancock et al. [107] postulierten, daß Cytochrom c nur dann die Aktivierung von Caspase 9 bzw. die Bildung des Apoptosoms auslösen kann, wenn das Häm-Eisen in oxidierter Form vorliegt, und zeigten, daß in *in vitro*-Experimenten die Zugabe von Cytochrom c in der reduzierten Form keinen Effekt ausübte. Ähnlich dem Mechanismus der eiseninduzierten Zellschädigung könnte Glucose also auch hier durch die Erhöhung der Verfügbarkeit von NAD(P)H oder Glutathion das freigesetzte Häm-Eisen im Cytochrom c reduzieren und damit für die Zelle unschädlich machen. Gestützt wird diese These auch durch die Chelatisierungsexperimente: eine Calciumchelatisierung vermindert die mitochondriale Schwellung – bei moderatem Schutzeffekt auf die Vitalität – deutlich, während eine Eisenchelatisierung zwar den Zelltod vollständig verhindert, die Schwellung jedoch überhaupt nicht beeinflußt. Damit basiert die mitochondriale Schwellung also auf einem vom Zelluntergang unabhängigen Mechanismus. Was genau den Zelltod durch die Inkubation mit H_2O_2 in Anwesenheit von Glucose auslöst, konnte hier nicht im Detail aufgeklärt werden. Yamamoto et al. [108] fanden jedoch starke Hinweise darauf, daß der wesentlichste Faktor der Schädigung von L929-Zellen in Anwesenheit von Substrat (Versuche in Zellkulturmedium) die eisenabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen und die resultierende Aktivierung von Poly(ADP-Ribose)Polymerase ist, die bei proliferierenden Zellen fatale Auswirkungen haben kann.

Die hier gezeigten Ergebnisse modifizieren und ergänzen das in [53] entworfene Bild der H_2O_2-Schädigung. Während Lomonosova et al. Glucose als Schalter betrachteten, die durch die Beeinflussung des Glutathionspiegels den Schädigungsmechanismus von einem rein calciumabhängigen in einen rein eisenabhängigen umschaltet, deuten die fast gleich starken Schutzeffekte von Calcium- und Eisenchelatoren in Abwesenheit von Glucose jedoch eher auf ein Zusammenspiel der Mechanismen mit einer calcium- und einer eisenabhängigen Komponente unter substratfreien Bedingungen hin. Daher hat ein „Shift“ des zellulären Redoxzustandes durch die Zugabe von Glucose keine Schalterfunktion, sondern führt zu einer Hemmung des calciumabhängigen apoptotischen Anteils der Zellschädigung bei gleichzeitiger Verstärkung der eisenabhängigen Schädigung (siehe auch Schema 3).

Die Expression von Bcl-2 in einem Modellsystem wie dem hier verwendeten hätte zur Klärung wichtiger und interessanter Fragen in Bezug sowohl auf die eisen- als auch auf die H_2O_2-induzierte Schädigung beitragen können. Leider war, wie schon in Kapitel 2.1.6 besprochen, der durch die Transfektion und die anschließende Selektion der Klone sowie die schlußendliche Regulation der Expression ausgeübte Streß auf die Zellen so extrem, daß ein normaler Zellzyklus nicht mehr ablaufen konnte. Die hier gewonnenen Erkenntnisse lassen es generell sehr fraglich erscheinen, ob sich mit einem derart veränderten Zellsystem überhaupt allgemeine Aussagen zu komplexen zellbiologischen Vorgängen treffen lassen. Besonders in einem so vielfältig regulierten Bereich wie der Redoxregulation der Zellen erscheint dies unmöglich und sollte auch in der Literatur sehr kritisch beurteilt werden.

In den hier vorgestellten Systemen ist ein Einfluß der zellulären Redoxkapazität auf den Redoxzustand des chelatisierbaren Eisens und damit eine Beeinflussung der oxidativen Zellschädigung von zentraler Bedeutung für den Mechanismus bzw. das Auftreten des Zelltodes. Da chelatisierbares Eisen auch in anderen Modellen der Zellschädigung wie der kälteinduzierten Schädigung von Rattenleberendothelzellen und Rattenhepatozyten [109] als Schlüsselfaktor diskutiert wird, erscheint es sinnvoll, auch hier den Einfluß des „Redoxcyclings“ des Eisens und damit der Verfügbarkeit von zweiwertigem Eisen auf den Zelluntergang zu untersuchen. Die hier gezeigten ersten Untersuchungen zur kälteinduzierten Sensitivierung von Leberendothelzellen gegen die durch Eisen/8-Hydroxychinolin induzierte Schädigung schließen beispielsweise ein durch die Kälte erhöhtes Redoxcycling des Eisens als entscheidenden pathophysiologischen Faktor nicht aus.

Eine Verbesserung des zellulären Redoxstatus kann also unter bestimmten Bedingungen für die Zelle ein „zweischneidiges Schwert“ sein: während eine erhöhte Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten in Mechanismen, die auf Vorgängen wie einer SH-Gruppen-Oxidation beruhen, antioxidative (und damit protektive) Effekte ausüben kann, kann sie in eisenabhängigen Prozessen prooxidativ und damit schädigend wirken. Dadurch kann es in Abhängigkeit des zellulären Redoxstatus zu einer Verschiebung der relativen Bedeutung verschiedener an der Schädigung beteiligter Prozesse und, wie bei der H_2O_2-induzierten Schädigung, zu einer Veränderung der morphologischen Ausprägung dieser Schädigung kommen.

Auch in anderen als den hier verwendeten Modellen der H_2O_2- und der eiseninduzierten Zellschädigung könnte, abhängig von der Beteiligung redoxaktiver

Substanzen wie Metallionen oder auch einiger redoxcyclingfähiger xenobiotischer Agenzien, die Verfügbarkeit von Substrat zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten oder eine auf einem anderen Mechanismus basierende verbesserte reduktive Kapazität der Zellen ein entscheidender Faktor für den Verlauf, die Ausprägung und möglicherweise sogar den Mechanismus einer Zell- oder Gewebeschädigung sein. Der zelluläre Redoxzustand sollte entsprechend bei der Entwicklung von Modellsystemen und der Begutachtung und Interpretation von Ergebnissen als nicht-unwesentlicher Faktor in die Überlegungen eingeschlossen werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des zellulären Redoxstatus, modifiziert durch die Zugabe von D-Glucose, auf die H_2O_2-induzierte Zellschädigung von L929-Fibroblasten untersucht. War bei Inkubation in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten begrenzt, trugen ein schneller, stark ausgeprägter calciumabhängiger Mechanismus mit deutlichem Membranblebbing und ein langsamerer eisenabhängiger Mechanismus zur Zellschädigung bei. Wurde die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten durch die Zugabe von D-Glucose zum Inkubationspuffer erhöht, wurde die gesamte Schädigung verlangsamt, wobei der calciumabhängige Anteil der Schädigung gehemmt und der eisenabhängige verstärkt wurde, wodurch unter anderem die morphologische Erscheinungsform des Zellunterganges verändert wurde.

Zur Aufklärung dieser durch einen verbesserten zellulären Redoxzustand verstärkten Eisenabhängigkeit wurde der Einfluß des Redoxzustandes auf eine rein eiseninduzierte Schädigung in L929-Zellen untersucht. Dazu wurde der chelatisierbare Eisenpool von L929-Zellen experimentell durch Zugabe des membrangängigen Komplexes aus Eisen(III)chlorid und 8-Hydroxychinolin (1:2; „Fe(III)/8HQ“) erhöht. Diese Erhöhung verursachte in Abwesenheit von Glucose einen signifikanten Vitalitätsverlust. Durch Zugabe von Glucose konnte dieser Vitalitätsverlust deutlich verstärkt und beschleunigt werden; ein solcher Effekt wurde weder von L-Glucose noch von Desoxyglucose ausgeübt. Die Sauerstoffabhängigkeit der Schädigung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Glucose und Messungen mit dem oxidationssensitiven Farbstoff Dichlorodihydrofluorescein zeigten, daß die Schädigung auf der Bildung oxidierender Sauerstoffspezies beruhte, die in Anwesenheit von Glucose verstärkt wurde. Zur Überprüfung einer Beteiligung von durch die Metabolisierung von Glucose verstärkt gebildeten Reduktionsäquivalenten wurde NAD(P)H fluoreszenzmikroskopisch und enzymatisch bestimmt; diese Messungen ergaben einen 1,5- bzw. 2-fachen Anstieg des zellulären NAD(P)H-Gehaltes nach Glucosezugabe. Die Vermutung, daß die intrazelluläre Eisenreduktion durch diese erhöhte zelluläre Reduktionskapazität verstärkt wurde, wurde mit Hilfe des Fluoreszenzindikators PhenGreen SK verifiziert. Da die Fluoreszenz dieses Farbstoffes durch die Bindung von zweiwertigem Eisen stark gequencht und durch dreiwertiges Eisen praktisch nicht beeinflußt wird, konnte anhand des Fluoreszenzabfalles

PhenGreen-beladener Zellen die Bildung von zweiwertigem Eisen sichtbar gemacht und durch Bestimmung der Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalles auch – erstmals in vitalen Zellen und auf Einzelzellebene – die Reduktionsgeschwindigkeit des Eisens gemessen werden. Durch diese Meßmethode konnte gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der intrazellulären Reduktion des zugegebenen Eisens durch die Zugabe von D-Glucose mehr als verdoppelt wurde, während weder L-Glucose noch Desoxyglucose einen signifikanten Einfluß auf die Eisenreduktion hatten. Eine ähnliche Beschleunigung wurde auch durch Zugabe der Reduktionsmittel Ascorbat und Glutathion (letzteres als membranpermeabler Ethylester) erzielt. Auch die Erhöhung der Reduktionskapazität der Zellen durch Glutathion-Ethylester und den SH-Gruppen-Donor *N*-Acetylcystein verstärkte die eiseninduzierte Zellschädigung. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Toxizitätsverstärkung durch Glucose auf einer beschleunigten Reduktion von Eisen, vermittelt durch den zentralen Elektronenverteiler NAD(P)H, basierte, die zu einer erhöhten Verfügbarkeit des fentonreaktiven zweiwertigen Eisens führte, das durch die Teilnahme an ROS-bildenden Reaktionen oxidativen Streß induzierte. Durch die Beschleunigung der anschließenden Re-Reduktion des Eisens wurde dieser Redoxzyklus – und damit der oxidative Streß – verstärkt. Ähnliche Effekte konnten auch in Rattenhepatozyten und ansatzweise in Rattenleberendothelzellen beobachtet werden.

Dieser Mechanismus des beschleunigten „Redoxcyclings“ und der damit erhöhten Verfügbarkeit von zweiwertigem, fentonreaktivem Eisen kann auch die Verstärkung des eisenabhängigen Anteils der H_2O_2-induzierten Schädigung erklären, die damit – zusammen mit der durch Glucose vermittelten Hemmung des calciumabhängigen Schädigungsweges – in Anwesenheit von Glucose den überwiegenden Anteil der H_2O_2-induzierten Schädigung von L929-Zellen ausmachte. Ein verbesserter zellulärer Redoxzustand kann also – je nach Art des Schädigungsmechanismus – antioxidative und damit protektive oder aber prooxidative und schädigende Auswirkungen haben.

5. EXPERIMENTELLES

5.1 MATERIALIEN

5.1.1. CHEMIKALIEN

CHEMIKALIEN	BEZUGSQUELLE
N-Acetylcystein	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	BioRad, Richmond, USA
Agarose (QualexGold)	Hybaid-AGS, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Bcl-2-Antikörper (polyclonal, Kaninchen)	StressGen, Victoria, Kanada
Antimycin A	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bcl-2 Peptid	StressGen, Victoria, Kanada
BCNU (1,3-bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff, Carmustin)	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	BioRad, Richmond, USA
BSO (L-Buthioninsulfoximin)	Sigma, Deisenhofen
Calcein Acetoxymethylester	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon)	Sigma, Deisenhofen
Chelex (chelatisierendes Harz; Iminodiessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cyclosporin A (CsA)	Sandoz, Nürnberg
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid/ Cetyltrimethylammoniumbromid)	Sigma, Deisenhofen
2-Desoxyglucose	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Serva, Heidelberg
Dichlorodihydrofluorescein (DCHF)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
2,2´- und 4,4´-Dipyridyl	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
DMSO	Merck, Darmstadt
T4-DNA-Ligase,	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
DNA-Polymerase I, Klenow Fragment	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
dNTP-Mix	Qiagen, Hilden
Doxycyclin	Sigma, Deisenhofen
DTNB (5,5´-Dithiobis[2-nitrobenzoesäure])	Sigma, Deisenhofen

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eisen(II)ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Eisen(II)citrat	Merck, Darmstadt
Eisen(III)chlorid	Sigma, Deisenhofen
Eisen(III)nitrat	Merck, Darmstadt
Fibronectin	Roche, Mannheim
fötales Kälberserum	Sigma, Deisenhofen
Geneticin	Life Technologies, Eggenstein
Gentamicin	Serva, Heidelberg
D-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glutamatdehydrogenase	Roche, Mannheim
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Glutathion (oxidierte Form, GSSG)	Sigma, Deisenhofen
Glutathion (reduzierte Form, GSH)	Sigma, Deisenhofen
Glutathion-Ethylester (reduzierte Form)	Sigma, Deisenhofen
Glutathionreduktase	Roche, Mannheim
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Merck, Darmstadt
8-Hydroxychinolin (8HQ)	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	ICN, Eschwege
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
α-Ketoglutarat	Roche, Mannheim
Kollagen	Serva, Heidelberg
LipofectAMINE® Transfektionsreagenz	Life Technologies, Eggenstein
Luciferase Reporter Gene Assay	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Minimum Essential Medium (MEM) Eagle	Sigma, Deisenhofen
MitoTracker Green	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
MOPS	Merck, Darmstadt
NADH, Dinatriumsalz	Roche, Mannheim
NADPH, Tetranatriumsalz	Roche, Mannheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Sigma, Deisenhofen
NTA (N,N´-bis[Carboxymethyl]glycin Dinatriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
NucleoSpin Plasmid Minipräparationskit	Macherey-Nagel, Düren
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Pfu DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
PhenGreen SK, Dinatriumsalz und Diacetat	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Phenol	Roth, Karlsruhe

PMSF	Sigma, Deisenhofen
PVDF-Membranen	Promega, Madison, USA
Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC), Ammoniumsalz	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat	Roche, Mannheim
Quin-2 Acetoxymethylester	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Restiktionsenzyme, diverse	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
RPMI-1640	Gibco, Eggenstein
SDS	Serva, Heidelberg
Taq DNA Polymerase und Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
TEMED	Gibco, Eggenstein
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Trifluoperazin (Tfp)	Sigma, Deisenhofen
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton® X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco, Eggenstein
2-Vinylpyrolidin	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxidlösung, 33%ig	Aldrich, Steinheim
WesternBreeze™ Immunodetection Kit	Invitrogen, Paisley, UK

5.1.2 GERÄTE UND GEBRAUCHSMATERIALIEN

MATERIALIEN	BEZUGSQUELLE
Glasplättchen	Assistent, Sondheim/Rhön
Falcon®-Zellkulturgefäße	Becton-Dickinson, Heidelberg
Gasmischungen	Messer-Griesheim, Krefeld
modizifierte Pentz-Kammern	Technisches Zentrallabor, Uni-Essen
WesternBreeze™ Immundetektions-Kit	Invitrogen, Paisley, UK

GERÄTE	HERSTELLER
Axiovert 135 TV	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 100 M	Zeiss, Oberkochen
Axiotech IM 35	Zeiss, Oberkochen
RF-1501 Spektrofluorometer	Shimadzu, Kyoto, Japan
Thermocycler	Perkin-Elmer, Zaventem, Belgien
ACP (Analysenautomat Computergesteuert Programmierbar)	Eppendorf, Hamburg
ARGUS 50 Image Processor (Chemolumineszenz)	Hamamatsu, Herrsching
ESP 300E X-Band Spektrometer	Bruker Bio-Spin, Rheinstetten
MiniPROTEAN II Elektrophoresezubehör	BIO-RAD, Richmond, USA

5.1.3 ZUSAMMENSETZUNG DER HÄUFIG VERWENDETEN LÖSUNGEN UND PUFFER

HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution)
137 mM NaCl
5,4 mM KCl
1,0 mM $CaCl_2$
0,5 mM $MgCl_2$
0,4 mM KH_2PO_4
0,3 mM Na_2HPO_4
25 mM HEPES
pH 7,4

KH (Krebs-Henseleit-Puffer)
115 mM NaCl
25 mM $NaHCO_3$
5,9 mM KCl
1,2 mM $MgCl_2$
1,2 mM NaH_2PO_4
1,2 mM Na_2SO_4
2,5 mM $CaCl_2$
20 mM HEPES
pH 7,35

Trypanblau-Lösung
(50x Stammlösung)
4,0 g/l Trypanblau
1,5 g/l NaCl

LDH-Meßpuffer
0,2 mM NADH
0,6 mM Pyruvat
in 50 mM Kaliumphosphatpuffer

LB-Medium
1% (w/v) Bacto-Trypton
1% (w/v) NaCl
0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
auf pH 7,2 bis 7,5 einstellen

5.2 METHODIK

5.2.1 ZELLKULTUR

Zellen der murinen Fibroblastenzellinie L929 (American Type Culture Collection, NCTC Klon 929, strain L) wurden in mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiertem MEM in 75 cm^2-Zellkulturflaschen in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 95% Luft und 5% CO_2 kultiviert; die

Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung (0.25% Trypsin in Citratsaline) subkultiviert. Für alle Versuche wurden die Zellen 48 Stunden vor Beginn des Experimentes in einer Dichte von $2x10^4$ Zellen/cm^2 auf unbeschichtete Kulturgefäße eingesetzt. Mit Bcl-2 transfizierte L929-Zellen wurden in Anwesenheit von 400 µg Geneticin und 200 µg Hygromycin pro ml Medium kultiviert. Vor Ansetzen der Versuche wurden die Zellen gesplittet und die eine Hälfte für mindestens 48 Stunden zusätzlich mit 1 µg Doxycyclin pro ml Medium inkubiert.

Rattenhepatozyten wurden aus männlichen Wistar-Ratten isoliert wie beschrieben [110] und in L-15 Medium, supplementiert mit 5% FCS, L-Glutamin (2 mM), Glucose (8,3 mM), BSA (0,1%), Natriumbicarbonat (14,3 mM), Gentamicin (50 mg/l) und Dexamethason (1 µM), bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (5% CO_2 in Luft) auf kollagenbeschichteten Gefäßen kultiviert. Zwei Stunden nach dem Einsetzen wurden die nicht-angehefteten Zellen durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Hepatozyten wurden für 24 Stunden vor Beginn der Experimente kultiviert.

Zwei aus männlichen Wistar-Ratten etablierte Rattenleberendothelzellinien [111] wurden ebenfalls für Experimente eingesetzt. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit FCS (20%), L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (50 Units/ml bzw. 50 µg/ml) und Dexamethason (1 µM), inkubiert und durch Trypsinisierung subkultiviert, wobei die Zellen für die Experimente 1:3 gesplittet und in kollagenbeschichtete Fläschchen oder auf fibronectinbeschichtete Glasplättchen eingesetzt wurden. Die Experimente wurden am 6. oder 7. Tag nach der Subkultivierung mit konfluenten Zellen gestartet. In dieser Arbeit wurden Zellen der 10. bis 35. Passage verwendet.

Vitalitätsversuche wurden in 12.5 cm^2-Zellkulturflaschen durchgeführt. Für alle mikroskopischen Messungen wurden die Zellen auf Glasplättchen (6.2 cm^2) kultiviert; für die enzymatischen NAD(P)H-Messungen wurden Petrischalen von 175 cm^2 und für die ESR-Ansätze Kulturschalen von 225 cm^2 verwendet.

5.2.2 CYTOTOXIZITÄT

A) ANSÄTZE

VERSUCHE MIT H_2O_2

L929-Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend 30 Minuten in Krebs-Henseleit-Puffer in Anwesenheit von 100 µM DTPA mit oder ohne 10 mM

D-Glucose inkubiert. Trifluoperazin (5 µM), Cyclosporin A (1 µM), Quin-2-AM (10 µM), 2,2´-DPD und 4,4´-DPD (100 µM), GSH (4 mM) und *N*-Acetylcystein (40 mM) wurden, wie angegeben, ebenfalls 30 Minuten vor Beginn der Experimente zugegeben und waren während der Inkubationszeit anwesend. Die H_2O_2-Stammlösungen wurden – in KH-Puffer mit DTPA – frisch angesetzt und auf Eis aufbewahrt. H_2O_2 wurde als Bolus zugegeben und die Zellen maximal 6 Stunden inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Aufnahme oder Freisetzung der cytosolischen Lactat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt.

VERSUCHE MIT EISEN

L929-Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit KH-Puffer (2,5 ml) bedeckt. Wo angegeben wurde der Puffer mit 10 mM D-Glucose, L-Glucose oder 2-Desoxyglucose supplementiert. Eisen wurde aus einer frischen Stammlösung (Fe(III)/8HQ-Komplex mit 10 mM Eisen/20 mM 8-Hydroxychinolin in DMSO) 30 Minuten nach Zugabe des jeweiligen Puffers zugegeben. *N*-Acetylcystein (40 mM), BCNU (150 µM), Glutathion-Ethylester (4 mM) und Glutathion (4 mM) wurden 30 Minuten vor Beginn der Experimente dem Zellkulturmedium zugesetzt und waren während der Messung anwesend. Ascorbat (0,2 mM) und BSO (0,5 mM) wurden dem Zellkulturmedium 24 Stunden (Ascorbat) bzw. 20 Stunden (BSO) vor Beginn der Experimente zugesetzt. Hypoxische Bedingungen wurden durch Sättigung der Inkubationslösungen mit Gasmischungen der Zusammensetzung 5% CO_2 und 0%, 2% oder 5% Sauerstoff (wie angegeben) in Stickstoff vor Zugabe zu den Zellen erreicht; anschließend wurden die Kulturflaschen vorsichtig – durch die Verschlußstopfen durchbohrende Kanülen – mit den gleichen Gasmischungen gespült (beschrieben in [110]). Der Spülvorgang wurde bei jeder Probennahme wiederholt. Die Schädigung der Zellen wurde durch LDH-Freisetzung bestimmt.

Hepatozyten wurden dreimal, Leberendothelzellen zweimal mit HBSS gewaschen und ebenfalls mit KH-Puffer oder Zellkulturmedium bedeckt. Die Zugabe des Eisenkomplexes erfolgte entsprechend dem Vorgehen bei L929-Zellen. Für die Untersuchung der Kältesensitivierung wurden die Zellen eine Stunde vor Beginn des Experimentes in mit 5% CO_2/95% Luft gefüllten gasdichten Behältern bei 4°C inkubiert. Auch hier erfolgte die Bestimmung der Zellschädigung durch Messung der LDH-Freisetzung.

B) BESTIMMUNG DER VITALITÄT DER ZELLEN

LDH-FREISETZUNG

Die Vitalität der Zellen wurde durch Messung der extra- und intrazellulären Lactat-Dehydrogenase- (LDH-)Aktivität mit einem Standard-Assay bestimmt. Hierzu wurde zu jedem angezeigten Zeitpunkt die freigesetzte LDH gemessen und am Ende der Inkubationszeit die intrazelluläre LDH-Aktivität nach einer Lyse der Zellen durch das Detergenz Triton® X-100 (1% in HBSS, 30 Minuten bei 37°C) bestimmt. Die LDH-Werte wurden um die Änderung des Inkubationsvolumens durch die wiederholte Probennahme korrigiert und die freigesetzte LDH-Aktivität wurde prozentual der Gesamt-LDH-Aktivität angegeben.

TRYPANBLAU-AUFNAHME

Vitalitätsfarbstoffe wie beispielsweise Trypanblau können intakte Zellmembranen nicht passieren. Wird die Plasmamembran jedoch zerstört, kann der Farbstoff ins Zellinnere eindringen und färbt den Zellkern blau. Für die Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau wurden dem Inkubationspuffer 80 mg/l Trypanblau zugesetzt und im Lichtmikroskop der Anteil der blaugefärbten Zellkerne bestimmt. Es konnte auch bei langer Inkubationszeit kein Einfluß der Anwesenheit von Trypanblau auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden.

5.2.3 MIKROSKOPISCHE METHODEN

A) PHASENKONTRASTAUFNAHMEN

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden in KH-Puffer mit und ohne Glucose inkubiert wie beschrieben. Nach 30 Minuten wurde H_2O_2 zugesetzt und die Zellmorphologie zu den angegebenen Zeitpunkten auf einem Phasenkontrast-mikroskop begutachtet. Die ursprüngliche Vergrößerung aller gezeigten Bilder war 1000fach.

B) FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden wie beschrieben in KH-Puffer mit 500 nM Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) und 1 µM Calcein-AM oder mit 500 nM MitoTracker Green für 30 Minuten unter Zellkulturbedingungen vorinkubiert (Abbildung 44 zeigt die Strukturen der verwendeten Farbstoffe). Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurde frischer KH-Puffer mit und ohne Glucose und nach

30minütiger Inkubation 250 µM H_2O_2 als Bolus zugegeben. Die mitochondriale Morphologie wurde mit einem inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Axiovert 100M, Zeiss, Oberkochen), ausgerüstet mit einem Argon- und einem Helium/Neon-Laser, untersucht (MitoTracker Green und Calcein: $\lambda_{exc.}$ = 488 nm, $\lambda_{em.}$ = 505-530 nm; TMRM: $\lambda_{exc.}$ = 543 nm, $\lambda_{em.} \geq$ 585 nm). Während der gesamten Messungen mit TMRM wurde allen Lösungen eine Erhaltungsdosis TMRM von 200 nM zugegeben.

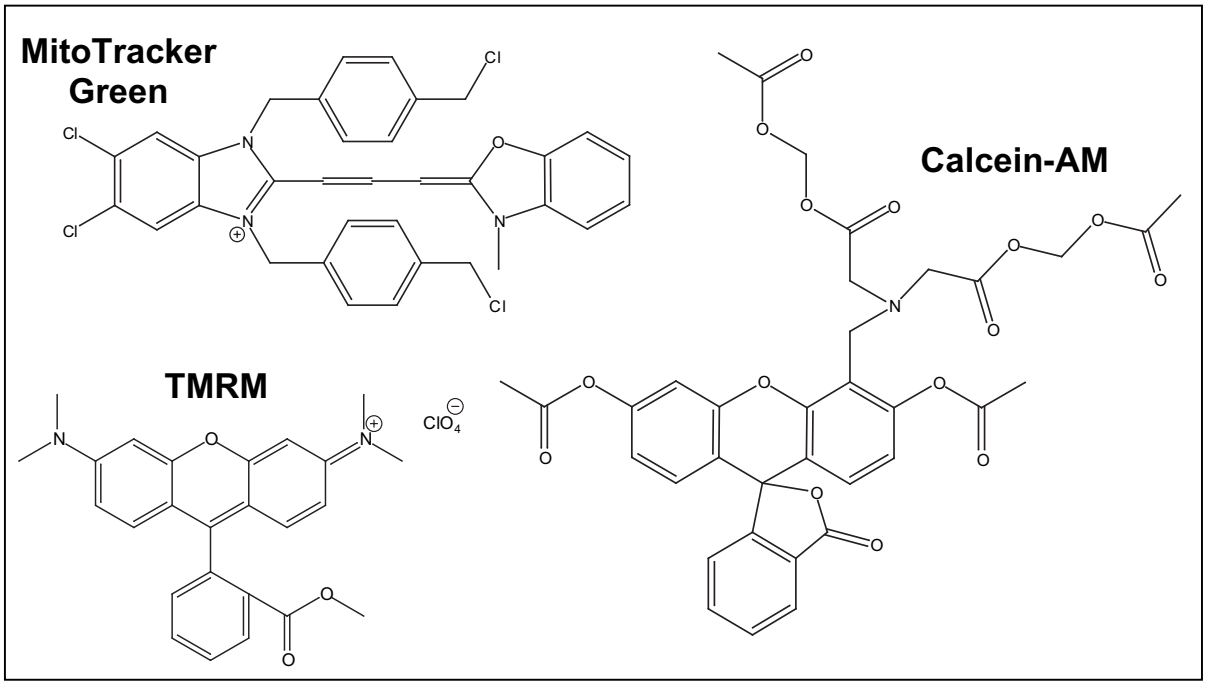


Abbildung 44: Strukturen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe
(TMRM = Tetramethylrhodamin-Methylester, AM = Acetoxymethylester)

5.2.4 NAD(P)H-MESSUNGEN

A) FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE MESSUNGEN

Nach dem Transfer der Glasplättchen mit den Zellen in eine modifizierte Pentz-Mikroskopkammer wurden die Zellen zweimal mit warmem HBSS gewaschen und mit 1,25 ml Puffer bedeckt. Wie angegeben wurden die Zellen entweder direkt nach dem Waschen oder nach einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten für die Messung verwendet. Während der Messung wurden die Zellen in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in Luft gehalten und die Mikroskopplatte auf 37°C temperiert. Die Autofluoreszenz ($\lambda_{exc.}$= 365 ± 12,5 nm und $\lambda_{em.}$= 450-490 nm) wurde mit einem mit der Attofluor Imaging Software (Atto Instruments, Rockville, MD) ausgestatteten inversen digitalen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV, Zeiss, Oberkochen) auf Einzelzellebene

bestimmt. Die Emission wurde alle 2 Minuten gemessen; kürzere Intervalle wurden vermieden, um die lichtinduzierte Oxidation von NAD(P)H zu vermeiden. Glucose und Eisen wurden während der Messung aus Stammlösungen (1 M Glucose, 20 mM Fe/40 mM 8HQ) zugesetzt.

B) ENZYMATISCHE MESSUNGEN MIT GLUTAMATDEHYDROGENASE UND α-KETOGLUTARAT

Die Zellen wurden zweimal mit warmem HBSS-Puffer gewaschen und 30 Minuten in 35 ml Krebs-Henseleit-Puffer mit oder ohne Glucose bei Kulturbedingungen inkubiert. Die Zellyse wurde nach einem modifizierten Protokoll aus [112] durchgeführt: nach dem Bedecken der Zellen mit 1 ml warmem HBSS wurden die Zellen von der Kulturschale geschabt, resuspendiert, mit 0,5 ml 1 N alkoholischer KOH-Lösung versetzt und die Mischung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe einer phosphatgepufferten Triethanolaminlösung bis zum Erreichen von pH 7,8 gefällt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation (10 Minuten, 10000 g) wurde die Menge an reduziertem NAD(P)H im Überstand nach Klingenberg [112] bestimmt. Hierzu wurde der durch NAD(P)H-Oxidation nach Zugabe von Glutamatdehydrogenase und α-Ketoglutarat/ Ammoniumchlorid hervorgerufene Fluoreszenzabfall mit einem Shimadzu RF-1501 Spektrofluorometer ($\lambda_{exc.}$= 365 nm und $\lambda_{em.}$= 460 nm) gemessen; mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Mengen an NAD(P)H und der Proteinbestimmung nach Bradford wurde die NAD(P)H-Konzentration berechnet.

5.2.5 GLUTATHION-MESSUNG

Mit Bcl-2 transfizierte und nicht-transfizierte L929-Zellen wurden für 72 Stunden mit und ohne 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen auf 12,5 cm^2-Fläschchen gesplittet und ohne Selektionsmedium mit und ohne Doxycyclin inkubiert. Zu jedem Meßzeitpunkt wurde zur Bestätigung der Bcl-2-Expression gleichzeitig ein Western-Blot angefertigt.

Nach dem zweimaligen Waschen mit HBSS wurden die Zellen mit 800 µl 10%iger Sulfosalicylsäure bedeckt und mit zwei bis drei „Freeze-Thaw"-Zyklen lysiert; die Vollständigkeit der Lyse wurde im Lichtmikroskop überprüft. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und für 2 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Je 200 µl des Überstandes wurden für die GSH- bzw. GSSG-Messung verwendet; aus dem Sediment wurde der Proteingehalt bestimmt.

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Glutathion wurden 20 µl des Überstandes, 872 µl Phosphatpuffer (0,1 M Phosphat/5 mM EDTA, pH 7,5), 50 µl DTNB-Lösung (12 mM) und 50 µl NADPH-Lösung (4 mM) zusammengegeben, sorgfältig gemischt und 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 960 mU Glutathionreduktase wurde die Absorptionsänderung bei 412 nm im Photometer gemessen und aus der Steigung der Absorptionsänderung mit Hilfe geeigneter Glutathionstandards die in der Probe enthaltene Glutathionkonzentration bestimmt.
Zur Messung des oxidierten Anteils (GSSG) wurden 200 µl des sauren Überstandes der Proteinfällung mit Triethanolamin neutralisiert und nach Zusatz von 4 µl 2-Vinylpyrrolidin 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die GSSG-Standards wurden in 10%iger Sulfosalicylsäure gelöst und ebenfalls mit Triethanolamin und 2-Vinylpyrrolidin versetzt. Für die Messung wurden 20 µl der neutralisierten Probe mit 840 µl Phosphatpuffer, 50 µl DTNB-Lösung und 50 µl NADPH-Lösung für 4 Minuten bei 37°C inkubiert, die Mischung mit 4,8 U Glutathionreduktase versetzt und die Absorptionsänderung wiederum bei 412 nm aufgezeichnet.
Zur Bestimmung der Konzentration an reduziertem Glutathion wurde die Differenz aus dem Wert für die oxidierte Form und dem Gesamtgehalt gebildet.

5.2.6 BESTIMMUNG DER GESCHWINDIGKEIT DER EISENREDUKTION

A) PHENGREEN SK-QUENCHUNG IM ZELLFREIEN SYSTEM

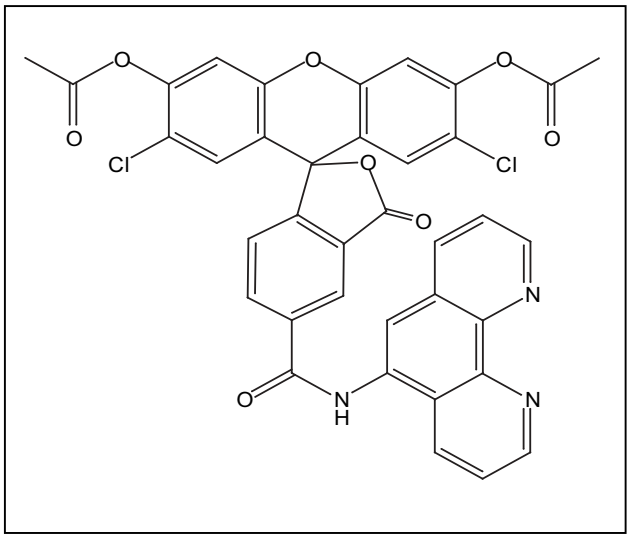


Abbildung 45: Struktur von PhenGreen SK

Die Abhängigkeit der PhenGreen SK-Fluoreszenz (Abbildung 45 zeigt die Struktur von PhenGreen SK) von der Anwesenheit von zweiwertigem und dreiwertigem Eisen wurde in einem chelexbehandelten cytosolischen Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) untersucht. Dazu wurde PhenGreen SK Dikaliumsalz in einer Endkonzentration von 30 µM zu 2 ml bei 37°C thermostatisiertem cytosolischem Medium gegeben. Ein 100 µl-Aliquot wurde auf ein Glasplättchen gegeben, das für 24 h bei 4°C in 10 ml einer Chelex/Wasser-Suspension

(40 mg Chelex pro ml) inkubiert und anschließend luftgetrocknet worden war. Die Fluoreszenz der PhenGreen-Lösung wurde mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm durch einen 505-nm-Longpass-Emissionsfilter in einer Focusebene 10 µm oberhalb der Glasoberfläche gemessen und der erhaltene Wert auf 100% gesetzt. Um den Quenchungseffekt von Eisen zu bestimmen, wurden Aliquots entweder einer Eisen(II)- (1 mM Eisen(II)ammoniumsulfat, 1 mM Trinatriumcitrat Dihydrat, 20 mM Ascorbat in 10 mM Imidazolpuffer, pH 7.0) oder einer Eisen(III)stammlösung (1 mM Eisen(III)chlorid Hexahydrat in 10 mM Imidazolpuffer) bis zu einer Endkonzentration von 10 µM zu der thermostatisierten PhenGreen-Lösung gegeben und die Fluoreszenz 2 Minuten nach der Eisenzugabe wie oben beschrieben gemessen. Für die Messung des Einflusses von Eisen(III) wurde das cytosolische Medium ohne die Reduktionsmittel Ascorbat, Glutathion und Cystein angesetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des "cytosolischen" Mediums

Substanz	Konzentration
KCl	100 mM
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	5 mM
ATP	4 mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	2 mM
Ascorbinsäure	2 mM
Glucose	6,85 mM
Pyruvat	0,14 mM
L-Lactat	1,5 mM
Citrat (*tri*-Natriumcitrat-Dihydrat)	0,23 mM
Anorg. Phosphat (*tri*-Kaliumphospat-Heptahydrat)	2,99 mM
Glutathion	4,5 mM
Imidazol-Puffer	10 mM
L-Alanin	8,9 µg/ml
L-Arginin/HCl	126 µg/ml
L-Asparagin x H_2O	15 µg/ml
L-Asparaginsäure	13,3 µg/ml
L-Cystein	13,3 µg/ml
L-Glutaminsäure	14,7 µg/ml
L-Glutamin	292 µg/ml
Glycin	75 µg/ml
L-Histidin/HCl x H_2O	42 µg/ml
L-Isoleucin	52 µg/ml
L-Leucin	52 µg/ml
L-Lysin/HCl	725 µg/ml
L-Methionin	15 µg/ml
L-Phenylalanin	32 µg/ml
L-Prolin	11,5 µg/ml
L-Serin	10,5 µg/ml
L-Threonin	48 µg/ml
L-Tryptophan	10 µg/ml
L-Tyrosin x $2H_2O$	51,9 µg/ml
L-Valin	46 µg/ml

B) ZELLULÄRE MESSUNGEN

Für die zellulären Messungen wurde ein mit der Attofluor Imaging Software (Atto Instruments, Rockville, MD) ausgestattetes inverses digitales Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV, Zeiss) benutzt. Nachdem die Zellen in die Pentz-Kammer überführt worden waren, wurden sie zweimal mit warmem KH-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 60 µM PhenGreen SK-Diacetat (in KH ohne Zusätze bei allen Experimenten) 15 Minuten im Dunkeln beladen; anschließend wurden sie vorsichtig dreimal gewaschen und mit frischem KH-Puffer versorgt. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation wurde der Puffer nochmals gewechselt und die Kammer auf den vorgewärmten Objekttisch gestellt. Die Fluoreszenz ($\lambda_{exc.}$= 488 ± 10 nm, $\lambda_{em.}$= 520 ± 20 nm) jeder einzelnen Zelle wurde 10 Minuten lang minütlich aufgenommen; anschließend wurde der Mikroskop-Shutter für eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz geöffnet und 5 µM Eisen wurden aus einer frischen Stammlösung (5 mM $FeCl_3$/10 mM 8HQ in DMSO) zugegeben. Nachdem sich der steile initiale Fluoreszenzabfall verlangsamte, wurde der Shutter wieder geschlossen und die Aufzeichnung der Fluoreszenz in 1-minütigen Intervallen für weitere 5 bis 10 Minuten fortgesetzt. Zur Auswertung wurde die Steigung des linearen initialen Fluoreszenzabfalls für jede Zelle berechnet.

In einigen Messungen wurden D-Glucose (10 mM), L-Glucose (10 mM), BCNU (150 µM), Glutathion oder Glutathion-Ethylester (je 4 mM) allen Puffern außer dem zur Beladung verwendeten zugesetzt. Für andere Messungen wurden die Zellen mit Ascorbat (24 Stunden mit 0,2 mM in Zellkulturmedium) oder mit BSO (20 Stunden mit 0,5 mM) vorinkubiert; weder Ascorbat noch BSO waren während der Messung anwesend.

C) ESR-MESSUNGEN

Für die ESR-Messungen wurden L929-Zellen, kultiviert auf 225 cm^2-Schalen, zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 50 µM Eisen (als Fe(III)/8HQ) in Krebs-Henseleit-Puffer (ohne oder mit 10 mM D-Glucose) bedeckt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Eisenlösung abgeschüttet, die Zellen so schnell wie möglich dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit einem Gummischaber abgeschabt. Ein Parallelansatz wurde nach der Inkubationszeit ebenfalls dreimal sorgfältig gewaschen, mit 100 µM NBD-DFO für 15 Minuten bei 37°C weiterinkubiert und anschließend noch einmal der gleichen Waschprozedur

unterzogen. Die abgeschabten Zellen wurden in ein 4-mm Suprasil-Quarzröhrchen gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messungen erfolgten unter Stickstoffkühlung in einem Flüssigstickstoff-Dewareinsatz mit einem Bruker ESP 300E X-Band Spektrometer unter Benutzung einer TM_{110} Wide Bore Cavity (zu den genauen Bedingungen siehe Legende zu Abbildung 35, Seite 51). Die Spektren wurden mit der WIN-EPR-Software (Bruker) ausgewertet.

5.2.7 DCHF-OXIDATION

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden in KH-Puffer ohne Zusatz 1 Stunde bei 37°C mit 10 µM des oxidationsempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorodihydrofluorescein (DCHF, siehe Abbildung 46) beladen, anschließend zweimal gewaschen und 15 Minuten in KH mit oder ohne Glucose inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 2,5 ml des jeweiligen Puffers (KH-Puffer mit oder ohne Glucose) zugegeben und die Zellen auf den vorgewärmten Objekttisch überführt. 20 µM Eisen (als Fe(III)/8HQ) wurden zugegeben, nachdem die zelluläre Fluoreszenz ($\lambda_{exc.}$= 488 ± 10 nm, $\lambda_{em.}$= 520 ± 20 nm) 10 Minuten lang aufgezeichnet worden war. Anschließend wurde die Fluoreszenz für weitere 2000 Sekunden aufgenommen.

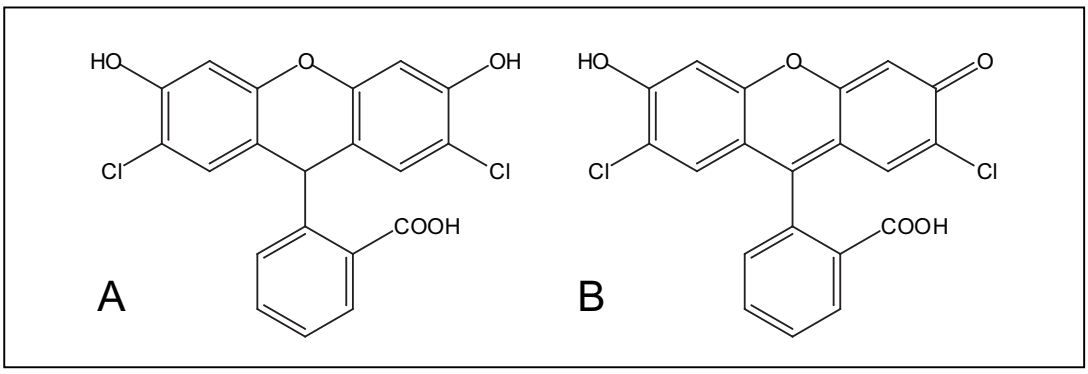


Abbildung 46: Struktur von 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCHF)
A) reduzierte Form (nicht-fluoreszierend); B) oxidierte Form (fluoreszierend)

5.2.8 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach [113] durchgeführt; abweichende Quellen sind angegeben.

ALLGEMEINE METHODEN

A) AUFREINIGUNG VON DNA

Eine Abtrennung von Proteinverunreinigungen ist nach jedem Arbeitsschritt, der die Modifikation von DNA durch Enzyme beinhaltet, nötig. Um eine DNA-Lösung von Proteinen zu befreien, wurde sie mit dem doppelten Volumen Phenol/Chloroform versetzt und gut gemischt. Die milchig-gelbe Emulsion wurde 2 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend nahm man die wäßrige Phase ab und extrahierte sie erneut mit dem einfachen Volumen Chloroform. Nach einer weiteren Zentrifugation bei den gleichen Bedingungen wurde wiederum die obere Phase entnommen und damit eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde die zu fällende DNA-Lösung mit 1/9 Volumen an Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) versetzt. Anschließend wurde durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an absolutem Ethanol eine Stunde bei -20°C gefällt. Nach 20minütigem Zentrifugieren bei 16000 g bei 4°C wurde das Sediment mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Sediment an der Luft getrocknet und in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

B) AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Gele verwendet. Zum Ansetzen der Gellösung wurde Agarose in TBE-Puffer (90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) gegeben, die Suspension aufgekocht, 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und mit der Lösung ein horizontales Gel gegossen. Zur aufzutrennenden DNA-Lösung wurde 1/4-Volumen an 5fach Probenpuffer (0,2 M EDTA, 25% (w/w) Saccharose, 0,25% (w/w) Bromphenolblau) gegeben. Bei einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand wurden die Proben je nach Länge eine bis drei Stunden in TBE-Puffer aufgetrennt. Die Nukleinsäurebanden konnten unter UV-Beleuchtung (254 nm) sichtbar gemacht werden.

MODIFIKATIONEN VON DNA-ENDEN:

A) RESTRIKTION

Um Ansatzgröße und Inkubationsdauer einer Restriktion zu berechnen, wurde folgende Beziehung verwendet:

$$\frac{L_N \cdot S_F}{S_N \cdot L_F} = U$$

S = Anzahl der Schnittstellen
L = Länge (Bp)
N = Normierungs-DNA (λ-Phage oder Adenovirus 2)
F = Fragment-DNA
U = benötigte Menge Enzym [Units/µg·h]

Die zu verwendenden Puffer (10fach konzentriert) konnten Tabellen der Herstellerfirmen entnommen werden. Es wurde darauf geachtet, daß das Volumen des zugegebenen Enzyms höchstens 1/10 des gesamten Ansatzes ausmacht, da das in der Enzymlösung enthaltene Glycerol bei zu hoher Konzentration die Aktivität des Enzyms stark einschränkt. Die Restriktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch Zugabe von 5fach Elektrophoreseprobenpuffer und anschließende Elektrophorese auf einem Agarosegel abgestoppt.

B) KLENOW-AUFFÜLLUNG (AUFFÜLLEN VON 3´-ÜBERHÄNGENDEN EINZELSTRANGENDEN IN DOPPELSTRÄNGIGER DNA)

0,1-4 µg DNA wurden mit 0,05 mM dNTPs und 1 bis 5 Units Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert; anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 75°C (10 Minuten) gestoppt. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Agarosegelelektrophorese oder Phenol/Chloroform-Extraktion.

C) PHOSPHORYLIERUNG

Nach bestimmten Modifikationen mußten die neu-entstandenen 5´-Enden der DNA-Stränge mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIAP, „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“) phosphoryliert werden. Dazu wurde die DNA mit 5 Units CIAP pro µg im entsprechenden Puffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert; anschließend wurde die Reaktion durch eine Phenol/Chloroformextraktion oder eine Agarosegelelektrophorese abgestoppt.

POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Um die benötigte Hybridisierungstemperatur der vorliegenden Oligonukleotide zu berechnen, wurde folgende Beziehung verwendet:

$T_{hyb} = (N_{GC} \times 4°C) + (N_{AT} \times 2°C) - 3°C$

N_{GC} , N_{AT} = Anzahl GC- bzw. AT-Paare

Der PCR-Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um das Verdampfen der wäßrigen Lösung zu minimieren. Die PCR wurde entweder mit Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) oder mit Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA) durchgeführt; die Bedingungen wurden jeweils den Angaben der Hersteller entnommen, wobei die Inkubationszeiten der einzelnen Temperaturstufen variierten. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Perkin-Elmer Thermocycler und folgte prinzipiell dem Schema Denaturierung (94°C), Annealing (Temperatur wurde durch die Primersequenz bestimmt) und Extension (Temperatur hing von der verwendeten Polymerase ab); im ersten Zyklus wurde der Denaturierungsschritt und im letzten der Extensionsschritt verlängert. Es wurden 30 PCR-Zyklen durchgeführt. Nach Ende der Inkubationen wurde der Erfolg der PCR durch eine Gelelektrophorese überprüft.

LIGATION

Für die Insertion eines PCR-Fragmentes in einen Vektor wurden Plasmid-DNA und Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit 10% Polyethylenglykol (PEG) und 2 U (für „Sticky Ends“) bzw. 4 U (für „Blunt Ends“) T4-DNA Ligase zusammengegeben, sorgfältig gemischt und für eine Stunde bei 22°C inkubiert. Die Reaktionsmischung konnte direkt für eine Transformation von kompetenten Bakterien verwendet werden.

HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN

Für alle Arbeiten mit Bakterien wurden sterilisierte Gefäße und Lösungen verwendet. Für die Präparation kompetenter Bakterien (*E. coli* XL1 *blue*) wurde eine in autoklaviertem LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, pH 7.3) gewachsene Übernachtkultur (Dichte OD_{600} = 0,3 - 0,6) auf Eis abgekühlt, die Bakterien abzentrifugiert (15 Minuten, 3000 g, 4°C) und das Sediment in RF1-Medium (75 mM KCl, 50 mM KAc pH 7,5, 50 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerol) resuspendiert. Nach einer 2-stündigen Inkubation auf Eis und einer

weiteren Zentrifugation (15 Minuten, 3000 g, 4°C) wurde das Bakteriensediment in RF2-Medium (10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15% Glycerol) aufgenommen, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und in Ethanol/Trockeneis schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -70°C aufbewahrt.

AMPLIFIKATION VON DNA (TRANSFORMATION, MINIPRÄP, MIDI/MAXIPRÄP)

A) TRANSFORMATION

200 µl kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA gemischt und 1 h bei 0°C inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung (90 Sekunden, 42°C) wurden die transformierten Zellen in 800 µl vorgewärmtem LB-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltigen (50 µg/ml) Agarplatten (1,5% Agarose in LB-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B) AMPLIFIKATION VON DNA IN KLEINEM MAßSTAB (MINIPRÄPARATION)

Für die Präparation sauberer Plasmid-DNA wurde der NucleoSpin® Plasmid-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet und die Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Für Überprüfungszwecke wurde folgendes Protokoll verwendet:

5 ml LB-Medium (mit 50 µg Ampicillin pro ml) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (150 rpm). 1,5 ml dieser Übernachtkultur wurden zentrifugiert (30 Sekunden, 18000 g), das Sediment in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0,1% Triton® X-100, 50 mM EDTA pH 7,4, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die bakteriellen Proteine und die genomische DNA wurden durch Erhitzen (45 Sekunden, 95°C) gefällt und durch Zentrifugation (10 Minuten, 18000 g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde nach 5minütiger Inkubation mit 1% Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) wiederum 10 Minuten bei 18000 g zentrifugiert und das plasmidhaltige Sediment in 1,2 M NaCl-Lösung resuspendiert und mit Ethanol gefällt. Die gewaschene DNA wurde in Wasser gelöst und die noch enthaltene RNA durch Zugabe von RNAse (15 Minuten Inkubation bei 37°C) verdaut. Anschließend wurde die DNA durch Restriktion und Agarosegelelektrophorese charakterisiert. Positive Klone wurden in einer Midipräparation (s.u.) weiter amplifiziert.

C) AMPLIFIKATION VON DNA IN MITTLEREM/GROßEM MAßSTAB (MIDI-/MAXIPRÄPARATION)

Positive Klone wurden, je nach Bedarf, in mittlerem oder großem Maßstab amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden 50 bis 100 ml LB-Medium mit 100 µl bzw. 200 µl der positiv getesteten Minipräparation angeimpft und 12 bis 16 Stunden unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 6000 g für 15 Minuten (4°C) wurde aus dem Bakteriensediment nach dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN Plasmid Purification Handbook) die Plasmid-DNA isoliert. Die DNA wurde zuerst durch Agarosegelelektrophorese und schließlich durch eine Sequenzierung überprüft. Die so gewonnene DNA konnte sofort für die Transfektion von Zellen verwendet werden.

TRANSFEKTION

Sowohl für die transiente als auch für die stabile Transfektion wurde das lipophile Transfektionsreagenz LipofectAMINE® (Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Dazu wurde zu in 6-Well-Platten kultivierten L929-Zellen, die ca. 50% konfluent waren, eine Mischung aus DNA und LipofectAMINE® im Transfektionsmedium Opti-MEM® (Life Technologies, Eggenstein) getropft und die Zellen ohne Zugabe von Antibiotika für 5 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde 1 ml MEM mit der doppelten Menge an Serum und Antibiotika zugegeben, ohne daß die Transfektionslösung entfernt wurde. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt und die Zellen weiterkultiviert. Bei transienten Transfektionen wurde 48 Stunden nach der Transfektion die Reportergenaktivität überprüft. Bei stabilen Transfektionen wurden die Zellen 72 Stunden nach der Transfektion 1:10 in das Selektionsmedium (MEM mit 400 µg/ml Geneticin und 400 µg/ml Hygromycin) umgesetzt; zusätzlich wurde ständig eine Doxycyclinkonzentration von 1 µg/ml Medium zur Unterdrückung der Genaktivität zugegeben. Die Zellen wurden kultiviert, bis sich einzelne resistente Zellklone gebildet hatten. Etwa 50-60 dieser Klone wurden durch Aufsetzen von Transfektionsringen auf den Gefäßboden und Trypsinisierung des so isolierten Zellklones in neue Kulturgefäße (12,5 cm^2) überführt und unter vollständigem Selektionsdruck bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Überprüfung des Erfolges der Transfektion wurden die Zellen transient mit einem Reportergenplasmid (pBI_{Luc} [Luciferase unter TRE-Kontrolle], Clontech/ BASF) transfiziert und die Bcl-2-Expression in einem Western-Blot analysiert.

CHEMOLUMINESZENZ

Zur Überprüfung des Erfolges der stabilen Transfektion wurden die entsprechenden Zellklone zusätzlich transient mit einem Plasmid (pBI_{Luc}) transfiziert, das das Luciferase-Gen unter Regulation eines TRE enthielt. Bei Vorhandensein des Regulatorplasmids im Genom der Zelle wird der Transaktivator exprimiert und induziert die Luciferaseexpression. Mit Hilfe der in Abbildung 47 dargestellten, durch Luciferase katalysierten Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin konnte diese Expression anhand der emittierten Lichtquanten überprüft werden. Dazu wurde das Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) verwendet. Nach Lyse der Zellen mit dem empfohlenen Lysepuffer (25 mM Tris/Phosphat, pH 7,8; 2 mM DTT; 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N´,N´-Tetraessigsäure, 10% Glycerol, 1% Triton® X-100) und Abtrennung der festen Zellbestandteile durch Zentrifugation (16000 g, 10 Minuten, 4°C) wurden 20 µl Lysat in eine schwarze 96-Well-Platte gegeben und vorsichtig aber sorgfältig mit 100 µl Luciferase-Assay Reagenz gemischt. Unmittelbar nach der Zugabe wurde das emittierte Licht über einen Zeitraum von 10 Sekunden mit einem Hamamatsu ARGUS 50 Image Processor unter Verwendung der A50 Control Software gemessen.

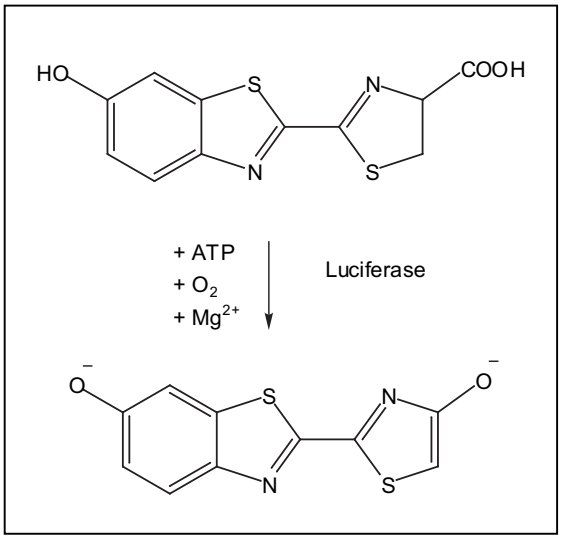


Abbildung 47: Luciferase-katalysierte Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin unter Lichtemission

WESTERN BLOT

A) LYSE DER ZELLEN

Die gewaschenen Zellen wurden unter Verwendung eines Gummischabers vorsichtig abgeschabt und durch Zentrifugation (12000 g, 30 Sekunden, 4°C) pelletiert. Das Zellsediment wurde im Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,02% Natriumazid, 0,1% SDS, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1% Nonidet P40, 0,5% Natriumdesoxycholat) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden durch eine erneute Zentrifugation (12000 g, 5 Minuten, 4°C) Zelltrümmer

abgetrennt. Der Überstand konnte bei -70°C für spätere Verwendung aufbewahrt werden.

B) ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurde die Elektrophoresevorschrift nach dem BIORAD Instruction Manual für die Mini-PROTEAN II-Elektrophoresekammer und nach Sambrook et al. [113] modifiziert. Dazu wurden die Proteinproben mit dem 0,25fachen Volumen an 5fach Laemmli-Probenpuffer (312 mM Tris/HCl, pH 6,8; 25% β-Mercaptoethanol; 10% SDS; 0,05% Bromphenolblau, 50% Glycerol) gemischt, 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 16000 g). Der Überstand wurde direkt auf das Gel aufgetragen.

Die verwendeten Polyacrylamid-SDS-Gele wurden nach Standardvorschrift [113] angefertigt; es wurden 10%ige Sammelgele und 20%ige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, bis die blaue Lauffront das untere Viertel des Gels erreicht hatte. Zur Orientierung wurde der vorgefärbte Proteinstandard „See Blue™ Plus 2“ (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet.

C) TRANSFER DER PROTEINE AUF PVDF-MEMBRANEN

Das Polyacrylamidgel wurde, nach Abtrennung des Sammelgels, 15 Minuten unter vorsichtigem Schütteln in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin) äquilibriert. Die PVDF-Membranen wurden nach dem Anfeuchten in 100% Methanol ebenfalls für 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte nach der Vorschrift von BIO-RAD für eine Stunde bei 100 V und 350 mA. Nach Beendigung des Transfers wurden die Membranen zweimal für je 5 Minuten in bidestilliertem Wasser gewaschen.

D) HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION

Für die Entwicklung der Blots wurde das Protokoll für das WesternBreeze™-Immundetektionssystem (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet. Kurz zusammengefaßt wurde die Membran dabei für 30 Minuten mit Casein geblockt, gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Anti-Bcl-2-Antikörper (aus Kaninchen; Verdünnung 1:20000) inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte eine 30minütige Inkubation mit dem im Kit enthaltenen Sekundärantikörper, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten. Anschließend wurde die Membran gleichmäßig mit

2,5 ml der Chemolumineszenzsubstratlösung bedeckt, 5 Minuten inkubiert und die Lösung dann vorsichtig und ohne Schlierenbildung abgenommen. Nach dem Bedecken der Membran mit einer klaren Plastikfolie wurde für 10 bis 20 Sekunden ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt.

BRADFORD-TEST [114]

Die zu messende Proteinlösung wurde mit bidestilliertem Wasser so verdünnt, daß die Endkonzentration nicht mehr als 10 µg Protein pro ml betrug. Zu 800 µl dieser Lösung wurden 200 µl 5xBradfordreagenz (0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) ortho-Phosphorsäure) gegeben und sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Mischung bei 460 nm gemessen; anhand einer Standardreihe (bovines Serumalbumin in Wasser) mit bekannten Proteinkonzentrationen konnte die Konzentration der Proteinlösung ermittelt werden.

5.2.9 STATISTIK

Fluoreszenzmessungen wurden mindestens dreimal, mit jeweils 10 bis 20 Zellen pro Gesichtsfeld, wiederholt. Cytotoxizitätsexperimente und NAD(P)H-Messungen wurden 3 oder 4 mal in Doppelansätzen wiederholt. Die dargestellten Daten sind, soweit nicht anders angegeben, Mittelwerte ± Standardabweichungen. Die von zwei Gruppen erhaltenen Daten wurden in einem Student´s *t*-Test verglichen und ein *P*-Wert von < 0.05 wurde als signifikant erachtet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. B. A. Freeman und J. D. Crapo: "Biology of disease: free radicals and tissue injury", Lab. Invest. **47**, 412-426 (1982)
2. B. Halliwell und C. E. Cross: "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress", Environ. Health Perspect. **102** (Suppl. 10), 5-12 (1994)
3. J. Falbe und M. Regnitz: "Römpp Chemie Lexikon" (1990), Georg Thieme Verlag, Stuttgart
4. D. J. Haile: "Regulation of genes of iron metabolism by the iron-response proteins", Am. J. Med. Sci. **318**, 230-240 (1999)
5. B. Halliwell und J. M. Gutteridge: "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", Meth. Enzymol. **186**, 1-85 (1990)
6. R. Baliga, N. Ueda und S. V. Shah: "Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys", Biochem. J. **291**, 901-905 (1993)
7. K. Öllinger und K. Roberg: "Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide", J. Biol. Chem. **272**, 23707-23711 (1997)
8. T. P. Ryan und S. D. Aust: "The role of iron in oxygen-mediated toxicities", Crit. Rev. Toxicol. **22**, 119-141 (1992)
9. S. P. Young und P. Aisen: "The Liver and Iron" in "The Liver: Biology and Pathobiology" (1994), I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, D. A. Schachter und D. A. Shafritz, eds., Raven Press Ltd., New York
10. A. Jacobs: "An intracellular transit iron pool", Ciba Foundation Symposium, 91-106 (1976)
11. A. V. Kozlov, D. Ceccarelli, A. Bini, E. Meletti, D. Gallesi, F. Giovannini, A. Masini und A. Tomasi: "Low temperature EPR characterization of "free" iron pools in liver in experimental iron overload: Effect of combined ethanol intoxication", J. Magn. Res. Anal. **3**, 141-148 (1997)
12. K. Keyer und J. A. Imlay: "Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 13635-13640 (1996)
13. F. Petrat, U. Rauen und H. de Groot: "Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK", Hepatology **29**, 1171-1179 (1999)
14. F. Petrat, H. de Groot und U. Rauen: "Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy", Arch. Biochem. Biophys. **376**, 74-81 (2000)
15. F. Petrat, H. de Groot, R. Sustmann und U. Rauen: "The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity.", Biol. Chem. **383**, 489-502 (2002)
16. B. Halliwell und J. M. C. Gutteridge: "Free Radicals in Biology and Medicine" (1999), Oxford University Press
17. F. Petrat, H. de Groot und U. Rauen: "Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells", Biochem. J. **356**, 61-69 (2001)
18. F. Petrat, D. Weisheit, M. Lensen, H. de Groot, R. Sustmann und U. Rauen: "Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor", Biochem. J. **362**, 137-147 (2002)

19. E. F. Elstner: "Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin" (1990), BI Wissenschaftsverlag, Mannheim

20. M. E. Anderson: "Glutathione and glutathione delivery compounds" in "Antioxidants in disease: mechanisms and therapy", vol. 38 (1997), H. Sies, ed., Academic Press, San Diego

21. A. Meister: "Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal; applications in research and therapy", Pharmacol. Therap. **51**, 155-194 (1991)

22. M. Kirsch und H. de Groot: "NAD(P)H, a directly operating antioxidant?", FASEB J. **15**, 1569-1574 (2001)

23. S. Pindiur: "NAD(P)H, a primary target of $^1O_2$ in mitochondria of intact cells", Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin am Institut für Physiologische Chemie, Universität Essen (2002)

24. M. Raffray und G. M. Cohen: "Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?", Pharmacol. Ther. **75**, 153-177 (1997)

25. M. Crompton: "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death", J. Physiol. **529**, 11-21 (2000)

26. P. Bernardi, K. M. Broekemeier und D. R. Pfeiffer: "Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane", J. Bioenerg. Biomembr. **26**, 509-517 (1994)

27. N. J. Waterhouse, J. E. Ricci und D. R. Green: "And all of a sudden it´s over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis", Biochimie **84**, 113-121 (2002)

28. G. Kroemer und J. C. Reed: "Mitochondrial control of cell death", Nat. Med. **6**, 513-519 (2000)

29. R. Brown: "The bcl-2 family of proteins", Br. Med. Bull. **53**, 446-477 (1996)

30. G. Kroemer: "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis", Nature Med. **3**, 614-620 (1997)

31. J. M. Adams und S. Cory: "The Bcl-2 protein family: arbiters of cells survival", Science **281**, 1322-1326 (1998)

32. S. Krajewski, S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton und J. C. Reed: "Investigation of the subcellular distribution of the *bcl-2* oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes", Cancer Res. **53**, 4701-4714 (1993)

33. L. M. Ellerby, H. M. Ellerby, S. M. Park, A. L. Holleran, A. N. Murphy, G. Fiskum, D. J. Kane, M. P. Testa, C. Kayalar und D. E. Bredesen: "Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2", J. Neurochem. **67**, 1259-1267 (1996)

34. D. M. Hockenberry, Z. N. Oltvai, X.-M. Yin, C. L. Milliman und S. J. Korsmeyer: "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis", Cell **75**, 241-251 (1993)

35. M. J. Meredith, C. L. Cusick, S. Soltaninassab, K. S. Sekhar, S. Lu und M. L. Freeman: "Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux", Biochem. Biophys. Res. Commun. **248**, 458-463 (1998)

36. D. W. Voehringer: "Bcl-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity", Free Radic. Biol. Med. **27**, 945-950 (1999)

37. D. W. Voehringer, D. J. McConkey, T. J. McDonnell, S. Brisbay und R. E. Meyn: "Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 2956-2960 (1998)

38. A. L. Vahrmeijer, R. W. M. Hoetelmans, G. J. Mulder, J. Schutrups, R. L. P. van Vlierberghe, C. J. H. van de Velde und J. H. van Dierendonck: "Development of resistance to glutathione depletion-induced cell death in CC531 colon carcinoma cells: association with increased expression of Bcl-2", Biochem. Pharmacol. **59**, 1557-1562 (2000)

39. V. A. Tyurin, Y. Y. Tyurina, P. J. Quinn, N. F. Schor, R. Balachandran, B. W. Day und V. E. Kagan: "Glutamate-induced cytotoxicity in PC12 pheochromo-cytoma cells: role of oxidation of phospholipids, glutathione and protein sulfhydryls revealed by *bcl-2* transfection", Mol. Brain. Res. **60**, 270-281 (1998)

40. T.-C. Hour, S.-Y. Lin Shiau und J.-K. Lin: "Suppresion of *N*-methyl-*N´*-nitro-*N*-nitrosoguanidine- and *S*-nitrosoglutathione-induced apoptosis by Bcl-2 through inhibiting glutathione-*S*-transferase π in NIH3T3 cells", Toxicol. Lett. **110**, 191-202 (1999)

41. N. Hyde, N. J. Borthwick, G. Janossy, M. Salmon und A. N. Akbar: "Upregulation of intracellular glutathione by fibroblast-derived factor(s): enhanced survival of activated T cells in the presence of low Bcl-2", Blood **89**, 2453-2460 (1997)

42. A. Celli, F. G. Que, G. J. Gores und N. F. LaRusso: "Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes", Am. J. Physiol. **275**, G749-G757 (1998)

43. M. T. Vlachaki und R. E. Meyn: "The role of Bcl-2 and glutathione in an antioxidant pathway to prevent radiation-induced apoptosis", Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. **42**, 185-190 (1998)

44. A. Macho, T. Hirsch, I. Marzo, P. Marchetti, B. Dallaporta, S. A. Susin, N. Zamzami und G. Kroemer: "Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis", J. Immunol. **158**, 4612-4619 (1997)

45. G. Bellomo und S. Orrenius: "Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury", Hepatology **5**, 876-882 (1985)

46. P. A. Hyslop, D. B. Hinshaw, I. U. Schraufstätter, L. A. Sklar, R. G. Spragg und C. G. Cochrane: "Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D1 cells", J. Cell. Physiol. **129**, 356-366 (1986)

47. M. M. Halleck, J. H. Richburg und F. C. Kauffman: "Reversible and irreversible oxidant injury to PC12 cells by hydrogen peroxide", Free Radic. Biol. Med. **12**, 137-144 (1992)

48. H. Thor, P. Hartzell und S. Orrenius: "Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated Ca^{2+}", J. Biol. Chem. **259**, 6612-6615 (1984)

49. S. Orrenius, D. J. McConkey, G. Bellomo und P. Nicotera: "Role of Ca^{2+} in toxic cell killing", Trends Pharmacol. Sci. **10**, 281-285 (1989)

50. P. Nicotera, G. Bellomo und S. Orrenius: "The role of Ca^{2+} in cell killing", Chem. Res. Toxicol. **3**, 484-494 (1990)

51. R. Rubin und J. L. Farber: "Mechanisms of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide", Arch. Biochem. Biophys. **228**, 450-459 (1984)

52. P. E. Starke und J. L. Farber: "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 (1985)

53. E. E. Lomonosova, M. Kirsch und H. de Groot: "Calcium vs. iron-mediated processes in hydrogen peroxide toxicity to L929 cells: effects of glucose", Free Radic. Biol. Med. **25**, 493-503 (1998)

54. M. M. Rimpler, U. Rauen, T. Schmidt, T. Möröy und H. de Groot: "Protection against hydrogen peroxide cytotoxicity in rat-1 fibroblasts provided by the oncoprotein Bcl-2: maintenance of calcium homoeostasis is secondary to the effect of Bcl-2 on cellular glutathione", Biochem. J. **340**, 291-297 (1999)

55. M. Loeffler und G. Kroemer: "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita", Exp. Cell. Res. **256**, 19-26 (2000)

56. A.-L. Nieminen, A. K. Saylor, S. A. Tesfai, B. Herman und J. J. Lemasters: "Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to *t*-butylhydroperoxide", Biochem. J. **307**, 99-106 (1995)

57. S. Freundlieb, C. Schirra-Müller und H. Bujard: "A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells", J. Gene Med. **1**, 4-12 (1999)

58. D. X. Yin, L. Zhu und R. T. Schimke: "Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression", Anal. Biochem. **235**, 195-201 (1996)

59. M. Gossen, A. L. Bonin, S. Freundlieb und H. Bujard: "Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells", Curr. Opin. Biotechnol. **5**, 516-520 (1994)

60. Y. Tsujimoto und C. M. Croce: "Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 5214-5218 (1986)

61. M. L. Cleary, S. D. Smith und J. Sklar: "Cloning and structural analysis of cDNAs for *bcl-2* and a hybrid *bcl-2*/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation", Cell **47**, 19-28 (1986)

62. M. Seto, U. Jaeger, R. D. Hockett, W. Graninger, S. Bennett, P. Goldman und S. J. Korsmeyer: "Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma", EMBO J. **7**, 123-131 (1988)

63. L. C. Lee, J. J. Hunter, A. Mujeeb, C. Turck und T. G. Parslow: "Evidence for α-helical conformation of an essential N-terminal region in the human Bcl-2 protein", J. Biol. Chem. **271**, 23284-23288 (1996)

64. J. P. Morgenstern und H. Land: "Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line", Nucl. Acid Res. **18**, 3587-3596 (1990)

65. C. P. LeBel, H. Ischiropoulos und S. C. Bondy: "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress", Chem. Res. Toxicol. **5**, 227-231. (1992)

66. X. Huang, K. Frenkel, C. B. Klein und M. Costa: "Nickel induces increased oxidants in intact cultured mammalian cells as detected by dichlorofluorescein fluorescence", Toxicol. Appl. Pharmacol. **120**, 29-36. (1993)

67. A. N. Woodmansee und J. A. Imlay: "Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron", J. Biol .Chem. **277**, 34055-34066 (2002)

68. R. Richards-Kortum und E. Sevick-Muraca: "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis", Annu. Rev. Phys. Chem. **47**, 555-606 (1996)

69. T. Noda, R. Iwakiri, K. Fujimoto und T. Y. Aw: "Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells", FASEB J. **15**, 2131-2139 (2001)

70. W. Droge: "Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants", Exp. Gerontol. **37**, 1333-1345 (2002)

71. S. Linton, M. J. Davies und R. T. Dean: "Protein oxidation and ageing", Exp. Gerontol. **36**, 1503-1518 (2001)

72. Y. Lavrorsky, B. Chatterjee, R. A. Clark und A. K. Roy: "Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases", Exp. Gerontol. **35**, 521-532 (2000)

73. H. M. Brown-Borg, A. M. Bode und A. Bartke: "Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels: potential relationship in the aging process", Endocrine **11**, 41-48 (1999)

74. O. Fuckert, U. Rauen und H. de Groot: "A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells", Transplantation **70**, 723-730 (2000)

75. C. Srinivasan, A. Liba, J. A. Imlay, J. S. Valentine und E. B. Gralla: "Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance", J. Biol. Chem. **275**, 29187-29192 (2000)

76. G. Cairo, L. Tacchini, G. Pogliaghi, E. Anzon, A. Tomasi und A. Bernelli-Zazzera: "Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool", J. Biol. Chem. **270**, 700-703 (1995)

77. A. V. Kozlov, A. Bini, D. Gallesi, F. Giovannini, A. Iannone, A. Masini, E. Meletti und A. Tomasi: "'Free' iron, as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy, increases unequally in different tissues during dietary iron overload in the rat", Biometals **9**, 98-103 (1996)

78. D. Yegorov, A. V. Kozlov, O. A. Azizova und Y. A. Vladimirov: "Simultaneous determination of Fe(III) and Fe(II) in water solutions and tissue homogenates using desferal and 1,10-phenanthroline", Free Radic. Biol. Med. **15**, 565-574 (1993)

79. J. D. Gower, G. Healing und C. J. Greene: "Determination of desferrioxamine-available iron in biological tissues by high-pressure liquid chromatography.", Anal. Biochem. **180**, 126-130 (1989)

80. T. Flatmark und A. Tangeras in "Proteins of iron metabolism" (1976), E. B. Brown, P. Aisen, J. Fielding und R. R. Crichton, eds., 349-358, Grune & Stratton, New York

81. P. J. Evans und B. Halliwell: "Measurement of iron and copper in biological systems: bleomycin and copper-phenanthroline assays", Methods Enzymol. **233**, 82-92 (1994)

82. W. Breuer, S. Epsztejn, P. Millgram und I. Z. Cabantchik: "Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe", Am. J. Physiol. **268**, C1354-1361 (1995)

83. W. Breuer, S. Epsztejn und Z. I. Cabantchik: "Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II)", J. Biol. Chem. **270**, 24209-24215 (1995)

84. F. Thomas, G. Serratrice, C. Béguin, E. S. Aman, J. L. Pierre, M. Fontecave und J. P. Laulhère: "Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells", J. Biol. Chem. **274**, 13375-13383 (1999)

85. V. Dall'Asta, P. A. Rossi, O. Bussolati und G. C. Gazzola: "Regulatory volume decrease of cultured human fibroblasts involves changes in intracellular amino-acid pool", Biochim. Biophys. Acta **1220**, 139-145 (1994)

86. V. Dall'Asta, P. A. Rossi, O. Bussolati und G. C. Gazzola: "Response of human fibroblasts to hypertonic stress. Cell shrinkage is counteracted by an enhanced active transport of neutral amino acids", J. Biol. Chem. **269**, 10485-10491 (1994)

87. T. Mastrocola, I. H. Lambert, B. Kramhoft, M. Rugolo und E. K. Hoffmann: "Volume regulation in human fibroblasts: role of Ca^{2+} and 5-lipoxygenase products in the activation of the Cl^- efflux", J. Membr. Biol. **136**, 55-62 (1993)

88. F. Puskas, P. Gergely, Jr., K. Banki und A. Perl: "Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C", FASEB J. **14**, 1352-1361 (2000)

89. A. Huang, J. A. Vita, R. C. Venema und J. F. Keaney, Jr.: "Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin", J. Biol. Chem. **275**, 17399-17406 (2000)

90. J. A. Cowan: "Inorganic Biochemistry - An Introduction" (1993), VCH Publisher, Inc., New York, N.Y.

91. E. S. Henle, Y. Luo, W. Gassmann und S. Linn: "Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family", J. Biol. Chem. **271**, 21177-21186 (1996)

92. Y. Luo, E. S. Henle und S. Linn: "Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxycytidine family", J. Biol. Chem. **271**, 21167-21176 (1996)

93. J. A. Imlay und S. Linn: "DNA damage and oxygen radical toxicity", Science **240**, 1302-1309 (1988)

94. P. Dörfler: "Untersuchungen zur Oxidation von NAD(P)H in L929-Zellen durch den lipophilen Eisenkomplex $FeCl_3$/8-Hydroxychinolin", Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II am Institut für Physiologische Chemie, Universität Essen (2002)

95. S. Y. Qian und G. R. Buettner: "Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study", Free Radic. Biol. Med. **26**, 1447-1456 (1999)

96. G. R. Buettner und B. A. Jurkiewicz: "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid", Radiat. Res. **145**, 532-541 (1996)

97. R. A. Zager und K. M. Burkhart: "Differential effects of glutathione and cysteine on Fe^{2+}, Fe^{3+}, H_2O_2 and myoglobin-induced proximal tubular cell attack", Kidney Int. **53**, 1661-1672 (1998)

98. J. E. Spallholz: "Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity", Biomed. Environ. Sci. **10**, 260-270 (1997)

99. L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius und M. J. Burkitt: "Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione", Arch. Biochem. Biophys. **304**, 102-109 (1993)

100. H. W. Rho, J. N. Lee, H. R. Kim, B. H. Park und J. W. Park: "Protective mechanism of glucose against alloxan-induced beta-cell damage: pivotal role of ATP", Exp. Mol. Med. **32**, 12-17 (2000)

101. C. Le Goffe, G. Vallette, A. Jarry, C. Bou-Hanna und C. L. Laboisse: "The *in vitro* manipulation of carbohydrate metabolism: a new strategy for deciphering the cellular defence mechanisms against nitric oxide attack", Biochem. J. **344**, 643-648 (1999)

102. R. M. Chalmers-Redman, A. D. Fraser, G. W. Carlile, A. Pong und W. G. Tatton: "Glucose protection from MPP^+-induced apoptosis depends on mitochondrial membrane potential and ATP synthase", Biochem. Biophys. Res. Commun. **257**, 440-447 (1999)

103. G. Bellomo, F. Mirabelli, P. Richelmi und S. Orrenius: "Critical role of sulfhydryl group(s) in ATP-dependent Ca^{2+} sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver", FEBS Lett. **163**, 136-139 (1983)

104. I. Martinou, S. Desagher, R. Eskes, B. Antonsson, E. André, S. Fakan und J.-C. Martinou: "The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event", J. Cell. Biol. **144**, 883-889 (1999)

105. D. Dinsdale, J. Zhuang und G. M. Cohen: "Redistribution of cytochrome c precedes the caspase-dependent formation of ultracondensed mitochondria, with a reduced inner membrane potential, in apoptotic monocytes", Am. J. Pathol. **155**, 607-618 (1999)

106. T. Wakabayashi: "Sturctural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation", Acta Biochim. Pol. **46**, 223-237 (1999)

107. J. T. Hancock, R. Desikan und S. J. Neill: "Does the redox status of cytochrome c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death?", Free Radic. Biol. Med. **31**, 697-703 (2001)

108. K. Yamamoto, K. Tsukidate und J. L. Farber: "Differing effects of the inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase on the course of oxidative cell injury in hepatocytes and fibroblasts", Biochem. Pharmacol. **46**, 483-491 (1993)

109. U. Rauen, F. Petrat, T. Li und H. de Groot: "Hypothermia injury/cold-induced apoptosis – evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O^{2-}/H_2O_2 formation", FASEB J. **14**, 1953-1964 (2000)

110. H. de Groot und M. Brecht: "Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by O^{2-}/H_2O_2 liberated by sources other than xanthine oxidase", Biol. Chem. Hoppe Seyler **372**, 35-41. (1991)

111. U. Rauen, M. Hanssen, W. Lauchart, H. D. Becker und H. de Groot: "Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of rat liver in UW solution", Transplantation **55**, 469-473 (1993)

112. M. Klingenberg: "Nicotinamid-adenin-dinukleotide: Spektrophotometrische und fluorimetrische Verfahren" in "Methoden der enzymatischen Analyse", vol. II (1974), H. U. Bergmeyer, ed., 2094-2122, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

113. J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis: "Molecular Cloning - a laboratory manual" (1987), Cold Spring Harbor Laboratory, New York

114. M. M. Bradford: "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem. **72**, 248-254 (1976)

ANHANG I: SEQUENZEN UND EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN PRIMER:

Name	Sequenz	Länge/ Annealingtemperatur/ GC-Gehalt
Fwd-Bcl2	GGAATTCATGGCGCACGCTGGGAG	24 nt / 73°C / 62%
Fwd2-Bcl2	GGAATTCCTCTGGGAAATATGGC	23 nt / 63°C / 48%
Fwd3-Bcl2	CCCAAGCTTGGGAAATATGGCGCA	24 nt / 69°C / 54%
Set1-Fwd	TACGGTGGGAGGCCTATATAAG	22 nt / 61°C / 50%
Set2-Fwd	GTGATGAAGTACATCCATTATAAGC	25 nt / 63°C / 36%
TRES-For	CGCCTGGAGACGCCATCC	18 nt / 57°C / 72%
SeqTRE-Fwd	ATAGAAGACACCGGGACCGAT	21 nt / 64°C / 52%
Rev-Bcl2	GCTCTAGACTTGTGGCCCAGATAGG	25 nt / 73°C / 56%
Rev2-Bcl2	GCATGTTGACTCACTTGTGGC	22 nt / 61°C / 50%
Rev3-Bcl2	CCATCGATGGCATGTTGACTTCACT	25 nt / 69°C / 48%
Rev4-Bcl2	CCCAAGCTTGGGCATGTTGACTTC	24 nt / 69°C / 54%
Set1-Rev	GCTTATAATGGATGTACTTCATCAC	25 nt / 63°C / 36%
Set2-Rev	GGGTCTGCAGCGGCGAGGT	19 nt / 61°C / 74%
SEQ-Rev-TRE	GCTTGCCAAACCTACAGG	18 nt / 56°C / 56%

ANHANG II: ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNGEN

a) Komplette Sequenz des Vektors p(10-3)Bcl-2 mit der Mutation an Stelle 519

Die bei der Sequenzierung erhaltene Sequenz ist rot markiert; das mutierte Nukleotid ist grün dargestellt.

CTCGAGTTTA CCACTCCCTA TCAGTGATAG AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC
TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCGAG TTTACCACTC CCTATCAGTG ATAGAGAAAA
GTGAAAGTCG AGTTTACCAC TCCCTATCAG TGATAGAGAA AAGTGAAAGT CGAGTTTACC
ACTCCCTATC AGTGATAGAG AAAAGTGAAA GTCGAGTTTA CCACTCCCTA TCAGTGATAG
AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCGAG
CTCGGTACCC GGGTCGAGTA GGCGTGTACG GTGGGAGGCC TATATAAGCA GAGCTCGTTT
AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA
CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCCCGA ATTGGAATTC CTCTGGGAAA TATGGCGCAC
GCTGGGAGAA CGGGGTACGA TAACCGGGAG ATAGTGATGA AGTACGTCCA TTATAAGCTG
TCGCAGAGGG GCTACGAGTG GGATGCGGGA GATGTGGGCG CCGCGCCCCC GGGGGCCGCC
CCCGCACCGG GCATCTTCTC CTCCCAGCCC GGGCACACGC CCCATCCAGC CGCATCCCGC
GACCCGGTCG CCAGGACCTC GCCGCTGCAG ACCCCGGCTG CCCCCGGCGC CGCCGCGGGG
CCTGCGCTCA GCCCGGTGCC ACCTGTGGTC CACCTGACCC TCCGCCAGGC CGGCGACGAC
TTCTCCCGCC GCTACCGCCG CGACTTCGCC GAGATGTCCA GCCAGCTGCA CCTGACGCCC
TTCACCGCGC GGGGACGCTT TGCCACGGTG GTGGAGGAGC TCTTCAGGGA CGGGGTGAAC
TGGGGGAGGA TTGTGGCCTT CTTTGAGTTC GGTGGGGTCA TGTGTGTGGA GAGCGTCAAC
CGGGAGATGT CGCCCCTGGT GGACAACATC GCCCTGTGGA TGACTGAGTA CCTGAACCGG
CACCTGCACA CCTGGATCCA GGATAACGGA GGCTGGGATG CCTTTGTGGA ACTGTACGGC

CCCAGCATGC GGCCTCTGTT TGATTTCTCC TGGCTGTCTC TGAAGACTCT GCTCAGTTTG
GCCCTGGTGG GAGCTTGCAT CACCCTGGGT GCCTATCTGG GCCACAAGTG AAGTCAACAT
GCCTAGAGGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA
TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA
TTATAAGCTG CAATAAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTTC
AGGGGGAGGT GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
ATTATGATCC TGCAAGCCTC GTCGTCTGGC CGGACCACGC TATCTGTGCA AGGTCCCCGG
ACGCGCGCTC CATGAGCAGA GCGCCCGCCG CCGAGGCAAG ACTCGGGCGG CGCCCTGCCC
GTCCCACCAG GTCAACAGGC GGTAACCGGC CTCTTCATCG GGAATGCGCG CGACCTTCAG
CATCGCCGGC ATGTCCCCTG GCGGACGGGA AGTATCAGCT CGACCAAGCT TGGCGAGATT
TTCAGGAGCT AAGGAAGCTA AAATGGAGAA AAAAATCACT GGATATACCA CCGTTGATAT
ATCCCAATGG CATCGTAAAG AACATTTTGA GGCATTTCAG TCAGTTGCTC AATGTACCTA
TAACCAGACC GTTCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG
TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG
GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA
CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
GTTGCTGGCG TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC
AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG
CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT
CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA
GGTCGTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT
GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC
TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA
AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA
AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA
ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG
ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC
AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA
TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC
CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG
TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC
CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG
TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC
GGCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG
AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT
GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG
TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT
CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC
ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA
TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC

b) Sequenz des SOE-Fragmentes:

Das ausgetauschte Nukleotid ist grün dargestellt.

GCGTTTGACT CCATAGAAGA CACCGGGACC GATCCAGCCT CCGCGGCCCC GAATTGGAAT
TCTCTGGGAA ATATGGCGCA CGCTGGGAGA ACGGGGTACG ATAACCGGGA GATAGTGATG
AAGTAC**A**TCC ATTATAAGCT GTCGCAGAGG GGCTACGAGT GGGATGCGGG AGATGTGGGC
GCCGCGCCCC CGGGGGCCGC CCCCGCACCG GGCATCTTCT CCTCCCAGCC CGGGCACACG
CCCCATCCAG CCGCATCCCG CGACCCGGTC GCCAGGACCT CGCCGCTGCA GACCCCGGCT
GCCCCCGGCG CCGCCGCGGG GCCTGCGCTC AGCCCGGTGC CACCTGTGGT CCACCTGACC
CTCCGCCAGG CCGGCGACGA CTTCTCCCGC CGCTACCGCC GCGACTTCGC CGAGATGTCC
AGCCAGCTGC ACCTGACGCC CTTCACCGCG CGGGGACGCT TTGCCACGGT GGTGGAGGAG
CTCTTCAGGG ACGGGGTGAA CTGGGGGAGG ATTGTGGCCT TCTTTGAGTT CGGTGGGGTC
ATGTGTGTGG AGAGCGTCAA CCGGGAGATG TCGCCCCT

c) Komplette Sequenz des Vektors p(TRE)Bcl-2

TTTGAAAGAC CCCACCCGTA GGTGGCAAGC TAGCTTAAGT AACGCCACTT TGCAAGGCAT
GGAAAAATAC ATAACTGAGA ATAGAAAAGT TCAGATCAAG GTCAGGAACA AAGAAACAGC
TGAATACCAA ACAGGATATC TGTGGTAAGC GGTTCCTGCC CCGGCTCAGG GCCAAGAACA
GATGAGACAG CTGAGTGATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT CCTGCCCCGG
CTCGGGGCCA AGAACAGATG GTCCCCAGAT GCGGTCCAGC CCTCAGCAGT TTCTAGTGAA
TCATCAGATG TTTCCAGGGT GCCCCAAGGA CCTGAAAATG ACCCTGTACC TTATTTGAAC
TAACCAATCA GTTCGCTTCT CGCTTCTGTT CGCGCGCTTC CGCTCTCCGA GCTCAATAAA
AGAGCCCACA ACCCCTCACT CGGCGCGCCA GTCTTCCGAT AGACTGCGTC GCCCGGGTAC
CCGTATTCCC AATAAAGCCT CTTGCTGTTT GCATCCGAAT CGTGGTCTCG CTGTTCCTTG
GGAGGGTCTC CTCTGAGTGA TTGACTACCC ACGACGGGGG TCTTTCATTT GGGGGCTCGT
CCGGGATTTG GAGACCCCTG CCCAGGGACC ACCGACCCAC CACCGGGAGG TAAGCTGGCC
AGCAACTTAT CTGTGTCTGT CCGATTGTCT AGTGTCTATG TTTGATGTTA TGCGCCTGCG
TCTGTACTAG TTAGCTAACT AGCTCTGTAT CTGGCGGACC CGTGGTGGAA CTGACGAGTT
CTGAACACCC GGCCGCAACC CTGGGAGACG TCCCAGGGAC TTTGGGGGCC GTTTTTGTGG
CCCGACCTGA GGAAGGGAGT CGATGTGGAA TCCGACCCCG TCAGGATATG TGGTTCTGGT
AGGAGACGAG AACCTAAAAC AGTTCCCGCC TCCGTCTGAA TTTTTGCTTT CGGTTTGGAA
CCGAAGCCGC GCGTCTTGTC TGCTGCAGCG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTCT
GACTGTGTTT CTGTATTTGT CTGAAAATTA GGGCCAGACT GTTACCACTC CCTTAAGTTT
GACCTTAGGT CACTGGAAAG ATGTCGAGCG GATCGCTCAC AACCAGTCGG TAGATGTCAA
GAAGAGACGT TGGGTTACCT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTTAACG TCGGATGGCC
GCGAGACGGC ACCTTTAACC GAGACCTCAT CACCCAGGTT AAGATCAAGG TCTTTTCACC
TGGCCCGCAT GGACACCCAG ACCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGGAAG CCTTGGCTTT
TGACCCCCCT CCCTGGGTCA AGCCCTTTGT ACACCCTAAG CCTCCGCCTC CTCTTCCTCC
ATCCGCCCCG TCTCTCCCCC TTGAACCTCC TCGTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA
TCCAGCCCTC ACTCCTTCTC TAGGCGCCGG AATTCCGATC TGATCAGCTT GCCACAACCC
GTACCAAAGA TGGATAGATC CGGAAAGCCT GAACTCACCG CGACGTCTGT CGAGAAGTTT
CTGATCGAAA AGTTCGACAG CGTCTCCGAC CTGATGCAGC TCTCGGAGGG CGAAGAATCT
CGTGCTTTCA GCTTCGATGT AGGAGGGCGT GGATATGTCC TGCGGGTAAA TAGCTGCGCC
GATGGTTTCT ACAAAGATCG TTATGTTTAT CGGCACTTTG CATCGGCCGC GCTCCCGATT
CCGGAAGTGC TTGACATTGG GGAATTCAGC GAGAGCCTGA CCTATTGCAT CTCCCGCCGT
GCACAGGGTG TCACGTTGCA AGACCTGCCT GAAACCGAAC TGCCCGCTGT TCTGCAGCCG
GTCGCGGAGG CCATGGATGC GATCGCTGCG GCCGATCTTA GCCAGACGAG CGGGTTCGGC
CCATTCGGAC CGCAAGGAAT CGGTCAATAC ACTACATGGC GTGATTTCAT ATGCGCGATT
GCTGATCCCC ATGTGTATCA CTGGCAAACT GTGATGGACG ACACCGTCAG TGCGTCCGTC
GCGCAGGCTC TCGATGAGCT GATGCTTTGG GCCGAGGACT GCCCCGAAGT CCGGCACCTC
GTGCACGCGG ATTTCGGCTC CAACAATGTC CTGACGGACA ATGGCCGCAT AACAGCGGTC
ATTGACTGGA GCGAGGCGAT GTTCGGGGAT TCCCAATACG AGGTCGCCAA CATCTTCTTC
TGGAGGCCGT GGTTGGCTTG TATGGAGCAG CAGACGCGCT ACTTCGAGCG GAGGCATCCG
GAGCTTGCAG GATCGCCGCG GCTCCGGGCG TATATGCTCC GCATTGGTCT TGACCAACTC
TATCAGAGCT TGGTTGACGG CAATTTCGAT GATGCAGCTT GGGCGCAGGG TCGATGCGAC
GCAATCGTCC GATCCGGAGC CGGGACTGTC GGGCGTACAC AAATCGCCCG CAGAAGCGCG
GCCGTCTGGA CCGATGGCTG TGTAGAAGTA CTCGCCGATA GTGGAAACCG ACGCCCCAGC
ACTCGTCCGA GGGCAAAGGA ATAGAGTAGA TGCCGACCGA ACAAGAGCTG ATTTCGAGAA
CGCCTCAGCC AGCAACTCGC GCGAGCCTAG CAAGGCAAAT GCGAGAGAAC GGCCTTACGC
TTGGTGGCAC AGTTCTCGTC CACAGTTCGC TAAGCTCGCT CGGCTGGGTC GCGGGAGGGC
CGGTCGCAGT GATTCAGGCC CTTCTGGATT GTGTTGGTCC CCAGGGCACG ATTGTCATGC
CCACGCACTC GGGTGATCTG ACTGATCCCG CAGATTGGAG ATCGCCGCCC GTGCCTGCCG
ATTGGGTGCA GATCTCGAGT TTACCACTCC CTATCAGTGA TAGAGAAAAG TGAAAGTCGA
GTTTACCACT CCCTATCAGT GATAGAGAAA AGTGAAAGTC GAGTTTACCA CTCCCTATCA
GTGATAGAGA AAAGTGAAAG TCGAGTTTAC CACTCCCTAT CAGTGATAGA GAAAAGTGAA
AGTCGAGTTT ACCACTCCCT ATCAGTGATA GAGAAAAGTG AAAGTCGAGT TTACCACTCC
CTATCAGTGA TAGAGAAAAG TGAAAGTCGA GTTTACCACT CCCTATCAGT GATAGAGAAA
AGTGAAAGTC GAGCTCGGTA CCCGGGTCGA GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GCCTATATAA
GCAGAGCTCG TTTAGTGAAC CGTCAGATCG CCTGGAGACG CCATCCACGC TGTTTTGACC
TCCATAGAAG ACACCGGGAC CGATCCAGCC TCCGCGGCCC CGAATTCGAG CTCGGTACCC
GGGGATCTCC TCTGGGAAAT ATGGCGCACG CTGGGAGAAC GGGGTACGAT AACCGGGAGA
TAGTGATGAA GTACATCCAT TATAAGCTGT CGCAGAGGGG CTACGAGTGG GATGCGGGAG
ATGTGGGCGC CGCGCCCCCG GGGGCCGCCC CCGCACCGGG CATCTTCTCC TCCCAGCCCG
GGCACACGCC CCATCCAGCC GCATCCCGCG ACCCGGTCGC CAGGACCTCG CGCTGCAGAC
CCCGGCTGCC CCCGGCGCCG CCGCGGGGCC TGCGCTCAGC CCGGTGCCAC CTGTGGTCCA

CCTGACCCTC CGCCAGGCCG GCGACGACTT CTCCCGCCGC TACCGCCGCG ACTTCGCCGA
GATGTCCAGC CAGCTGCACC TGACGCCCTT CACCGCGCGG GGACGCTTTG CCACGGTGGT
GGAGGAGCTC TTCAGGGACG GGGTGAACTG GGGGAGGATT GTGGCCTTCT TTGAGTTCGG
TGGGGTCATG TGTGTGGAGA GCGTCAACCG GGAGATGTCG CCCCTGGTGG ACAACATCGC
CCTGTGGATG ACTGAGTACC TGAACCGGCA CCTGCACACC TGGATCCAGG ATAACGGAGG
CTGGGATGCC TTTGTGGAAC TGTACGGCCC CAGCATGCGG CCTCTGTTTG ATTTCTCCTG
GCTGTCTCTG AAGACTCTGC TCAGTTTGGC CCTGGTGGGA GCTTGCATCA CCCTGGGTGC
CTATCTGGGC CACAAGTGAA GTCAACATGC CC*A*AGCTTGT TAACATCGAT AAAATAAAAG
ATTTTATTTA GTCTCCAGAA AAAGGGGGGA ATGAAAGACC CCACCTGTAG GTTTGGCAAG
CTAGCTTAAG TAACGCCATT TTGCAAGGCA TGGAAAAATA CATAACTGAG AATAGAGAAG
TTCAGATCAA GGTCAGGAAC AGATGGAACA GCTGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG
GTAAGCAGTT CCTGCCCCGG CTCAGGGCCA AGAACAGATG GAACAGCTGA ATATGGGCCA
AACAGGATAT CTGTGGTAAG CAGTTCCTGC CCCGGCTCAG GGCCAAGAAC AGATGGTCCC
CAGATGCGGT CCAGCCCTCA GCAGTTTCTA GAGAACCATC AGATGTTTCC AGGGTGCCCC
AAGGACCTGA AATGACCCTG TGCCTTATTT GAACTAACCA ATCAGTTCGC TTCTCGCTTC
TGTTCGCGCG CTTCTGCTCC CCGAGCTCAA TAAAAGAGCC CACAACCCCT CACTCGGGGC
GCCAGTCCTC CGATTGACTG AGTCGCCCGG GTACCCGTGT ATCCAATAAA CCCTCTTGCA
GTTGCATCCG ACTTGTGGTC TCGCTGTTCC TTGGGAGGGT CTCCTCTGAG TGATTGACTA
CCCGTCAGCG GGGGTCTTTC ATTTGGGGGC TCGTCCGGGA TCGGGAGACC CCTGCCCAGG
GACCACCGAC CCACCACCGG GAGGTAAGCT GGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT
GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC
GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTTG GCGGGTGTCG GGGCGCAGCC
ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAGC
AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA
AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC
GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG
GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC
GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC
CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAAG
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA
ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG
TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG
TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT
CTTGCCCGGC GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG
TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC ATACCAGATC
ACCGAAAACT GTCCTCCAAA TGTGTCCCCC TCACACTCCC AAATTCGCGG GCTTCTGCCT
CTTAGACCAC TCTACCCTAT TCCCCACACT CACCGGAGCC AAAGCCGCGG CCCTTCCGTT
TCTTTGCT

ANHANG III: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetat
AIF	„Apoptosis Inducing Factor“
AM	Acetoxymethylester
Asc	Ascorbat
BCNU	1,3-bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff
BSO	Buthioninsulfoximin
CsA	Cyclosporin A
DCHF	Dichlorodihydrofluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doxy	Doxycyclin
2,2´-DPD	2,2´-Dipyridyl
4,4´-DPD	4,4´-Dipyridyl
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
FAC	Eisen(II)ammoniumcitrat
FAS	Eisen(II)ammoniumsulfat
FCS	Fötales Kälberserum
Fe(III)/8HQ	1:2-Komplex aus $FeCl_3$ und 8-Hydroxychinolin
Gpx	Glutathionperoxidasen
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidierte Form)
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
8-HQ	8-Hydroxychinolin
IRE	Iron Responsive Element
IRP	Iron Responsive Protein
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPO	Lipidperoxidation
MEM	Minimum Essential Medium (Eagle)
MPT	„Mitochondrial Permeability Transition“
NAc	*N*-Acetylcystein
NAD(P)H	NADH und NADPH
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
SOE	„Sequence Overlap Extension“
Tfp	Trifluoperazin
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
TRE	Tetracycline-Responsive Element
UTR	„Untranslated Region“
$\lambda_{em.}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{exc.}$	Anregungswellenlänge

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

NAME:	Ilka Lehnen-Beyel
GEBURTSDATUM/-ORT	05. Oktober 1972 in Viersen
FAMILIENSTAND:	verheiratet seit dem 23. April 1999 mit Dr. Rainer J. Lehnen

SCHULBILDUNG:

1979-1983:	Gemeinschaftsgrundschule in Nettetal-Kaldenkirchen
1983-1992:	Werner-Jaeger-Gymnasium in Nettetal-Lobberich Abschluß: Abitur

STUDIUM:

OKT. 1992 - AUG. 1997:	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum mit Vertiefungsausbildung „Biochemie“; Abschluß: Diplom-Chemiker
DEZ. 1996 - AUG. 1997:	Diplomarbeit „Analyse von Proteinen aus *Drosophila melanogaster*, die eine Substruktur der humanen 7S K RNA spezifisch binden“ am Lehrstuhl für Biochemie, AG Genregulation (Prof. Dr. B.-J. Benecke),
OKT. 1997 - SEPT. 1998:	Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum
JAN. 1999 - DEZ. 2002:	Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der medizinischen Fakultät der Universität Essen unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. H. de Groot und Priv.-Doz. Dr. U. Rauen

TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT IN:

ORIGINALARBEITEN:

Ilka Lehnen-Beyel, Herbert de Groot and Ursula Rauen:
„Enhancement of iron toxicity in L929 cells by D-glucose: accelerated (re-)reduction“
Biochemical Journal 368, 517-526 (2002)

TAGUNGSBEITRÄGE:

I. Lehnen-Beyel, H.-G. Korth, H. de Groot, R. Sustmann und U. Rauen
„D-Glucose erhöht die Eisentoxizität in L929-Zellen: Verstärkte (Re-)Reduktion“
8. Tagung „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“,
22.-24. November 2001, Halle

I. Lehnen-Beyel, H. de Groot und U. Rauen
„Einfluß des zellulären Redoxstatus auf die eiseninduzierte Schädigung von L929-Zellen“
1. Xantener Gespräch zur Medizinisch-Biologischen Chemie,
13. und 14. Dezember 2002, Xanten