

Aus der Forschungsgruppe Immunbiologie im Institut für  
Molekulare Medizin  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: **Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen**

**Stickstoffmonoxid-mediierter Stress auf  
Inselzellen des Rattenpankreas: Effekte auf die Zink-  
Homöostase, den Glutathion-Gehalt und das  
mitochondriale Membranpotential**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Ulrike Tartler**

**2009**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan  
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. V. Burkart

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in

Nitric oxide interferes with islet cell zinc homeostasis; Ulrike Tartler, Klaus-D. Kröncke, Klaus L. Meyer, Christoph V. Suschek and Victoria Kolb-Bachofen; NITRIC OXIDE: Biol. Chem. Vol. 4, No. 6, pp. 609 - 614 (2000)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Diabetes mellitus und Insulinwirkung	7
1.2 Der Typ 1 Diabetes mellitus	7
1.3 Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus	8
1.4 NO, NO-Synthasen und Wirkmechanismen	10
1.5 Zink und Insulin	14
1.6 Glutathion	17
1.7 Aufgabenstellung	18
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Geräte und Einwegartikel für die Zellkultur	20
2.1.3 Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur	20
2.1.4 Zytokine und andere Proben	21
2.1.5 Antikörper-Färbung	22
2.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe	22
2.1.7 Tiere: Wistar-Ratten	23
2.2 Methoden	<b>24</b>
2.2.1 Puffer und Kulturmedien	24
2.2.2 Gewinnung, Isolierung und Inkulturnahme von Inselzellen aus dem Pankreas	24
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau oder Propidiumiodid	25
2.2.4 Immunzytochemische Färbung von Betainsezellen	26
2.2.5 Fluoreszenz und Färbung von Inselzellen	27
2.2.6 Zinquin-vermittelten Fluoreszenz von isolierten Inselzellen	27
2.2.7 Lamininbeschichtung der Kulturplatten zur Adhäsion der Inselzellen	28
2.2.8 Versuche zur Zinkbeladung von Inselzellen und nitrosativem Stress	28
2.2.9 NO-Donoren	28
2.2.10 Zink-Homöostase: Versuche mit NO-Donoren und Mediaumtestung zur Findung geeigneter Versuchsbedingungen	29
2.2.11 Glutathion-Gehalt und Störung mit GSH-Inhibitoren	30
2.2.12 GSH-vermittelte Fluoreszenz durch den Fluoreszenzfarbstoff mBCI	30
2.2.13 GSH-abhängige Fluoreszenz nach nitrosativem Stress	31
2.2.14 Biochemische GSH-Bestimmung	31
2.2.15 Proteinbestimmung nach Lowry	32
2.2.16 Mitochondriales Membranpotential nach nitrosativem Stress	33
2.2.17 Versuche zum Inselzellverhalten nach Glukosezugabe	33
2.2.18 Durchflusszytometrische Untersuchung von Inselzellen nach nitrosativem Stress und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	34
2.2.19 Zytokin-Aktivierung der iNOS in Inselzellen	34
2.2.20 Quantitative Nitritbestimmung nach Griess	35
2.2.21 Fluoreszenzfärbung mit dem Hoechst-Reagenz	36

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1 Immunzytochemische Färbung von isolierten Betainsezellen	37
3.2 Markierung von Zn <sup>2+</sup> in isolierten Inselzellen	38
3.3 Wirkung von nitrosativem oder oxidativem Stress auf die Zink-Homöostase in Inselzellen	39
3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung von Inselzellen nach nitrosativem Stress zur Quantifizierung des freien Zink-Gehaltes	43
3.5 Versuche zur Zinkbeladung von Inselzellen und nitrosativer Stress	46
3.6 Wirkung von nitrosativem Stress auf den GSH-Gehalt in Inselzellen	46
3.7 Biochemische GSH-Bestimmung	54
3.8 Mitochondriales Membranpotential nach nitrosativem Stress und Störung des GSH-Stoffwechsels	56
3.9 Versuche zur Reassoziaton von Inselzellen nach nitrosativem Stress	64
3.10 Versuche zum Inselzellverhalten nach Glukosezugabe	65
3.11 Zytokin-Aktivierung der iNOS in Inselzellen	65
<b>4. Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1 Einfluss von NO auf die Zink-Homöostase in Pankreas-Inselzellen	68
4.2 Wirkung von NO auf den GSH-Gehalt und das mitochondriale Membranpotential	73
4.3 Synopse und Ausblick: weitere Einflüsse von NO beim Diabetes mellitus Typ 1 und Schutzmechanismen gegen NO	80
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>6. Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>98</b>
<b>8. Zusammenfassung</b>	<b>100</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCNU	Carmustin, GSH-Reduktase-Inhibitor
BSO	L-Buthionine-[S,R]-sulfaximine, $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase-Inhibitor
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniumethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat
DETA/NO <sub>NO</sub>	denitrosiertes DETA/NO
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase
GSH	Glutathion
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)
$\gamma$ -IFN	$\gamma$ -Interferon
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
INOS	induzierbare NO-Synthase
NIO	L-N <sup>5</sup> -(1-Iminoethyl)-ornithin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Spe x 4 HCl	Spermin-Tetrahydrochlorid
Spe/NO	Spermin/NO-Komplex
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine
SNOC	S-Nitrosocystein
SNOC <sub>NO</sub>	denitrosierte S-Nitrosocystein
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

## **1. Einleitung**

### **1.1 Diabetes mellitus und Insulinwirkung**

Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels, die zu einer Hyperglykämie im Nüchternzustand und postprandial führen. Es wird ein primärer von einem sekundären Diabetes mellitus unterschieden. Zur ersten Gruppe zählt der Typ 1 Diabetes (auch insulin dependent diabetes mellitus, IDDM, oder juveniler Diabetes mellitus genannt), der Typ 2 Diabetes, sowie der Gestationsdiabetes. Der sekundäre Diabetes mellitus umfasst exogene Ursachen wie Pankreaserkrankungen, endokrine Erkrankungen, medikamentös induzierte Hyperglykämien u.a.

Pathophysiologisch liegt beim Typ 1 ein absoluter Insulinmangel durch Betazelldestruktion bzw. beim Typ 2 eine gestörte Insulinsekretion sowie eine Insulinresistenz durch Insulinrezeptordefekte vor (Herold, 2001).

Die Wirkung von Insulin wird über die Bindung an Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche des Leber-, Muskel- und Fettgewebes vermittelt. Insulin beeinflusst den Glukosestoffwechsel durch mehrere Mechanismen. Zu den wichtigsten biologischen Wirkungen des Insulins gehören die Membraneffekte (wie die Beschleunigung der Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen und die Beschleunigung der Aufnahme von Aminosäuren und Kalium in Muskel- und Fettzellen) und die Metabolischen Effekte (wie Induktion der Glykogensynthese und -speicherung in Leber und Muskel, Steigerung der Triglyzeridsynthese in Leber und Fettgewebe, Speicherung von Aminosäuren im Muskel, Hemmung der hepatischen Glukoneogenese, Hemmung der Glykogenolyse, Regulation des Zellwachstums und der Proliferation durch die Aktivierung der Transkription von Genen, die den Zellzyklus kontrollieren). Plasma-Glukosespiegel und Insulinsekretion beeinflussen sich wechselseitig im Sinne eines Regelkreises. Dadurch kann der gesunde Organismus den Blutzuckerspiegel auch bei Störungen konstant halten (De Meyts, 2004).

### **1.2 Der Typ 1 Diabetes mellitus**

Von allen Diabetes mellitus Formen macht der Typ 1 Diabetes nur etwa 10% der Erkrankungen aus (Herold, 2001). Die Prävalenz in der Normalbevölkerung Mitteleuropas wird mit 0,1 bis 0,3% angegeben, wobei beide Geschlechter gleich

häufig betroffen sind (Kolb, 1996). Die genetische Prädisposition ist ein wichtiger Faktor für die Entstehung eines Typ 1 Diabetes, jedoch werden auch Umwelteinflüsse für das endgültige Auftreten der Erkrankung, wie beispielsweise Nahrungsmittelbestandteile, virale- oder bakterielle Infektionen diskutiert (Kolb, 1996). Als prädisponierende Faktoren gelten vor allem die HLA-Typen DR 3/DR 4 und DQW8 (Nerup et al., 1987), diese werden bei über 90 % der Patienten mit Typ 1 Diabetes nachgewiesen (Herold, 2001).

Die Genese des Typ 1 Diabetes ist bis heute nicht endgültig geklärt. Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die klinisch manifest wird, wenn vermutlich mehr als 80% der Betazellen des Pankreas bereits zerstört wurden. Die Folge ist ein absoluter Insulinmangel, wodurch die Glukoseaufnahme von Körperzellen beeinträchtigt wird, was wiederum zu einer Hyperglykämie führt. Die durch den Glukosemangel in den Körperzellen gesteigerte Lipolyse führt zur Anhäufung von Ketonkörpern, wodurch es zu einer Ketoazidose kommt, die sich zum lebensbedrohlichen ketoazidotischen Koma entwickeln kann. Durch eine Insulin-Substitutionstherapie kann dieses Krankheitsbild zwar umgangen werden, da eine optimale, lebenslange Blutzuckereinstellung jedoch nur selten gelingt, drohen Patienten, die an Typ 1 Diabetes leiden, Spätkomplikationen vor allem in Form von Augen-, Nerven-, Gefäß- und Nierenerkrankungen (Deckert et al., 1978; Herold, 2001). Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich am häufigsten in der Pubertät, man schätzt jedoch, dass etwa ein Drittel der Erkrankungen erst nach dem 30. Lebensjahr klinisch zu Tage treten (Kolb, 1991).

### **1.3 Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus**

1940 wurde erstmals die Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch mononukleäre Zellen beschrieben (von Meyenburg, 1940). Später konnte gezeigt werden, dass es hier zu einer selektiven, chronisch-progressiven immunvermittelten Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen kommt (Rossini et al., 1993). Hinweise auf autoimmune Prozesse bei der Pathogenese der Erkrankung ergaben sich durch den Nachweis von Inselzellantikörpern (ICA) (Botazzo et al., 1974) und Insulinautoantikörpern (IAA), die bereits lange vor der klinischen Manifestation der Erkrankung nachweisbar sind (Palmer et al., 1983). Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Antikörper identifiziert worden. Des Weiteren zeigte sich, dass es unterschiedliche Muster der gebildeten Antikörper zwischen



an Typ 1 Diabetes Erkrankten bei früher und später Manifestation gibt. So finden sich bei Patienten, die früh erkranken, vermehrt Antikörper gegen Tyrosinphosphatasen (IA-2A) und die Glutamatdekarboxylase 65 (GADA), wohingegen bei spät Erkrankten vermehrt unspezifische ICA nachweisbar sind (Seissler et al., 1998). Mit Hilfe von Inselzellautoantikörpern und GADA gelingt es bereits heute, diejenigen Personen zu identifizieren, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten 10 Jahre einen Typ 1 Diabetes entwickeln werden. Es zeigt sich aber auch, dass sich bei fehlender genetischer Prädisposition nur eine benigne Entzündung der pankreatischen Inseln (Insulitis) entwickeln kann. Zur destruktiven Insulitis mit Ausbildung eines Typ 1 Diabetes kommt es offenbar bei geeigneter genetischer Prädisposition erst nach Aktivierung einer autoaggressiven, zellvermittelten Immunreaktion (Stiefelhagen, 1998).

Um die immunologischen Vorgänge, die an der Zerstörung der Betazellen beteiligt sind, zu untersuchen, wurden zahlreiche Modellsysteme entwickelt, die wichtige Ergebnisse für den humanen Typ 1 Diabetes liefern. So zeigte sich, dass die Schädigung der Betazellen weniger durch Inselzellantikörper als vielmehr durch Insel-infiltrierende Immunzellen verursacht wird, wobei der Mechanismus der Schädigung noch nicht endgültig geklärt ist. Man geht heute davon aus, dass Mediatoren, die von diesen Zellen freigesetzt werden, wesentlich zur Betazellschädigung beitragen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Sauerstoffradikale (ROS) und NO auch in Inselzellen zu DNA-Schäden führen können. Bei der Reparatur dieser Schäden werden durch die Aktivierung des nukleären Enzyms Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) große Mengen an  $\text{NAD}^+$  verbraucht. Da es durch die Noxen gleichzeitig zu einer mitochondrialen Funktionsstörung mit konsekutivem ATP-Mangel kommt, kann  $\text{NAD}^+$  nicht mehr in ausreichendem Maße nachgebildet werden. Am Ende dieser Kaskade steht der Untergang der Betazelle (Uchigata et al., 1982; Kolb, 1993; Fehsel et al., 1993; Radons et al., 1993; Radons et al., 1994). Bestätigt wurde dieser Pathomechanismus dadurch, dass eine pharmakologische Hemmung der PARP-Aktivierung Inselzellen vor einer Lyse durch ROS (Radons et al., 1993) bzw. durch NO (Kallmann et al., 1992; Radons et al., 1994) schützt, und dass PARP-defiziente Tiere vor der Entwicklung einer Hyperglykämie geschützt sind, die durch das Betazelltoxin Streptozotocin induziert werden kann (Burkart, 2000). Hinweise auf einen autoimmunen Charakter der Erkrankung ergeben sich weiterhin

dadurch, dass eine immunsuppressive Therapie beim Menschen, etwa mit Cyclosporin A, den Krankheitsverlauf verzögern kann und zu einer Verlängerung der Remissionsphase führt (Kolb, 1996).

Bei pankreastransplantierten Patienten, deren Organ von einem HLA-identischen Spender stammt, kommt es häufig zu einer Insulitis und damit zu einem Diabetesrezidiv (Sibley et al., 1985). Des Weiteren wurde der Fall einer Patientin beschrieben, bei der vier Jahre nach einer Knochenmarkstransplantation von einem an Typ 1 Diabetes erkrankten und ICA-positivem Spender ein klassischer Typ 1 Diabetes auftrat. Die Patientin, die vor der Transplantation ICA-negativ war, wurde im Verlauf ICA-positiv (Lampeter et al., 1993). Diese Hinweise stützen eine Autoimmunhypothese des Typ 1 Diabetes. Dass die zelluläre Immunreaktion für die Betazellschädigung entscheidend ist, zeigte ein Fallbericht über einen Patienten mit M. Bruton. Bei dieser seltenen Erkrankung besitzen die Patienten keine B-Lymphozyten. Dass sich bei einem solchen Patienten trotzdem ein Typ 1 Diabetes entwickeln kann, lässt darauf schließen, dass hauptsächlich die zelluläre Immunantwort für die  $\beta$ -Zellzerstörung verantwortlich ist (Martin et al., 2001).

Insbesondere sind es offenbar Makrophagen, die in diesem Entzündungsprozess eine wichtige Rolle spielen, da sie die ersten Insel-infiltrierenden Zellen sind. Im Tiermodell scheint hierbei NO das Hauptagens der von den Makrophagen freigesetzten toxischen Mediatoren zu sein (Kröncke et al., 1991; Burkart, 2000).

#### **1.4 NO, NO-Synthasen und Wirkmechanismen**

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein ubiquitäres biologisches Signalmolekül mit physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften (Lowenstein et al, 1994). NO kann darüber hinaus auch ein wirksames zelluläres Toxin darstellen und somit einerseits in seiner Funktion als Effektormolekül der unspezifischen Immunantwort den Organismus vor eindringenden pathogenen Keimen (Granger et al., 1990) und Tumorzellen (Stuehr et al, 1989 und 1990) schützen, andererseits aber auch zur Zerstörung von körpereigenen Zellen und Geweben (Liew et al., 1991) beitragen. Die Lebensdauer von NO in biologischen Systemen beträgt je nach Konzentration mehrere Sekunden bis Minuten (Schmidt et al., 1997), wobei es mit Sauerstoff sowohl in vivo als auch in vitro hauptsächlich über Distickstofftrioxid zu Nitrit und Nitrat reagiert (Feelisch, 1991). Die jeweilige

spezifische Wirkung von NO hängt einerseits von den beteiligten Zellen und Zellsystemen, andererseits aber auch von der lokalen Konzentration an NO, der gleichzeitigen Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und der Zeitdauer der NO-Bildung ab, die durch die unterschiedlichen Isoformen der NO-Synthase vermittelt wird: Die kurzzeitige repetitive NO-Synthase durch die konstitutiv exprimierte endotheliale (eNOS) oder neuronale NO-Synthase (nNOS) vermittelt kurzfristige Reaktionen, wie z.B. die Vasorelaxation und Neurotransmission (Nathan, 1992). Im Rahmen dieser zellulären Signalübertragung diffundiert NO in die Nachbarzelle, aktiviert dort die lösliche Guanylat-Zyklase und bewirkt so eine Erhöhung der Konzentration des Second Messengers cGMP (Schmidt et al., 1994). Die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS) hingegen synthetisiert große Mengen an NO über einen vergleichsweise langen Zeitraum hinweg und wirkt als Regulator und Effektor im Rahmen entzündlicher Prozesse (Kröncke et al., 1997, Kolb et Kolb-Bachofen, 1992, Anggard, 1994).

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen) katalysieren die Bildung von NO in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff mittels einer 5-Elektronen-Oxidation aus der Aminosäure L-Arginin, wobei als Nebenprodukt Citrullin entsteht (Moncada et al., 1990 und 1993, Palmer et al., 1988). Bis heute konnten drei unterschiedliche Isoformen der NO-Synthase identifiziert werden, welche in verschiedenen subzellulären Kompartimenten vorliegen (Förstermann et al. 1991, Pollock et al., 1992) und deren Gene auf verschiedenen Chromosomen (im Menschen: nNOS: Chromosom 12, eNOS: Chromosom 7, iNOS: Chromosom 17) lokalisiert sind (Knowles et al., 1994, Marsden et al. 1993, Kishimoto et al., 1992). Alle NO-Synthasen sind im Zytosol, die eNOS und nNOS zudem noch Membran assoziiert lokalisiert (Nathan et al, 1994, Kobzik et al., 1994, Hendriks, 1995).

Die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen der NO-Synthase ließen sich erstmals in neuronalen Zellen (nNOS oder NOS-1) (Mayer et al, 1990, Bredt et al. 1990) und in Endothelzellen (eNOS oder NOS-3) (Pollock et al., 1991) nachweisen, jedoch findet man beide Enzyme auch in anderen Säugetierzellen (Knowles et al, 1994). Die dritte Isoform (iNOS) wird typischerweise durch entzündliche und immunogene Stimuli wie z.B. durch die proinflammatorischen Zytokine  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IFN), Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Nathan et al., 1994) oder Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) induziert (Michel und Feron,1997). Eine Hemmung der iNOS-Transkription

erfolgt durch Glukokortikoide und Retinoide sowie durch die TH2-Zytokine TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10 (Becherel et al. 1996). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS-2) kann in vielen verschiedenen Zelltypen, praktisch allen kernhaltigen Körperzellen wie z. B. Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Hepatozyten und Endothelzellen, induziert werden, wurde jedoch erstmals in aktivierten Makrophagen beschrieben (Hevel et al., 1991, Kröncke et al., 1995).

Anders als die konstitutive endotheliale NO-Synthase und die neuronale NOS, welche relativ geringe Mengen an NO produzieren, bildet die induzierbare NOS vergleichsweise grosse NO-Mengen (Anggard, 1994), wobei jedoch der Hauptunterschied zwischen der konstitutiven und der induzierbaren NO-Synthase vielmehr in dem Zeitraum, in dem sie aktiv sind, liegt (Laurent et al., 1996). Die Dauer der NO-Freisetzung bei den konstitutiven NO-Synthasen beträgt Sekunden bis Minuten. Die iNOS produziert NO über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen solange die Zelle und das Protein funktionell intakt sind und in ausreichender Menge Substrat (L-Arginin) und Kofaktoren zu Verfügung stehen. In vitro können iNOS-exprimierende Zellen eine steady state Konzentration von bis zu 5  $\mu$ M NO für 24 Stunden oder länger aufrechterhalten (Laurent et al., 1996).

NO reagiert sowohl mit Nukleinsäuren als auch mit Proteinen. Dies kann unter anderem in sensitiven Zielzellen zu NO-bedingten DNA-Desaminierungen und DNA-Strangbrüchen (Wink et al., 1991) führen sowie zur Nitrosierung von Thiolgruppen verschiedener zytosolischer oder membrangebundener Proteine, wie z.B. K<sup>+</sup>-Kanäle, G-Proteine, Transkriptionsfaktoren, GSH oder Enzymen (Wink et al., 1994 u. 1998). Daraus kann z. B. eine Modifikation von Enzymaktivitäten (Molina et al. 1992) oder eine indirekte NO-vermittelte Veränderung der Expression verschiedener Gene resultieren (Gopalakrishna et al. 1993).

Die vielfältigen biologischen Funktionen von NO werden durch die Kombination zweier bedeutender Eigenschaften ermöglicht: Zum einen geht NO – anders als praktisch jeder andere Botenstoff – chemische (kovalente) Bindungen mit seinem Rezeptormolekül ein, zum anderen wird seine Verbreitung durch die physikalischen Gesetze der freien Diffusion bestimmt (Lancaster, 1997), wobei Zellmembranen für NO als hydrophobem Molekül kein Diffusionshindernis darstellen.

Insbesondere hohe NO-Konzentrationen können durch Schädigung der DNA und Störung des Energiestoffwechsels, der Kalzium-Homöostase und der mitochondrialen Funktion in Abhängigkeit von der Schwere der zellulären Dysfunktion zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen (Kröncke et al., 1997, Bolanos et al., 1997).

Angriffspunkte von NO in Zellen sind Mitochondrien und Proteine mit SH-Gruppen. Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen und kommen in allen Sauerstoff verbrauchenden Geweben vor. Sie sind der Ort mehrerer essentieller Stoffwechselvorgänge wie der oxidativen Phosphorylierung, des Citratzyklus, der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren und des Harnstoffzyklus. Ihre Hauptaufgabe aber besteht in der Erzeugung von ATP durch die oxidative Phosphorylierung. Im Energiestoffwechsel werden im Verlauf der oxidativen Phosphorylierung Wasserstoff und Elektronen vom NADH/H<sup>+</sup> über die Atmungskette in mehreren Stufen auf Sauerstoff übertragen (Mitchell, 1961, Yaguzhinsky et al., 2006).

NO besitzt ein ungepaartes Elektron, ist somit ein Radikal und kann durch Reaktion mit der Häm-Gruppe Enzyme des Energiestoffwechsels hemmen (Henry et al., 1993). Außerdem wird die Reparatur von Nukleinsäuren durch Hemmung des DNS-Reparaturenzyms Formamidpyrimidin-DNS-Glykolase beeinträchtigt (Laval & Wink, 1994).

Der Hauptreaktionspartner von NO in Proteinen ist die Aminosäure Cystein, deren SH-Gruppen mit NO in Gegenwart von O<sub>2</sub> zu S-Nitrosothiolen reagieren (Wink et al., 1994; Kröncke, 2001a).

SH-Gruppen sind unter anderem durch die Bildung von Fe-S und Zn-S Clustern essentiell für die Tertiärstruktur vieler Proteine. Dabei befinden sich Fe-S Cluster meist innerhalb oder in der Nähe katalytischer Zentren von Enzymen, die durch Nitrosierung inaktiviert werden können (Gopalakrishna et al., 1993; Caselli et al., 1994). Zn-S Cluster bilden relativ stabile „Loops“ in der Aminosäuren-Kette, die unter anderem als sogenannte Zinkfinger mit der DNS, RNS oder Proteinen in Interaktion treten können (Klug & Schwabe, 1995). Kröncke et al. zeigten, dass NO unter aeroben Bedingungen Zn<sup>2+</sup> aus Zinkfinger-Strukturen freisetzt, was über eine Strukturänderung zur Hemmung der spezifischen Bindung von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (-TF) an die DNS führt (Kröncke et al., 1994; Kröncke & Carlberg, 2000, Kröncke, 2001b). NO zerstört Zinkfinger-Proteine nicht

irreversibel, da die Zinkfinger über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert werden können (Kröncke & Carlberg, 2000; Kröncke et al., 2002).

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass NO mittels S-Nitrosierung von Cystein-SH-Gruppen und anschließender Bildung von Disulfid-Gruppen Zink-Ionen aus dem  $Zn^{2+}$ -Speicherprotein Metallothionein (MT) freisetzt (Kröncke et al., 1994; Misra et al., 1996; Zangger et al., 2001). Berendji et al. zeigten, dass NO in Zellen  $Zn^{2+}$  im Zytoplasma und im Zellkern freisetzt (Berenji et al., 1997). Pearce et al. transfizierten Zellen mit einem Fusionsprotein aus MT und einem grün fluoreszierendem Protein (Pearce et al., 2000b). Eine Aktivierung der eNOS bewirkte eine Konformationsänderung des Proteins, welches auf eine  $Zn^{2+}$ -Freisetzung aus MT hinweist (Pearce et al., 2000a). Zusätzlich wurde gefunden, dass auch exogen hinzugefügtes NO eine S-Nitrosierung induziert (Liu et al., 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass NO eine Regulation der Zink-Homöostase über Interaktion mit MT bewirkt (St Croix et al., 2002; Gow & Ischiropoulos, 2002).

Hier wurden nur einige Wirkmechanismen von NO beschrieben, die etwas von der Vielfalt zeigen können, die von diesem kleinem Molekül ausgeht, welches sowohl zytotoxisch als auch zytoprotektiv wirken kann. Es scheint, dass abhängig von der Dauer und Stärke der Aktivierung der iNOS es zu sehr unterschiedlichen Reaktionen kommen kann, welche aufgrund bisherigen Wissens noch nicht vorhergesagt werden können. Diese Problematik bekommt eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Therapie von chronisch entzündlichen, autoimmunen oder Tumorerkrankungen, die entweder von der Gabe von NO-Donoren oder von einer selektiven Hemmung der iNOS profitieren könnten (Kröncke et al., 2000).

## **1.5 Zink und Insulin**

Eine adäquate Zinkaufnahme mit der Nahrung und die Aufrechterhaltung der  $Zn^{2+}$ -Homöostase ist von besonderer Bedeutung für die Integrität des Organismus. Ein gesunder Erwachsener hat etwa 2-3 g (30-45 mmol) Zink, wovon sich 99% intrazellulär befindet. Der tägliche Zinkbedarf liegt bei 10-15 mg und wird normalerweise mit der in den Industriestaaten üblichen Ernährung gedeckt.

Zink ist in Form von Zinkionen ein essentieller Mikronährstoff, der für die DNS-Synthese, die Zellteilung und die Proteinsynthese benötigt wird. Als strukturelle

und/oder funktionelle Komponente in Metalloenzymen und Metalloproteinen (Coleman, 1992) hat es zwei Wirkungen. Auf der einen Seite hält es durch koordinative Bindungen mehrere Aminosäurenketten des Proteins in einer bestimmten Anordnung fest, welche zur Einleitung einer enzymatischen Reaktion essentiell ist. Auf der anderen Seite kann es durch weitere koordinative Bindungen das Substrat festhalten, polarisieren und zur Reaktion aktivieren. Somit hat Zink Einfluss auf viele Aspekte des Zellmetabolismus. Besonders wichtig ist hierbei seine Funktion im Immunsystem (Fraker et al., 2000), die Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress (Powell, 2000) sowie die Beeinflussung von Wachstum und Entwicklung (MacDonald, 2000).

Das intrazelluläre Zinkspeicherprotein Metallothionein (MT) spielt eine wichtige regulierende Rolle bei der Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Freisetzung von Zink. Obwohl MT schon seit vielen Jahren Grundlage intensiver Forschung ist, wurde seine Bedeutung noch immer nicht endgültig geklärt (Palmiter, 1998; Coyle et al., 2002). Metallothionein (MT), ein intrazelluläres Metalloprotein, mit dem Molekulargewicht von 6-7 kD besteht zu einem Drittel aus Cysteinen. Über Zn-S Bindungen können bis zu 7 Zinkionen komplexiert werden. Die in den Zn-S-Clustern verwendeten Schwefelatome werden von 20 Cysteinen zur Verfügung gestellt. Hauptsächlich wird  $Zn^{2+}$  von MT gebunden, wodurch Zn-MT entsteht. Selbst in evolutionär entfernten MT existieren ähnliche Metall-Schwefel-Cluster, was die besondere Bedeutung dieser Strukturen zeigt (Vasak & Hasler, 2000).

Eine Hauptfunktion von Metallothionein scheint die Regulation der Zink-Homöostase zu sein. Die Zinkanreicherung im Gewebe korreliert mit einer *de novo* MT-Synthese (Richards & Cousins, 1975; McCormick et al., 1981). Unter Zinkdeprivation spielt MT die Rolle eines  $Zn^{2+}$ -Scavengers (Suhy et al., 1999). MT ist zugleich auch ein Stressprotein, das eine wichtige Funktion bei der Wirkung von Umweltgiften hat. Eine besondere Rolle spielt der Schutz vor einer Cadmium-Vergiftung (Masters et al., 1994) und vor oxidativem Stress. Dies äußert sich in einem Schutz vor z. B.  $H_2O_2$ -induzierten DNS-Einzelstrang-Brüchen (Bofill et al., 2001), vor reaktiven Stickoxiden (Schwarz et al., 1995; Cai et al., 2000) und vor tert-Butyl-Hydroperoxid (Schwarz et al., 1994). In Entzündungsreaktionen wird Metallothionein, welches in den meisten untersuchten Zellen konstitutiv im

Zytoplasma vorhanden ist, durch die Anwesenheit von Zytokinen vermehrt exprimiert (De et al., 1990).

Auf zellulärer Ebene scheint das Zinkspeicherprotein Metallothionein eine zentrale Rolle in der Regulation des Zinkmetabolismus zu spielen (Richards, 1989; Kagi, 1991). Die Analyse von Leukozyten und Erythrozyten bezüglich ihrer Metallothionein-Expression scheint ein geeigneter Ansatz bei der Beurteilung des Zinkstatus im Organismus zu sein (Sullivan et al., 1998; Cao & Cousins, 2000).

Zink spielt eine wesentliche Rolle bei der Biosynthese, Speicherung und Sekretion von Insulin in Pankreasbetazellen. Bei Säugetieren enthalten die Betazellen der Pankreasinseln sehr hohe Zink-Konzentrationen. Auch fand man einen erniedrigten Insulingehalt in Inselzellen bei bestehendem Zink-Mangel-Zustand (Roth et al., 1981, Chausmer, 1998). Setzte man Inselzellen hohen Glukosekonzentrationen oder anderen sekretionsauslösenden Mechanismen aus, wurde eine Abnahme des freien zellulären Zink-Gehaltes beobachtet. Dies deutet auf dessen Rolle bei der Insulin-Synthese, Speicherung und Sekretion hin (Zalewski et al., 1994). Auch wurde ein stark verminderter  $Zn^{2+}$ -Gehalt in Pankreasinseln beim Typ1- wie auch beim Typ2-Diabetes mellitus beobachtet (Chausmer, 1998) und die Frage nach der pathogenetischen Wirkung der Zink-Entleerung bei der Entstehung des Diabetes mellitus diskutiert.

Insulin ist das wichtigste Hormon bei der Regulation der Blutglukosekonzentration und ist essentiell im postprandialen Stadium (Sesti, 2006). Wenn die Blutzuckerkonzentration nach Nahrungsaufnahme steigt, wird Insulin von den Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas, wo es auch synthetisiert wird, sekretiert. Die genetische Information für die Synthese von Insulin wird von nur einem Gen-Lokus im kurzen Arm des Chromsoms 11 codiert. Insulin ist ein Makromolekül mit einem Molekulargewicht von etwa 5.700 Dalton. Ein Insulin-Monomer besteht aus 2 Aminosäureketten, Kette A umfasst 21 Aminosäuren, Kette B 30 Aminosäuren. Diese beiden Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken verbunden. In Lösung hat Insulin die Tendenz, unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken Dimere zu bilden. In Anwesenheit von Zink bilden sich aus den Dimeren sogenannte Hexamere (De Meyts, 2004). Das Insulinmolekül wird dann als Hexamer durch ein Zinkion stabilisiert in Vesikeln in der Betazelle



gespeichert, bis es als Reaktion auf einen erhöhten Blutzuckerspiegel freigesetzt wird. Ein steigender Blutzuckerspiegel (ab ca. 4 mmol Glukose/l Blut) als Sekretionsreiz führt schließlich durch Verschmelzen der Membranen (Exozytose) zur Entleerung des Vesikelinhaltes in den Extrazellulärraum.

## 1.6 Glutathion

Dem Glutathion (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin, GSH) kommt in Zellen eine wesentliche Bedeutung als wasserlösliches Antioxidans zu. Es hat eine Sulfhydryl-Gruppe als funktionelle Gruppe. Die Biosynthese von Glutathion erfolgt durch zwei Enzyme, die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und die Glutathion-Synthetase (Coblenz und Wolf, 1994, Anderson, 1998).

GSH spielt eine herausragende Rolle beim zellulären Schutz vor oxidativem Stress (Griffith, 1999), in dem es schnell und nicht-enzymatisch mit Hydroxylradikalen, Peroxynitrit und dem Superoxidanion-Radikal reagiert (Kalyanaraman et al., 1996, Luperichio et al., 1996, Briviba et al., 1999). Weitere physiologische Funktionen von GSH, wie Speicherung und Transport von Cystein, Regulation des zellulären Redoxgleichgewichts, Leukotrien- und Prostaglandin-Metabolismus, Immunfunktion und Zellwachstum wurden beschrieben (Sies, 1999). Über die Reaktion der Glutathionperoxidasen nimmt GSH darüber hinaus an der Detoxifikation von Hydrogenperoxiden und Lipidperoxiden teil. All diese Reaktionen führen direkt oder indirekt zur Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG), welches wiederum mit Hilfe der Glutathionreduktase (GR) NADPH-abhängig wieder zu GSH reduziert werden kann.

Unter Normalbedingungen kann mit Hilfe der GR ein Verhältnis von GSH zu GSSG von >100 aufrechterhalten werden. Im Falle eines erhöhten oxidativen Stresses bzw. einer insuffizienten GR-Aktivität (z.B. ausgelöst durch eine NADPH-Depletion) kann GSSG akkumulieren. Dies führt zu einer Veränderung des Thiol-Redoxstatus der Zelle und kann dadurch die Aktivierung redoxabhängiger Transkriptionsfaktoren auslösen (Sen und Packer, 1996).

Nikulina et al. zeigten, dass ein erniedrigter GSH-Gehalt die IL-1 $\beta$ -induzierte NO Produktion durch die Erniedrigung der iNOS-Gen-Expression in Inseln, isolierten Betazellen und Insulinoma Zellen beeinträchtigt (Nikulina et al., 2000).

Eine bekannte Methode, um GSH in kultivierten Zellen zu messen, ist dem Kulturmedium Monochlorobimane wie mBCl zuzugeben, wo es in die Zellen eindringt und fluoreszierende GSH-Monochlorobimane Verbindungen bildet, die

fluorometrisch gemessen werden können. Diese Reaktion wird durch die Glutathion-S-Transferase katalysiert (Kamencic et al., 2000).

## **1.7 Aufgabenstellung**

Bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 geht man heute davon aus, dass es sich um einen autoimmunen Prozess handelt, durch den inselinfiltrierende Immunzellen wie z. B. Makrophagen Betainselzellen schädigen und schließlich zerstören. Einer der Hauptmediatoren, der zu einer Zerstörung der Betazelle führt, scheint das im Verlauf einer Insulitis von aktivierten Makrophagen produzierte NO zu sein. Es ist bekannt, dass NO die Insulinsekretion hemmt und es wird vermutet, dass diese Wirkung zur Pathogenese des Typ1 Diabetes beiträgt (Eizirik et al., 1997).

Durch Hemmung der iNOS, die auch in Makrophagen nachweisbar ist, gelang es in der Vergangenheit bereits das Krankheitsbild im Tiermodell zu verzögern (Wu, 1995).

Da exogen zugefügtes NO eine intrazelluläre  $Zn^{2+}$ -Freisetzung in verschiedenen Zellen (Berendji et al., 1997) und auch eine Nitrosierung von Thiolgruppen (Kröncke et al., 1994) bewirkt sowie Effekte auf die mitochondriale Atmungskette (Henry et al., 1993) hat, sollte untersucht werden, welchen Einfluss NO auf die Zink-Homöostase, den Glutathion-Gehalt und das mitochondriale Membranpotential von isolierten Inselzellen der Ratte hat.

Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, akut-inflammatorische oder chronisch-autoimmune Krankheitsprozesse in der Pathogenese des Diabetes mellitus besser zu verstehen und möglicherweise Ansätze für eine Therapie zu finden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von nitrosativem Stress auf die Zinkhomöostase, den Glutathion-Gehalt und das mitochondriale Membranpotential isolierter Pankreasinselzellen der Ratte untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Kationisiertes BSA: kationisiertes bovine serum albumin	Aurion, Wageningen (NL)
DTNB	Sigma
DMSO: Dimethylsulfoxid	Merck
EDTA: Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck
Eukitt (Roti-Histokitt ®)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia, Heidelberg
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Hämatoxylin-Lösung	Sigma
HCl	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Kollagenase (0,3 U/mg)	Serva, Heidelberg
K-Na-Tartrat	Sigma
L-Cystein-HCl	Sigma
L-Histidin-HCl	Sigma
Maleinsäure	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
MOPS	Sigma
NaNO <sub>2</sub>	Sigma
NEDDC: N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid	Sigma
PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Sarcosyl	Boehringer
Sulfanilamid	Sigma
TRIS-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	Merck
Trypanblau: 20%ige Lösung	Gibco, Eggenstein

Xyloersatz XEM-200	Vogel, Giessen
ZnCl <sub>2</sub>	Merck

### 2.1.2 Geräte und Einwegartikel für die Zellkultur

Plastikartikel für die Zellkultur (6-well-Platten, 12-Well-Platte, 6 mm-Schalen, 10 mm-Schalen. Lab-Tek Chamber slides)	Falcon (Becton Dickinson), Heidelberg, und Nunc, Wiesbaden
Nylon-Zellsieb	Falcon (Becton Dickinson)
Brutschrank: 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit, 5% CO <sub>2</sub> , 95% Luft	Heraeus, Osterode
ELISA-Reader: Titertek Multiscan Plus	Flow Laboratories, Heidelberg
Ultraspec 2000, UV/ Visible Spectrometer	Pharmacia
Sterilbank: Lamin Air	Heraeus
Tischzentrifuge: Zentrifuge 5412	Eppendorf
Zellzentrifuge: Minifuge GL	Heraeus
Fluoreszenzmikroskop: Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Filter Set 02: Anregung: 365 nm, Emission LP: 420 nm Filter Set 15: Anregung: 550 nm, Emission LP: 590 nm	Zeiss
FACS-Gerät: FACStarPlus	Becton Dickinson
Laser: 5-W Argonionenlaser	Innova 305, Palo Alto, USA
FACStarPlus software	Becton Dickinson
FACS-Filter: Bandpass-Filter 330WB60	Omega Optical, Brattleboro, USA

### 2.1.3 Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM: Dulbeccos minimal essential medium	Gibco, Eggenstein
FCS: Fetal calf serum (Endotoxin-frei) Inaktiviert 30 min bei 56°C	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glutamax I: (L-Alanyl-Glutamin) (100 x)	PAA Laboratories
HBSS: Hanks buffered salt solution (10x)	Gibco

HEPES	Gibco
MEM: Non essential amino acids	Gibco
Pen-Strep: Penicillin-Streptomycin (10000 IU/ml-10000 IU/ml)	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Trypsin (0,45 U/ mg)	Serva
PBS (phosphat gepufferte Salzlösung)	Sigma
Laminin	Sigma
Glutathion	Sigma
Glucose	Merck
EGTA	Merck

#### 2.1.4 Zytokine und andere Proben

$\gamma$ -IFN: Rekombinantes murines Gamma-Interferon	PBH, Hannover
IL-1 $\beta$ : Rekombinantes humanes Interleukin-1 $\beta$	PBH
TNF- $\alpha$ : Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	PBH
SNOC	Synthese nach Mirna und Hofmann, 1969
Spe/NO	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke, die Synthese erfolgte nach Drago et Paulik, 1960 bzw. Hrabie et al., 1993
Spe x 4 HCl (Spermin-Tetrahydrochlorid)	Aldrich, Steinheim
SNAP	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke, Synthese erfolgte nach Field et al., 1978
DETA (Bis-(2-Aminoethyl)-Amin)	Aldrich, Steinheim

DETA/NO	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke, Synthese nach Hrabie et al., 1993
NIO(L-N <sup>5</sup> -(1-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid)	Alexis, Grünberg
Streptozotocin (N-(Methyl'nitrosocarbamoyl)-alpha-D-glucosamin)	Merck
Zn(II)-His-Complex	Synthese aus ZnCl <sub>2</sub> und L-Histidin-HCl
Nitroprussid	Merck
BSO (L-Buthionine-[S,R]-sulfaximine)	Sigma
BCNU (Carmustin, 1,3-Bis(2-Chlorethyl)-1-Nitrosourea)	Bristol-Myers Squibb
Diamide	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck

### 2.1.5 Antikörper-Färbung

Meerschweinchen anti-Ratten-Insulin-AK	DAKO A/S Denmark
Ziege anti-Meerschweinchen-Ig	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Vectastain ABC-Peroxidase Kit	Camon, Wiesbaden
DAB (3.3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat)	Kem-En-Tec, Kopenhagen (DK)

### 2.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Zinquin: [2-methyl-8-p-toluolsulfonamido-6-quinoloxyl]acetat]	Alexis, Grünberg
HOECHST 33342 [(2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol)]	Sigma
mBCI [Monochlorobiman]	Molecular Probes
DIOC <sub>2</sub> (5) [3-3 Diethyloxadicarbocyanine iodide]	Molecular Probes
Propidiumiodid	Sigma

### **2.1.7 Tiere: Wistar Ratten**

Wistar Ratten: Männliche Tiere, ca 150-250 g schwer und 30–60 Tage alt, stammten aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Tiere erhielten eine Standard-Diät und Trinkwasser ad libidum.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Puffer und Kulturmedien

500 ml RPMI 1640 Kulturmedium (ohne Glukose und ohne Glutamat) wurde mit 5,5 ml Natriumpyruvat (100 mM), 5,5 ml L-Glutamin (200 mM), 5,5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM 100x), 4 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ml), 5,5 ml HEPES (1M) und mit unterschiedlichen Gukose-Konzentrationen (11 mM; 5,5 mM) und 0 %, 2 % , 5% - 10 % FCS supplementiert.

PBS (phospate buffered salt) bestand aus 137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

HBSS/ 10 mM HEPES, pH 7, 4, steril filtriert, bestand aus 100 ml HBSS 10 x + 10 ml 1M HEPES + 890 ml Aqua bidest.

HBSS/ 10 mM HEPES/ 10 % FCS, steril, bestand aus 270 ml HBSS/ 10 mM HEPES + 30 ml FCS 100 %.

Ficoll 25% pH 7,4, autoklaviert , bestand aus 100 g Ficoll + 300ml HBSS/ 10 mM HEPES.

Inselzellvereinzelungspuffer pH 7,4, steril filtriert, bestand aus HBSS (Ca und Mg frei) + 10 mM HEPES + 3 mM EGTA + 4 mM Glucose + 2 % BSA.

### 2.2.2 Gewinnung, Isolierung und Inkulturnahme von Inselzellen (Primär-Zellkulturen) aus dem Pankreas der Wistar Ratte

Die Ratten wurden mit Diethylether getötet. Das Pankreas wurde mit etwa 8-10 ml eiskalter Collagenase-Lösung (1,2 U/mg; 6 mg Collagenase pro 10 ml HBSS/10 mM HEPES) durch den Ductus pancreaticus gebläht, von umgebendem Gewebe abgetrennt und etwa 45 min. (Minuten) lang bei 37° C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Pankreas wurde in einem 15 ml Falcon-Röhrchen kräftig geschüttelt (vortexen) und einige Sekunden bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Das Pankreas wurde in 5 ml HBSS/10 mM HEPES aufgenommen, durch ein Sieb (600 µm Maschenweite) passiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min, 250 g). Zum Zentrifugat wurden 6 ml einer eiskalten 25 %igen Ficoll-Lösung (in HBSS/10mM HEPES) gegeben, das Gewebe suspendiert und auf drei Falcon-Röhrchen verteilt. Anschließend wurde vorsichtig ein Gradient bestehend aus je 2 ml einer 23%igen, einer 20 %igen und einer 11%igen eiskalten Ficoll-



Lösung hergestellt und 10 min. lang bei 1200 g zentrifugiert (ohne Bremse). Die Inseln wurden mittels Pasteurpipette aus den oberen beiden Phasengrenzen isoliert, in HBSS/10 mM HEPES/10% FCS überführt und dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Inseln unter dem Lichtmikroskop zur Abtrennung von exokrinem Pankreasgewebe mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette isoliert und in HBSS 1x/10 mM HEPES/10 % FCS aufgenommen.

Zur Vereinzelung der Inselzellen wurden die Inseln 10 Min lang in 6 ml Vereinzelungspuffer und 150 µl Trypsin-Lösung 0,25% (125 µg/ml) bei 37 °C inkubiert, geschüttelt, 4 x durch eine Kanüle Nr. 18, 25 G in eine 1ml Spritze gezogen und durch eine graue Kanüle Nr. 12, 22 G in RPMI/ 10% FCS überführt. Anschließend wurde noch 2 x mit RPMI/10 % FCS gewaschen. Die Ausbeute betrug etwa  $1-2 \times 10^6$  Inselzellen pro Ratte, die Vitalität der Zellen (Trypanblau-Ausschlusstest) lag nach Zellvereinzelung bei 70-90 %.

In einer 12-Well-Platte wurden pro Well  $10^5$  Inselzellen in 1 ml Medium kultiviert.

### **2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau oder Propidiumiodid**

Trypanblau-Lösung: 0,5 % Trypanblau in einer 0,9%igen NaCl-Lösung

Propidiumiodid-Lösung: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O (1,5 mM)

Zur Bestimmung der Zell-Vitalität wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewandt. Die Methode der Trypanblau-Färbung beruht auf dem Prinzip, dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, während tote Zellen blau angefärbt werden. Die Inkubationszeit beträgt eine Minute; bei zu langer Inkubationszeit nehmen auch lebende Zellen den Farbstoff auf. Die Zellzahl sowie die Zellvitalität wurde durch Auszählen der Zellen nach Färbung mit Trypanblau-Lösung (bestehend aus 0,5%ige Trypanblau in 0,9%iger NaCl, Verdünnungsfaktor 5) in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Das kationische Fluorochrom Propidiumiodid wird aus lebenden Zellen ausgeschleust und kennzeichnet ebenso wie Trypanblau nekrotische Zellen, indem es Zellmembranschäden nachweist (Belloc et al., 1994). Propidiumiodid bindet an die DNA geschädigter Zellen und zeigt eine rote Fluoreszenz. Nach 10-minütiger Inkubation mit der Propidiumiodid-Lösung im Verhältnis 1:200

(Endkonzentration: 7,5  $\mu\text{M}$ ), wurde durchflusszytometrisch die Fluoreszenz der Inselzellen (Extinktion: 520 nm, Emission: 160 nm) gemessen.

#### **2.2.4 Immunzytochemische Färbung von Betainselzellen**

Um Betainselzellen von den anderen Inselzelltypen zu unterscheiden, wurden die Insulin-produzierenden Betazellen mittels einer Anti-Insulin-Antikörper-vermittelten Anfärbung dargestellt.

##### *Lösungen:*

-Fixierlösung: Aceton

-0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol

-PBS-Puffer (1 x)

-Ansatz Ratten-Normalserum: Normalserum + PBS mit 0,5% kationisiertem BSA, pH 7,2

-Substratlösung (frisch angesetzt): 0,05% Diaminobenzidinlösung in PBS (pH 7,2) mit 0,025%  $\text{H}_2\text{O}_2$

-Hämatoxylin-Lösung (zur Kerngegenfärbung)

-Antikörper-Lösung:

Alle Antikörper wurden in 0,25% kationisiertes BSA in PBS pH 7,2 verdünnt.

1° Antikörper: Meerschweinchen anti-Ratten-Insulin 1:500-1:1000

2° Antikörper: Ziege anti-Meerschweinchen IgG 1:100

-ABC-Reagenz (Vectastain-ABC-Peroxidase-Kit)

(hergestellt nach Anweisung des Herstellers (Camon, Wiesbaden))

##### *Versuchsdurchführung:*

Zellen ( $1,5 \times 10^4$ ) wurden in je eine Kammer der 8er Glas Lab-Tek Chamber-Slides ausgesät. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen unter einem kalten Luftstrom getrocknet und 10 min lang mit Aceton fixiert. Danach wurden die Zellen zur Inaktivierung endogener Peroxidase für 30 min mit 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol inkubiert und anschließend 3 x 5 min in PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu vermeiden, wurden die Proben 20 min lang mit dem Normalserum-Ansatz und anschließend mit 10  $\mu\text{g/ml}$  eines Meerschweinchen anti-Ratten-Insulin-Antikörpers in 0,5% kationisiertem BSA/PBS 1 Stunde (h) lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden Proben als Negativkontrolle nur mit 0,5% kationisiertem BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3 x mit PBS gewaschen und 30 min lang mit 10  $\mu\text{g/ml}$  des Sekundärantikörpers in der feuchten Kammer bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte eine Inkubation der Proben mit dem ABC-Reagenz für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben wiederum gewaschen, 5 min lang mit DAB-Substratlösung behandelt und wieder gewaschen. Nach Durchführung der Hämatoxylin-Kerngegenfärbung und Entwässerung der Proben mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen und Xylolersatz wurden die Präparate in Eukitt eingebettet. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe eines DAB-Filters ausgewertet. Mit Hilfe der Mikroskop Kamera MC 100 Spot wurden Aufnahmen zur Dokumentation der Ergebnisse angefertigt.

### **2.2.5 Fluoreszenz und Färbung von Inselzellen**

Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /Vertiefung) wurden in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert und nach Zugabe von 25  $\mu$ M Zinquin für 30 min bei 37 °C, von 15  $\mu$ M HOECHST 333425 (10  $\mu$ g/ml) für 5 min bei 37°C, 80  $\mu$ M mBCI (Mono-Chlorobimane) für 5 min bei 37°C, 50 ng/ml DIOC<sub>2</sub>(5) für 10 min bei 37 °C oder 10  $\mu$ M Propidiumiodid für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden nach Färbung mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen (Zinquin, mBCI oder HOECHST 333425) unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen) mit dem Zeiss Filter Set 02 (Anregung 365 nm, Emission LP 420 nm) bzw. nach der Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen (DIOC<sub>2</sub>(5), Propidiumiodid) mit dem Zeiss Filter Set 15 (Anregung 550 nm, Emission LP 590 nm) untersucht und mit einer Mikroskop-Kamera MC 100 Spot (Zeiss) fotografiert. Zur Dokumentation wurden Aufnahmen mit einer konstanten Belichtungszeit gemacht. Parallel wurden Phasenkontrast-Bilder zur Darstellung der Zellen angefertigt.

### **2.2.6 Zinquin-vermittelten Fluoreszenz von isolierten Inselzellen**

Unbehandelte, ungefärbte und mit Zinquin gefärbte Inselzellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Filter 02 untersucht und die Fluoreszenz in den Zellkompartimenten (Zellkern, Zytoplasma, Granula) beurteilt.

Das Sulfonamidoquinolin (Zinquin) ist ein nicht fluoreszierendes Membran-permeables Fluorophor. Intrazellulär wird es durch Esterasen in die Membran-impermeable Zinquin-Säure umgewandelt und akkumuliert daher in der Zelle (Coyle et al. 1994). Zinquin ist hochspezifisch für Zink. Aus der Gruppe der Schwermetalle werden nur Cadmium und Silber mit ähnlich hoher

Bindungskonstante gebunden, welche aber in Zellen und Geweben nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen und aus diesem Grund zu vernachlässigen sind. Nach spezifischer Bindung von  $Zn^{2+}$  und Anregung mit UV-Licht wird Zinquin stark fluoreszenzaktiv (Zalewski et al., 1994) und kann deshalb gut benutzt werden, um eine NO-medierte Modulation der freien intrazellulären  $Zn^{2+}$  Konzentrationen zu detektieren.

### **2.2.7 Lamininbeschichtung der Kulturplatten zur Adhäsion der Inselzellen**

Laminin 1mg / 1 ml 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris

Um die Bildung eines Gels zu verhindern, wurde Laminin bei 2-8 °C langsam gemäß Herstellerempfehlung aufgetaut. Optimale Bedingungen für die Anhaftung müssen für jede Zelllinie und Applikation gesondert bestimmt werden. 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Laminin wurde auf den Zellkulturplatten für die Adhärenz der Inselzellen eingesetzt. Anschließend wurde Laminin in der offenen Kulturplatte über Nacht oder in wenigen Stunden in der Sterilbank getrocknet. Danach wurden die beschichteten Platten mit Medium gewaschen, um Salzkristalle zu entfernen.

Die Lamininbeschichtung zeigte keinen Einfluss auf die Fluoreszenzfärbungen.

### **2.2.8 Versuche zur Zinkbeladung von Inselzellen und nitrosativem Stress**

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5/1\text{ml}$  Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glukose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert. Zu 2 Proben wurde direkt nach Vereinzeltung 100 $\mu\text{M}$  Zn (II)-His-Complex dazugegeben, eine 10 - 12 stündige Erholungsphase eingehalten, die Zellen mit frischem Medium gewaschen und in eine neue 12-well-Zellkulturplatte überführt.

Dann wurde Zink-beladene und -unbeladene Proben ohne und mit 0,5 mM DETA/NO für 24 h inkubiert, mit Zinquin gefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, photographiert und die Vitalität bestimmt.

### **2.2.9 NO-Donoren**

Zur Synthese einer 100 mM Stammlösung von SNOC (Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ): 20-25 min bei 37 °C) wurden 0,69 mg  $\text{NaNO}_2$  und 1,76 mg Cys-HCl in 96  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, mit 2  $\mu\text{l}$  HCl (1 M) und 1,5  $\mu\text{l}$  NaOH (1 M) versetzt. Die denitrosierte Komponente

SNOC<sub>-NO</sub> wurde nach Inkubation der Stammlösungen für 1 Woche bei 37°C erhalten.

DETA/NO ( $t_{1/2}$ : 7-8 h bei 37 °C) wurde nach der Methode von Hrabie et al. (Hrabie et al., 1993) synthetisiert, charakterisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke zur Verfügung gestellt. Die denitrosierte Komponente DETA/NO<sub>-NO</sub> wurde nach Inkubation einer 50 mM Stammlösung für 1 Woche bei 37°C erhalten.

Des Weiteren wurden Spe/NO ( $t_{1/2}$ : 40 min bei 37 °C) und Spe x 4 HCl (Spermin-Tetrahydrochlorid), SNAP ( $t_{1/2}$ : ca. 4 h bei 37 °C), Nitroprussid ( $t_{1/2}$ : < 10 min bei 37 °C) als NO-Donoren in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

Zudem wurden Streptozotocin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den angegebenen Konzentrationen als oxidative Stressoren eingesetzt.

## **2.2.10 Zink-Homöostase: Versuche mit NO-Donoren und Mediaustestung zur Findung geeigneter Versuchsbedingungen**

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelteten Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/well) in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert und eine 10 - 12 stündige Erholungsphase eingehalten. Anfangs wurde Medium mit 10 % FCS und 11 mM Glukose eingesetzt. Es folgten neun Versuche (jede Probe erfolgte immer im Doppelansatz), in denen die Inselzellen ohne und mit verschiedenen NO-Donoren (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 mM SNAP/NO, 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 mM SNOC, 1mM SNOC<sub>-NO</sub>, 0,25; 0,5; 1 mM DETA/NO, 0,5 mM Nitroprussid) unterschiedlich lange (1-24 h) inkubiert, anschließend mit Zinquin gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 60-facher Vergrößerung untersucht wurden.

Es zeigten sich keine Fluoreszenzunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Deshalb wurden Inselzellen in Medium, das 11 mM Glukose und 2,5 % oder 10 % FCS enthielt, über 12 h und 24 h ohne und mit NO-Donoren (0,25 mM oder 0,5 mM DETA/NO, 0,5 mM SNAP oder 0,5 mM Nitroprussid) inkubiert. In den Proben mit 2,5 % FCS-haltigem Medium zeigten sich Fluoreszenzunterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Proben.

Des Weiteren wurden Versuche zur weiteren Austestung optimaler Mediumzusammensetzungen durchgeführt. Inselzellen wurden dabei in Medium

mit unterschiedlichen FCS- (0; 1; 2,5 %) und Glukosekonzentration (0; 1; 5,5; 11 mM) nach Inkubation über Nacht und weiteren 24 Stunden untersucht.

Für alle folgenden Versuche wurde ein Medium mit physiologischem Glukosegehalt von 5,5 mM und 2,5 % FCS gewählt – falls nicht anders vermerkt.

Nun folgten Versuche, in denen Inselzellen erneut ohne oder mit SNAP (0,1; 0,25 und 0,5 mM) oder DETA/NO (0,1; 0,25 und 0,5 mM) für 12 h oder 24 h inkubiert, zinquingefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden.

Auch wurden die Inselzellen erneut ohne und mit Streptozotocin (0,25; 0,5 und 1mM) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 u. 1 mM) für eine Stunde inkubiert, zinquingefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### **2.2.11 Glutathion-Gehalt und Störung mit GSH-Inhibitoren**

Glutathion (GSH) ist das wichtigste intrazelluläre niedrig-molekular-gewichtige Thiol und spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Abwehr gegenüber Wirkstoffen, die oxidativen Stress auslösen. Für alle folgenden Versuche zum GSH-Gehalt wurden nach der Inselzellisolierung die vereinzelt Inselzellen (1 x 10<sup>5</sup>/1ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS - falls nicht anders vermerkt- und 5,5 mM Glukose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert.

Zunächst wurde der GSH-Stoffwechsel der Inselzellen nach Inkubation mit dem  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase-Inhibitor: BSO (L-Buthionine-[S,R]-sulfaximine), der die GSH-Synthese hemmt, und /oder dem GSH-Reduktase-Inhibitor: BCNU (Carmustin) in den angegebenen Konzentrationen und Zeiten untersucht.

Diamid (Oxidans) wurde als positiv Kontrolle eingesetzt. (Reaktion: GSH + GSH → GSSG)

### **2.2.12 GSH-vermittelte Fluoreszenz durch den Fluoreszenzfarbstoff mBCI**

MBCI kann als ein Fluorochochorm-Indikator für den Glutathion-Gehalt genutzt werden. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 380 nm, sein Emissionsmaximum bei 460 nm. Es dringt in die Zellen ein und bildet fluoreszierende GSH-Monochlorobimane Verbindungen, die fluorometrisch gemessen werden können. Diese Reaktion wird durch die Glutathion-S-Transferase katalysiert (Kamencic et al., 2000).

Die Inselzellen wurden mit dem GSH-Fluoreszenzfarbstoff mBCI in den angegebenen Konzentrationen (16, 32, 80, 160, 320, 640  $\mu\text{M}/1\text{ ml Medium/well}$ ) zu unterschiedlichen Zeiten nach Inselzell-Vereinzelung (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 12 h, 24h, 48 h) angefärbt und mikroskopisch untersucht.

Aufgrund der Ergebnisse (Kontrast) hinsichtlich Fluoreszenz der Zellen und Hintergrundfluoreszenz wurde in den folgenden Versuchen 80  $\mu\text{M}$  mBCI /1 ml Medium/well eingesetzt.

### **2.2.13 GSH-abhängige Fluoreszenz nach nitrosativem Stress**

1 Stunde nach Zellvereinzelung wurden die Inselzellen bei 37 °C ohne und mit unterschiedlichen Zusätzen (SNOC, Spe/NO, BCNU, BCNU + SNOC, BCNU + Spe/NO, BSO, Diamide, Diamide + BCNU, Diamide + BSO, SNOC + BSO, Spe/NO + BSO, BCNU + BSO) unterschiedlich lange (1/2, 1, 2, 4, 12, 24h) inkubiert. Nach der Inkubation mit den oben genannten Zusätzen wurden die Zellen mit mBCI gefärbt, mikroskopisch untersucht und mit unbehandelten, gefärbten Inselzellen verglichen, photographiert und die Vitalität der Zellen bestimmt.

### **2.2.14 Biochemische GSH-Bestimmung**

Die Messmethode musste mehrfach angepasst werden, da hier primäre Inselzellen eingesetzt wurden, die aufgrund des sehr aufwendigen Gewinnungsverfahrens, geringer Zellausbeute pro Ratte (max. 1,5 bis 2 x 10<sup>6</sup> Inselzellen/Ratte) und ihrer begrenzten Lebenszeit in der Zellkultur von 2-3 Tagen nur in geringerer Anzahl als üblich vorgesehen eingesetzt werden konnten.

Je 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Probe wurden direkt nach Vereinzelung mit 10 ml Medium in 10 cm Platten ausgesät (Beim Poolen der Zellen wurden diese mit 3 ml Medium in 3,5 cm Platten ausgesät). Versuche zum GSH-Gehalt nach Zugabe unterschiedlicher Zusätze (Spe/NO, BCNU, Diamid, BCNU + Spe/NO) wurden am gleichen Tag durchgeführt.

Nach den Versuchen wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 250 g). Dann wurde der Überstand soweit wie möglich (bis auf ca. 20  $\mu\text{l}$  Medium) abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden in 75  $\mu\text{l}$  Aqua bidest resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen kurz kräftig gemischt und zur Lyse 2 x in flüssigen Stickstoff

getaucht und aufgetaut (2 x freeze-stop). Dann wurden 15 µl für eine Proteinbestimmung nach Lowry entnommen und bei – 80 °C eingefroren).

Für die GSH-Bestimmung (modifiziert nach Tietze, 1969 und Akerboom, Sies, 1981) wurden 70 µl Zelllysate entnommen, mit 14 µl 10 M HClO<sub>4</sub> und 4,7 µl 100 mM EDTA gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 250 g).

Dann wurden 80 µl Überstand entnommen und 6,7 µl 10 M KOH und 10,2 µl 3 M MOPS dazugegeben. Jetzt erfolgte eine pH-Kontrolle und Einstellung eines neutralen pH-Wertes mit KOH bzw. HCl. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 min, 250 g), der pH-Wert kontrolliert und 80 µl Überstand entnommen.

Davon wurden je Probe 40 µl eingesetzt, mit 10 µl 6 mM DTNB-Farbstoff auf Eis gemischt und der Farbumschlag bei 412 nm (anfänglich in einer 96-well Platte in einem ELISA-Photometer Titertek Multiskan Plus, MKII, Flow Laboratories und später) in einer Küvette mit einem Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrometer (Pharmacia) gemessen. Eine GSH-Verdünnungsreihe mit 0 – 40 µM (0; 2,5; 5; 10; 20; 40) GSH wurde bei jeder Messung als Standard benutzt.

Mittels der aus dem Standard ermittelten Eichkurve wurden aus den Absorptionen der Proben der jeweilige GSH-Gehalt berechnet.

Diese Versuche wurden zur Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes der Inselzellen nach nitrosativen Stress bzw. Enzymhemmung durchgeführt.

### **2.2.15 Proteinbestimmung nach Lowry**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zell-Extrakten wurde die Methode nach Lowry angewandt (Lowry et al., 1951).

Lösungen: K-Na-Tartrat 4 %, CuSO<sub>4</sub> 2 %, Folin-Ciocalteus Phenolreagenz: 1:3 in H<sub>2</sub>O

- Lösung A: 30 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 4 g NaOH ad 1 l H<sub>2</sub>O

- Lösung B:

100 ml Lösung A gemischt mit 1 ml 4% K-Na-Tartrat und 1 ml 2% CuSO<sub>4</sub>-Lösung

*Versuchsdurchführung:*

10 µl Probe wurden mit 740 µl H<sub>2</sub>O und 2,1 ml Lösung B versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 150 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz nochmals 10 min bei 37°C inkubiert und der Farbumschlag bei 691



nm in einem ELISA-Photometer, Titertek Multiskan Plus, MKII, Flow Laboratories gemessen. Eine BSA-Verdünnungsreihe mit 0 – 6,6 µg BSA/ ml wurde bei jeder Messung parallel als Standard mitgeführt.

Mit Hilfe des Proteingehalts pro Probe konnte der GSH-Gehalt in µM GSH/mg Protein errechnet werden.

### **2.2.16 Mitochondriales Membranpotential nach nitrosativem Stress**

Für alle folgenden Versuche wurden nach der Inselzellisolierung die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glukose - falls nicht anders vermerkt - in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert .

Nach 1 Stunde Erholungsphase - falls nicht anders vermerkt - nach Zellvereinzeltung wurden die Inselzellen bei 37 °C ohne und mit verschiedenen Zusätzen (SNOC, Spe/NO, Spe x 4 HCl, DETA/NO, DETA, BCNU, DETA/NO + BCNU, BCNU + Spe/NO) unterschiedlich lange (1, 2, 3, 8, 12, 14, 16 h) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit DIOC<sub>2</sub>(5) und zum Teil auch mit HOECHST 333425 gefärbt, mikroskopisch untersucht und mit unbehandelten, gefärbten Inselzellen verglichen, photographiert und die Vitalität der Zellen bestimmt.

### **2.2.17 Versuche zum Inselzellverhalten nach Glukosezugabe**

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 1 mM Glukose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert und eine 10-12 stündige Erholungsphase eingehalten.

Dann wurden entweder mit

1. Zinquin gefärbt, anschließend unter Sichtkontrolle 20 mM Glukose dazugegeben, beobachtet und mit Zellen in 1mM Glukose-haltigen Medium verglichen. Oder
2. 20 mM Glukose zu den Proben gegeben, diese dann 10 min bzw. 1 h bei 37 °C inkubiert, mit Zinquin gefärbt, untersucht und mit den Zellen in Medium mit 1mM Glukose verglichen

Die Vitalität wurde am Ende der Versuche mit der Trypanblau-Färbung überprüft.

### **2.2.18 Durchflusszytometrische Untersuchung von Inselzellen nach nitrosativem Stress und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten behandelter und unbehandelten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Vereinzeln wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in je einer  $10 \text{ cm}^2$  Platte in RPMI 1640 mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glukose über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert. Dann wurden die Zellen je einer Platte für 24 h mit 0,25 mM DETA/NO, 0,5 mM DETA/NO, 0,5 mM DETA oder ohne Zusatz bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Um reaggregierte Zellen zu entfernen, wurden die Insel-Zellen jeder Platte durch eine  $60 \text{ }\mu\text{m}$  Nylon-Gaze gesiebt und in Falconröhrchen überführt, anschließend 5 min lang zentrifugiert ( $250 \text{ g}$ ) und mit je 3 ml Medium in eine  $6 \text{ cm}$  Platte ausgesät. Dann wurden die Zellen 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $25 \text{ }\mu\text{M}$  Zinquin angefärbt, erneut in einem Falconröhrchen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen jeweils in  $200 \text{ }\mu\text{l}$  PBS-Puffer suspendiert und in je ein Faxröhrchen überführt. Kurz vor der Messung wurden die Zellen noch mit Propidiumiodid angefärbt. Die Fluoreszenz Zinquin-markierter Inselzellen wurde durchflusszytometrisch (FACStar<sup>plus</sup>, Becton Dickinson) mit einem 5-W Argon Ionen Laser (Innova 305, Coherent, Palo Alto, CA) bei 100 mW in einem UV ( $333,6 \text{ nm}$ - $363,8 \text{ nm}$ )-Modus und mit einem 2-W Argon Ionen Laser (Innova 70, Coherent, Palo Alto, CA) bei 140 mW und  $488 \text{ nm}$  analysiert und mittels Software (FACStar<sup>plus</sup> research software, Becton Dickinson) ausgewertet. Die Auswahl lebender Zellen erfolgte nach Streulicht und Propidiumiodid Fluoreszenz ( $0,4 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ). Der „side scatter“ wurde mit einem  $330 \text{ nm}$  Bandpass Filter (330WB60, Omega Optical, Brattleboro, VT) detektiert. Die Zinquin-Fluoreszenz wurde durch einen  $530 \text{ nm}$  Bandpass Filter (530DF30 Becton Dickinson) und die Propidiumiodid-Fluoreszenz bei  $610 \text{ nm}$  (610FS10, Oriel, Stratford, CT) gemessen. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Herrn Diplom-Biologen Klaus Meyer im Immunlabor der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

### **2.2.19 Zytokin-Aktivierung der iNOS in Inselzellen**

In diesen Versuchen wurde der Einfluss verschiedener Zytokine und Zytokinkombinationen auf die Aktivierung der iNOS und den möglichen Effekt auf eine Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Zn}^{2+}$  untersucht.

Medium: RPMI 1640 mit 2,5% FCS, 5,5 mM Glukose, pH 7,3

**Eingesetzte Zytokinkonzentration:** (Inkubation 24 h bzw. 48 h)

IL-1 $\beta$ : 500 U/ml

Cytomix bestehend aus: IL-1 $\beta$ : 200 U/ml, TNF- $\alpha$ : 500 U/ml,  $\gamma$ -IFN: 250 U/ml

iNOS-Inhibitor NIO: 0,25 mM/ml

*Versuchsdurchführung:*

1 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden in 1 ml Medium pro Vertiefung in einer 12-well-Platte ausgesät. 12 Stunden nach Inselzellvereinzelung wurden die Zytokine und/oder der Inhibitor NIO (IL-1 $\beta$ , Cytomix, Cytomix + NIO, IL-1 $\beta$  + NIO, NIO) in den jeweiligen Konzentrationen und Kombinationen hinzupipettiert und zusammen mit den Zellen 24 Stunden bzw. 48 Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen in Medium, jedoch ohne Zytokinzusätze oder nur mit NIO bzw. Medium ohne Zellen nur mit NIO oder ohne Zusätze parallel inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubation wurden Aliquots der Kulturüberstände entnommen und als Maß für die Aktivität der NO-Synthase Nitrit, ein Oxidationsprodukt von NO, bestimmt. Die Zellen wurden mit Zinquin inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Freisetzung von intrazellulärem Zn<sup>2+</sup> untersucht, fotografiert und die Vitalität bestimmt.

### **2.2.20 Quantitative Nitritbestimmung nach Griess**

In wässrigen Lösungen wird NO spontan innerhalb weniger Sekunden zu Nitrit (NO<sup>2-</sup>) und Nitrat (NO<sup>3-</sup>), den beiden stabilen Endprodukten des NO-Metabolismus, oxidiert (Marletta et al., 1988, Stamler et al., 1992). Die Nitrit-Konzentration wurde mit Hilfe des Griess-Assays (Diazotierungsreaktion modifiziert nach Wood et. al., 1990) aus dem Kulturüberstand nach Zytokinaktivierung der Inselzellen bestimmt. Dafür wurden 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 300  $\mu$ l Medium pro Vertiefung einer 48-well-Platte ausgesät und wie oben beschrieben mit 500 U/ml IL-1 $\beta$  oder Cytomix sowie den verschiedenen Kontrollen, die keinen Zusatz, nur NIO, Cytomix und NIO, nur Medium bzw. Medium ohne Zusatz enthielten, 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden 250  $\mu$ l Überstand entnommen und die Nitritbestimmung nach Griess durchgeführt.

*Lösungen:* -Griess-Reagenz I: 1% Sulfanilamid in 4N HCl

-Griess-Reagenz II: 1% NEDDC (N-1-Naphtylethylendiaminedihydrochlorid in Methanol)

### *Versuchsdurchführung:*

Unmittelbar vor jeder Messung wird eine Standardreihe mit  $\text{NaNO}_2$  in Aqua bidest in den Konzentrationen 0 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM und 10 nM angesetzt, die bei jeder Nitritbestimmung doppelt mitgeführt wird.

Aus jedem Kulturüberstand werden zwei 100  $\mu\text{l}$  – Proben entnommen und zusammen mit 100  $\mu\text{l}$  der Eichreihe und einem zweifachen Mediumreferenzwert, der aus 100  $\mu\text{l}$  Medium ohne Zellen, das über den jeweiligen Versuchszeitraum mitinkubiert wurde, besteht, auf eine 96-well ELISA-Platte gebracht. Für den Testansatz gibt man zu jeder 100  $\mu\text{l}$  Probe 50  $\mu\text{l}$  der Griess Reagenz I – Lösung und inkubiert nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  37%iger HCl 10 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend kommen 50  $\mu\text{l}$  Griess Reagenz II-Lösung hinzu. Die rötliche Farbentwicklung kann dann bei 540 nm durch Absorption im ELISA-Photometer quantifiziert und nach Abzug des Extinktionswertes der Mediumkontrolle (Medium ohne Zellen bei gleicher Inkubation) mit der  $\text{NaNO}_2$  – Konzentrationsreihe verglichen werden.

Der Extinktionswert der Mediumkontrolle wurde von den gemessenen Werten der einzelnen Proben abgezogen. Mittels der aus dem Standard ermittelten Eichkurve wurden aus den Absorptionen der Proben die jeweiligen Nitritkonzentrationen berechnet.

### **2.2.21 Fluoreszenzfärbung mit dem Hoechst-Reagenz**

Der Farbstoff bis-benzimidazole (Hoechst 33342) diffundiert durch die intakte Zellmembran lebender Zellen, bindet von außen an AT-reiche Regionen in der kleineren Furche der DNA und färbt so das Chromatin der Kerne der behandelten Zellen (Belloc et al., 1994). Inselzellen zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine hell-blaue Fluoreszenz der Kerne, die im Falle nekrotischer Zellen einen leuchtend tiefblauen Charakter annimmt.

Unmittelbar vor der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop werden 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Hoechst-Reagenz (9 mM) in den Zellüberstand pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kulturplatte gleichmäßig verteilt. Zur Visualisierung des Hoechst-Farbstoffes wird ein Filter für blaue Fluoreszenz verwendet (Extinktion: 355 nm, Emission: 465 nm), zur Anwendung.

### **3. Ergebnisse**

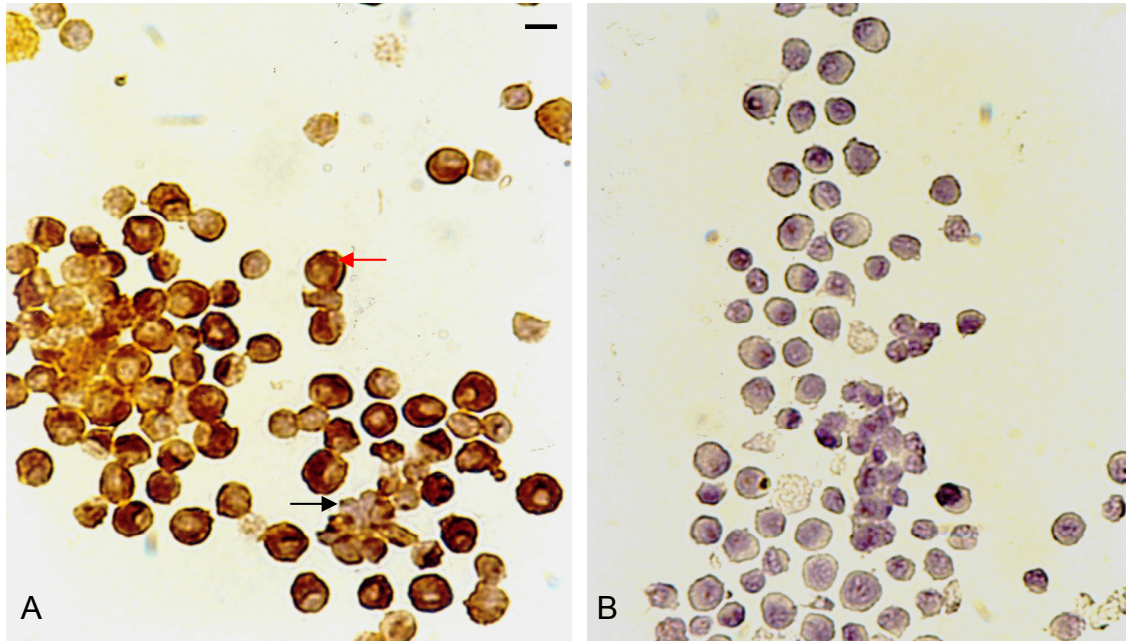
#### **3.1 Immunzytochemische Färbung von isolierten Betainselzellen**

Um Betazellen (in vivo 60-80%) von den anderen Inselzelltypen wie den Glukagon-produzierenden Alphazellen (in vivo 15-20%), den Somatostatin-produzierenden Deltazellen (in vivo 5-15%) und den Pankreatisches-Polypeptid-produzierenden PP-Zellen (in vivo bis 2%) zu unterscheiden (Herold, 2001), wurden die Insulin-produzierenden Betazellen mittels Insulin-Antikörper-vermittelter Anfärbung dargestellt.

Wie in Material und Methoden aufgeführt wurden Inselzellen für Insulin angefärbt. Als primärer Antikörper wurde der Meerschweinchen-anti-Ratten-Insulin-AK in einer Verdünnung 1:500, 1:700 und 1:1000 eingesetzt. Als zweiter Antikörper diente der Ziege-anti-Meerschweinchen IgG in einer Verdünnung von 1:100. Im Anschluss wurde mit dem ABC-Reagenz (Vectastain-ABC-Peroxidase-Kit), hergestellt nach Anweisung des Herstellers (Camon, Wiesbaden), der DAB-Substratlösung und der Hämatoxylin-Kerngegenfärbung inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe eines DAB-Filters ausgewertet. Dabei zeigten die Betainselzellen, die wie in vivo einen Anteil von 60-70% aller Inselzellen ausmachten, eine kräftige braune Anfärbung als Zeichen für die Anwesenheit von Insulin. Die anderen Inselzellen stellten sich farblos bzw. leicht gelblich dar. Die Hämatoxylin-Kerngegenfärbung zeigte eine hellblaue Kernfärbung. (s. Abb.1 A)

Die Negativkontrolle, die nur mit dem 2. Antikörper, dem ABC-Reagenz, der DAB-Substratlösung und der Hämatoxylin-Kerngegenfärbung inkubiert wurde, blieb in allen Versuchen ungefärbt, es zeigte sich lediglich die hellblaue Hämatoxylin-Kerngegenfärbung. (s. Abb. 1 B)

Die Ergebnisse zeigten, dass Betainselzellen in vitro etwa denselben prozentualen Anteil von 60-70 % haben wie in vivo.



**Abbildung 1:** A) Betainselzellen zeigten aufgrund der Anwesenheit von Insulin eine kräftige braune Anfärbung des Zytoplasmas nach der Anti-Insulin-Antikörperfärbung. (roter Pfeil: Betazellen mit positiver Markierung) Die anderen Inselzelltypen ohne Insulinproduktion färbten sich lediglich hellgelb an. (schwarzer Pfeil: Non-Betazellen ohne Markierung) (1. AK (1:1000) + 2. AK (1:100)). B) In der Negativkontrolle, bei der der 1. Antikörper weggelassen wurde, jedoch alle weiteren Schritte identisch waren, wurde nur die hellblaue Hämatoxylin-Kerngegenfärbung beobachtet. Der schwarze Balken entspricht 5 µm. n=3.

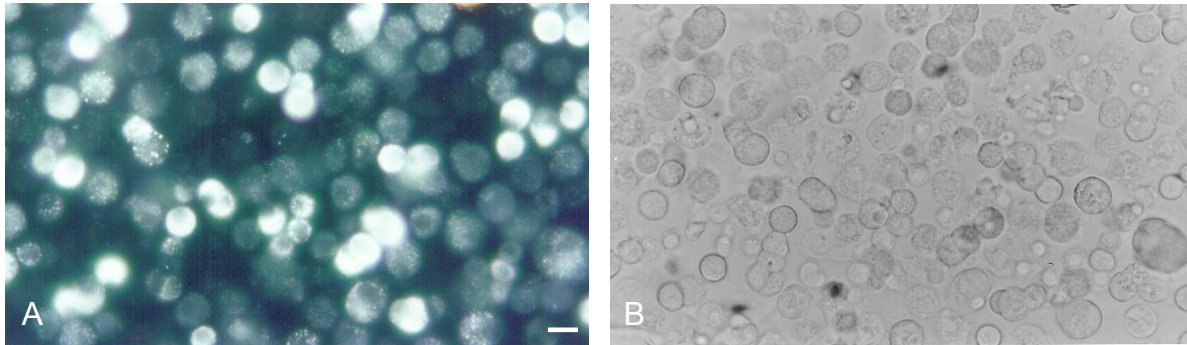
### 3.2 Markierung von $Zn^{2+}$ in isolierten Inselzellen

Zur Anfärbung von freiem  $Zn^{2+}$  werden die Inselzellen mit dem  $Zn^{2+}$ -spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Zinquin inkubiert.

Ungefärbte und mit Zinquin gefärbte Inselzellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 11 mM Glukose wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Zeiss-Filter 02 untersucht und die Fluoreszenz in den Zellkompartimenten (Zellkern, Zytoplasma, Granula) beurteilt. Dabei zeigten die nicht mit Zinquin gefärbten Zellen in der Regel keine Eigenfluoreszenz, selten wurde eine minimale Hintergrundfluoreszenz einzelner Zellen beobachtet. Es wurden einzelne, in Ketten oder Pseudoinseln liegende Zellen beobachtet.

Bei den Zinquin-gefärbten Zellen zeigte sich insgesamt eine blau-grüne inhomogene Fluoreszenz in vielen, aber nicht in allen gefärbten vitalen Zellen. Dabei wurden unterschiedlich stark fluoreszierende Zellen beobachtet. Auch war die Fluoreszenzintensität der Zellkompartimente unterschiedlich. Die Zellkerne waren meist nicht bis schwach (Fluoreszenzintensität: 0-(1)) fluoreszierend, das Zytoplasma meist mittelstark (Fluoreszenzintensität: 2). Zudem wurden

unterschiedlich zahlreiche und unterschiedlich große, stark bis sehr stark fluoreszierende (Fluoreszenzintensität: 3-4) Granula beobachtet. Tote Zellen, die durch ihre veränderte Morphologie erkennbar waren, zeigten keine Zinquin-Fluoreszenz. (s. Abb. 2)



**Abbildung 2:** A) Bei mit Zinquin gefärbten Inselzellen wurde eine inhomogene blau-grüne Fluoreszenz beobachtet. Die Zellkompartimente zeigten unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten. Die Zellkerne zeigten meist keine bis schwache Fluoreszenz-Aktivität, das Zytoplasma eine mittelstarke und die Granula eine sehr starke Fluoreszenz-Aktivität. B) zeigt die durchlichtmikroskopische Abbildung des entsprechenden Ausschnittes. Der weiße Balken entspricht 5 µm. n=3

### 3.3 Wirkung von nitrosativem oder oxidativem Stress auf die Zink-Homöostase in Inselzellen

#### a) Austestung optimaler Kulturbedingungen

In ersten Versuchen wurde Medium mit 10 % FCS und 11 mM Glukose eingesetzt. Es folgten Versuche, in denen die Inselzellen ohne und mit verschiedenen, spontan zerfallenden NO-Donoren mit unterschiedlichen Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wie 0,1 - 2 mM SNAP ( $t_{1/2}$  = ca. 4 h bei 37 °C), 0,05 - 1 mM SNOG ( $t_{1/2}$  = 25 min bei 37 °C), 0,25 - 1 mM DETA/NO ( $t_{1/2}$  = 7-8 h bei 37 °C) unterschiedlich lange (1-24 h) inkubiert wurden. Außerdem wurde als NO-Donor Nitroprussid (0,5 mM) eingesetzt, welcher erst nach intrazellulärer Verstoffwechslung NO freisetzt. Anschließend wurde mit Zinquin gefärbt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 60-facher Vergrößerung untersucht. Die Zellvitalität lag bei allen Versuchen bei >70-75%. Es zeigten sich jedoch keine Fluoreszenzunterschiede zwischen NO-behandelten und unbehandelten Zellen.

Aufgrund der Vermutung, dass das fötale Kälberserum (FCS) im Medium die NO-Wirkung auf die Zellen beeinträchtigt, wurden Inselzellen in Medium mit 11 mM Glukose und unterschiedlichen FCS-Konzentrationen (2,5 % oder 10 %) über 12 h

bzw. 24 h ohne bzw. mit NO-Donoren (0,25 mM und 0,5 mM DETA/NO, 0,5 mM SNAP bzw. 0,5 mM Nitroprussid) inkubiert. Verglichen mit den Proben in 10 %igem FCS zeigte sich in den Proben mit 2,5 % FCS-haltigem Medium insgesamt eine stärkere Zinquinvermittelte Fluoreszenz in allen Zellkompartimenten, insbesondere stellten sich die Granula größer und heller fluoreszierend dar. Außerdem wurden nun Fluoreszenzunterschiede zwischen den NO-behandelten und nicht behandelten Zellen beobachtet. Die Unterschiede zeigten sich in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und teilweise auch der Zellvitalität nach nitrosativem Stress (besonders nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5 mM DETA/NO). Anschließend wurden Versuche zur weiteren Austestung optimaler Mediumzusammensetzungen durchgeführt. Inselzellen wurden dabei in Medium mit unterschiedlichen FCS- (0%; 1%; 2,5%) bzw. Glukose-Konzentration (0/ 1/ 5,5/ 11 mM) nach Inkubation über Nacht und dann weiteren 24 Stunden untersucht. In den Proben mit 0 - 2,5 % FCS-haltigem Medium zeigte sich eine insgesamt stärkere Fluoreszenz und eine geringere Bildung von Pseudoinseln als in den Proben mit 10 % FCS. Hierbei zeigte auch eine größere Anzahl der Zellen eine stärkere Fluoreszenz und die Granula waren vielfach größer und heller fluoreszierend. Die Glukosekonzentration hatte keinen Einfluss auf die Zinquinvermittelte Fluoreszenz. Hinsichtlich der Vitalität der Zellen zeigten sich keine Unterschiede (Vitalität: 70 –80 %).

Für alle folgenden Versuche wurde daher, falls nicht anders vermerkt, ein Medium mit physiologischem Glukosegehalt von 5,5 mM und 2,5 % FCS gewählt. Dies gewährleistete die besten Bedingungen für die Zellen - besonders bei Versuchen mit längerer Inkubationszeit.

#### **b) Auswirkung von NO-Donoren auf den freien - zinquinmarkierbaren - $Zn^{2+}$ - Gehalt**

Es folgten Versuche, in denen Inselzellen erneut ohne oder mit SNAP (0,1/ 0,25/ 0,5 mM) oder DETA/NO (0,1/ 0,25 /0,5 mM) für 12 h oder 24 h inkubiert, Zinquin-gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden.

Nach 12 Stunden Inkubation wurde nur in den mit 0,5 mM DETA/NO behandelten Proben eine sehr leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet. In den Kontrollen und den anderen Proben zeigte sich bei der Mehrheit der Zellen eine starke  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz. Die Vitalität

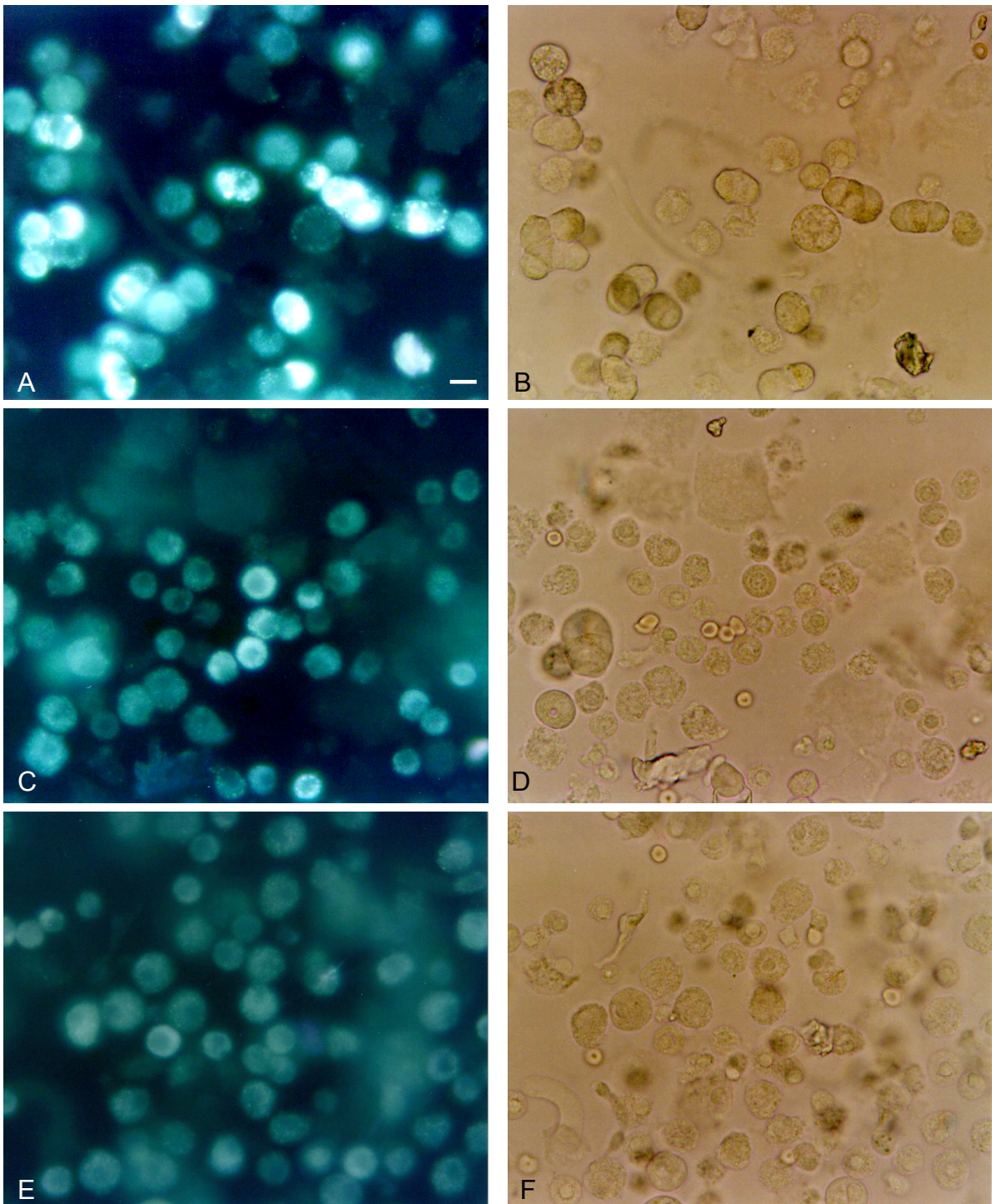


lag in allen - NO-behandelten und unbehandelten- Proben unverändert bei ca. 75 %.

Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Fluoreszenzabnahme bei den mit 0,25 mM (s. Abb. 3C) und mit 0,5 mM DETA/NO (s. Abb. 3E) behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Inselzellen (s. Abb. 3A). Bei den mit SNAP und mit 0,1 mM DETA/NO behandelten Proben war keine Fluoreszenzabnahme zu erkennen.

Die Vitalität der Kontrollen sowie der mit 0,1 mM DETA/NO- und mit SNAP-behandelten Zellen lag zwischen 60-70% und sank bei den mit 0,25 mM bzw. 0,5 mM DETA/NO behandelten Zellen auf 50 % bzw. 45 %.

Diese Ergebnisse deuten auf einen durch NO ausgelösten Stress auf die Zink-Homöostase der Inselzellen hin mit einsetzender toxischer Wirkung.



**Abbildung 3:** In den Inselzellen, die mit 0,25 mM DETA/NO (C) bzw. mit 0,5 mM DETA/NO (E) für 24 Stunden behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante DETA/NO-konzentrationsabhängige Abnahme der  $Zn^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A). B, D und F zeigen die durchlichtmikroskopischen Abbildungen der entsprechenden Ausschnitte. Der weiße Balken entspricht 5  $\mu$ m. n=3

### **c) Einfluss von oxidativem Stress auf den freien - zinquinmarkierbaren – Zn<sup>2+</sup>-Gehalt**

Um den Einfluss von Streptozotocin bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Inselzellen zu untersuchen, wurden die Inselzellen mit und ohne Streptozotocin (0,25/ 0,5/ 1 mM) bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5/ 1 mM) für eine Stunde inkubiert, zinquingefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei zeigten sich keine deutlichen Fluoreszenzunterschiede. Lediglich bei der Inkubation mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde eine sehr leichte Fluoreszenz-Abnahme bei einer leichten Abnahme der Vitalität auf 65 % beobachtet. In den Kontrollen sowie in den anderen Proben lag die Vitalität bei 75 %. Dies deutet auf keinen deutlichen kurzzeitigen Einfluss dieser Substanzen auf die Zinkhomöostase der Inselzellen hin.

### **3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung von Inselzellen nach nitrosativem Stress zur Quantifizierung des freien Zink-Gehaltes**

Zur Quantifizierung der NO-medierten Effekte auf den Pool an freiem Zink in Inselzellen wurde die Zink-abhängige Fluoreszenzintensität behandelter und unbehandelter Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

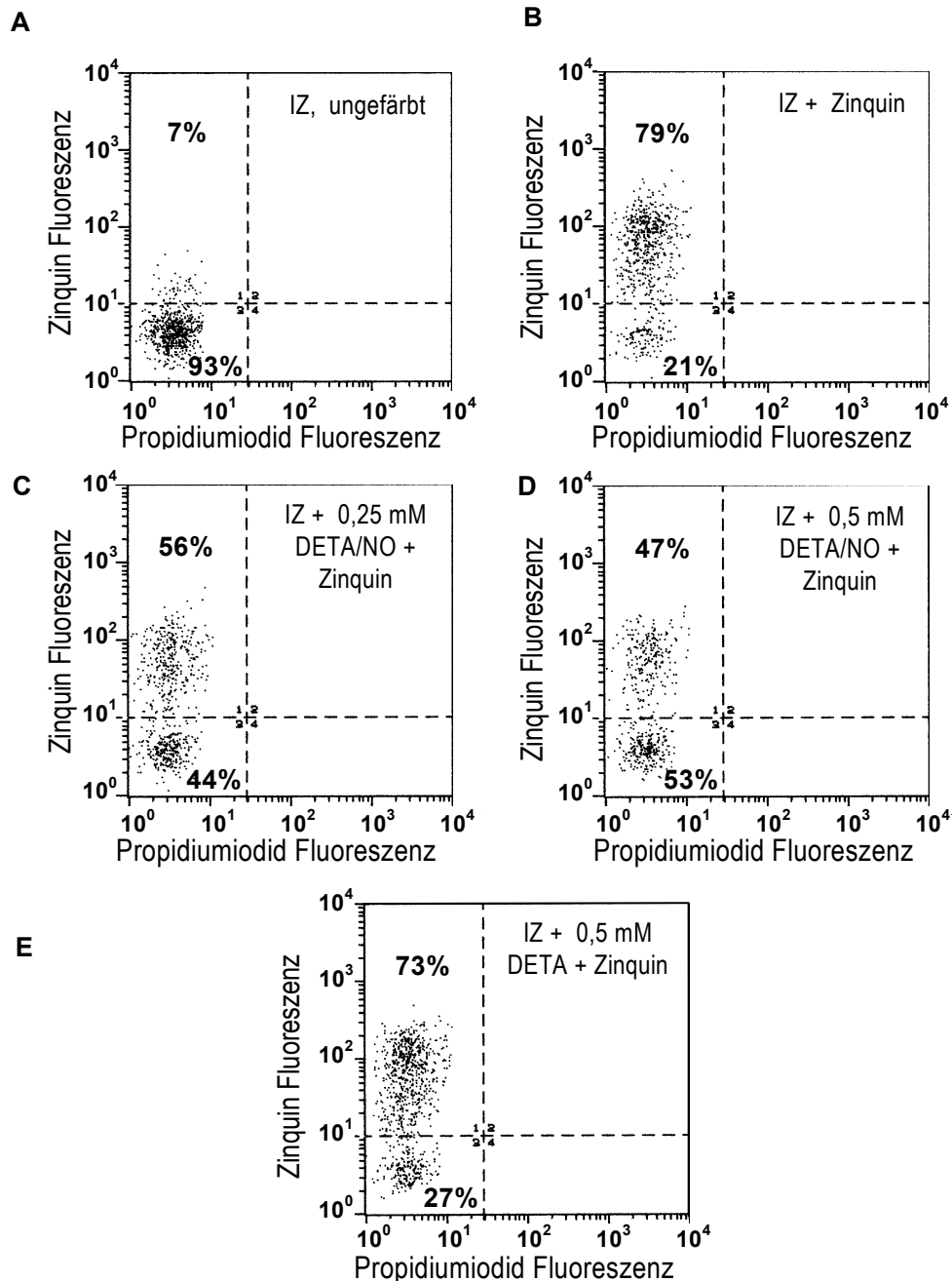
Die Methode wurde wegen der großen Empfindlichkeit der Inselzellen mehrmalige anpasst und der Versuch dann einmalig durchgeführt, da die eingesetzten primären Inselzellen aufgrund des sehr aufwendigen Gewinnungsverfahrens, der geringen Zellausbeute pro Ratte (max. 1,5 bis 2 x 10<sup>6</sup> Inselzellen/Ratte) und begrenzten Lebenszeit in der Zellkultur von 2 - 3 Tagen nur in geringer Anzahl zur Verfügung standen.

Die Zellen wurden - wie in Material und Methoden beschrieben - präpariert und für 24 h mit 0,25 mM DETA/NO, 0,5 mM DETA/NO, 0,5 mM DETA oder ohne Zusatz bei 37 °C inkubiert. Alle Proben bis auf eine Kontrollprobe wurden mit Zinquin markiert sowie kurz vor der Messung auch mit Propidiumiodid angefärbt, um die Vitalität der Zellen darzustellen. Die Zinquinabhängige bzw. Propidiumjodidabhängige Fluoreszenz der markierten Inselzellen wurde durchflusszytometrisch (FACStar<sup>plus</sup>, Becton Dickinson) analysiert und mittels einer speziellen Software (FACStar<sup>plus</sup> research software, Becton Dickinson) ausgewertet. Die Auswahl lebender Zellen erfolgte nach Streulicht (side scatter) und Propidiumiodid-Fluoreszenz (0,4 µg/ml). Der „side scatter“ wurde mit einem 330 nm Bandpass Filter (330WB60, Omega Optical, Brattleboro, VT) detektiert.

Die Zinquin-Fluoreszenz wurde durch einen 530 nm Bandpass Filter (530DF30 Becton Dickinson) und die Propidiumiodid-Fluoreszenz bei 610 nm (610FS10, Oriel, Stratford, CT) gemessen.

Während Zinquin-ungefärbte, unbehandelte Zellen nur eine Hintergrundfluoreszenz zeigten (Abb. 4A), wurde nach Zinquinanfärbung bei 79 % der Inselzellen eine starke  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenzaktivität beobachtet (Abb. 4B). Nach 24-stündiger Inkubation mit 0,25 mM DETA/NO (Abb. 4C) bzw. 0,5 mM DETA/NO (Abb. 4D) zeigte sich ein signifikanter Shift der Zinquin-fluoreszenzintensiven Subpopulation in Richtung schwache Fluoreszenzmarkierung. Dabei nahm die fluoreszenzintensive Subpopulation nach Inkubation mit 0,25 mM DETA/NO auf 56 % bzw. bei Inkubation mit 0,5 mM DETA/NO auf 47 % ab. Bei der Auswertung wurden nur vitale Zellen berücksichtigt und mittels Propidiumiodidanfärbung detektiert, so dass die Abnahme der Zink-abhängigen Fluoreszenz nicht auf eine Zunahme der Zellmortalität zurückgeführt werden kann. Zellen, die mit der Kontrollsubstanz 0,5 mM DETA inkubiert (Abb. 4E) wurden, zeigten keine signifikante Veränderung. Hier lag die Subpopulation mit starker Zinquin-abhängiger Fluoreszenz bei 73 % vergleichbar mit der unbehandelten Zellen (Abb.4B).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bestätigen somit die Beobachtungen der Fluoreszenzmikroskopie, dass eine 24 h-Inkubation mit 0,25 mM bzw. mit 0,5 mM DETA/NO zu einer Abnahme der  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenzintensität führt.



**Abbildung 4:**

Durchflusszytometrie von Inselzellen (IZ), die mit und ohne DETA/NO inkubiert und mit Zinquin gefärbt wurden. Die Auswahl lebender Zellen erfolgte nach Streulicht und Propidiumiodid-Fluoreszenz. Zinquin-ungefärbte Zellen zeigten nur eine sehr leichte Hintergrundfluoreszenz (A), während nach Zinquin-färbung 79 % der Zellen eine starke  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz zeigten (B). Vergleichbare Ergebnisse erhielt man mit Zellen, die mit der Kontrollsubstanz 0,5 mM DETA behandelt wurden. Hier befanden sich 73 % der Zellen in der stark-fluoreszierenden Subpopulation (E).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Proben, die 24 Stunden mit 0,25 mM (C) oder 0,5 mM DETA/NO (D) inkubiert wurden, eine konzentrationsabhängige Abnahme der stark-fluoreszenzmarkierten Subpopulation auf 56 % bzw. 47 %.  $n=1$ , aufgrund der begrenzten Anzahl und besonderen Empfindlichkeit der eingesetzten primären Inselzellen.

### **3.5 Versuche zur Zinkbeladung von Inselzellen und nitrosativem Stress**

Um zu untersuchen, ob der freie Zinkgehalt in den Zellen und damit die Zink-abhängige Fluoreszenz gesteigert werden kann, wurde das Medium einiger Proben durch Zugabe eines  $Zn^{2+}$ -Histidin-Komplexes (Zn-His) zusätzlich mit Zink versetzt.

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glucose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert. Zu einigen Proben wurde direkt nach Vereinzeltung 100  $\mu$ M Zn-His zugegeben, eine 10-12 stündige Erholungsphase eingehalten, dann die Zellen 2 x mit frischem Medium gewaschen und in eine neue 12-well-Zellkulturplatte überführt.

Abschließend wurden Zink-beladene und -unbeladene Proben ohne und mit 0,5 mM des NO-Donors DETA/NO für 24 h inkubiert, mit Zinquin gefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und die Vitalität bestimmt.

Die mit Zn-His behandelten Kontrollen (ohne DETA/NO inkubierte Proben) zeigten im Vergleich zu den unbeladenen Kontrollen etwas mehr Zellen mit größeren, sehr stark fluoreszierenden Granula. Zellkerne und Plasma zeigten dagegen jedoch keine Fluoreszenzunterschiede. Insgesamt erschienen die mit dem Zn-His-Komplex behandelte Kontrollen nur geringfügig stärker fluoreszierend. Die Vitalität lag in beiden Kontroll-Proben bei 70 %.

Die DETA/NO behandelten Proben zeigten insgesamt - wie schon oben beschrieben - eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität, jedoch keine Fluoreszenz-Unterschiede zwischen Zn-His-behandelten und -unbehandelten Proben. Die Vitalität lag in diesen Proben bei 50 %.

Insgesamt konnte keine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität durch die Zugabe des  $Zn^{2+}$ -Histidin-Komplexes beobachtet werden.

### **3.6 Wirkung von nitrosativem Stress auf den GSH-Gehalt in Inselzellen**

Es wurden der Glutathion-Stoffwechsel der Inselzellen nach Inkubation mit den NO-Donoren SNOC oder Spe/NO bzw. der Einfluss des  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase( $\gamma$ -GCS)-Inhibitors BSO (L-Buthionine-[S,R]-sulfaximine), der die GSH-Synthese hemmt, und des GSH-Reduktase-Inhibitors BCNU (Carmustin) auf den Glutathion-Stoffwechsel untersucht.

Diamid oxidiert relativ spezifisch Glutathion zu Glutathiondisulfid und wurde als Kontrolle eingesetzt. (Reaktion:  $\text{GSH} + \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$ ).

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/Vertiefung) in 12-well-Zellkultur-Schalen in Medium mit 2,5 % FCS -falls nicht anders vermerkt- und 5,5 mM Glukose kultiviert. 1 Stunde nach Zellvereinzeltung erfolgten Versuche immer im Doppelansatz bei 37 °C. Nach der Inkubation mit den Zusätzen wurden die Zellen mit mBCI, einem Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von intrazellulärem GSH gefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Zeiss-Filter 02 und 60-facher Vergrößerung untersucht und mit unbehandelten, gefärbten Inselzellen verglichen, photographiert und die Vitalität der Zellen bestimmt.

Zunächst erfolgten Versuche, in denen die Inselzellen ohne und mit unterschiedlichen Zusätzen der NO-Donoren SNOC (0,1 - 1 mM,  $t_{1/2} = 25$  min bei 37 °C) für 1, 2, 4, 12 Stunden bzw. Spe/NO (0,25 - 1mM,  $t_{1/2} = 40$  min bei 37 °C) für 2, 4, 12 Stunden inkubiert wurden.

Bei den unbehandelten, mBCI-gefärbten Zellen zeigte sich 1 - 4 Stunden nach Vereinzeltung insgesamt eine intensiv blaue, relativ homogene Fluoreszenz in den meisten vitalen Zellen. Nur sehr wenige vitale Zellen zeigten eine schwächere Fluoreszenz. Auch waren die Zellkompartimente unterschiedlich stark fluoreszierend. Das Zytoplasma erschien meist mittelstark fluoreszierend. Die Fluoreszenz des Zellkerns erschien vielfach noch etwas stärker. Fluoreszierende Granula konnten hier nicht beobachtet werden.

Tote Zellen, die durch ihre veränderte Morphologie mit geschwollener, abgerundeter Struktur und oft mit Membranblebs im Durchlicht erkennbar waren, zeigten keine mBCI-medierte Fluoreszenz.

Nach Inkubation über 12 und 24 Stunden war bei den unbehandelten Zellen insgesamt eine allmähliche Abnahme der stark fluoreszierenden Zellpopulation zu beobachten. Mehr Zellen zeigten eine insgesamt schwächere Fluoreszenz, was auf eine Abnahme des GSH-Gehalts alleine aufgrund der Inkubationsbedingungen hindeutete. Die Zellvitalität in den unbehandelten Kontrollen lag in allen Versuchen bei >70-80%. (s. Abb 5A)

Nach Inkubation für 1 h (nur bei SNOC), 2 und 4 h mit 0,25 mM – 1 mM SNOC bzw. 0,25 mM – 1mM Spe/NO war eine deutliche, allmähliche zeit- und

konzentrationsabhängige Abnahme der GSH-abhängigen Fluoreszenzintensität der Zellen zu beobachten. Bei Spe/NO war diese Abnahme etwas stärker als bei SNOC. Die Vitalität der Zellen lag jedoch immer noch bei 70 - 75%. (s. Tab. 1 und Abb. 5 )

Nach 12-stündiger Inkubation zeigte sich insgesamt eine weitere, jetzt starke Fluoreszenzabnahme, so dass in den Proben mit 0,5 mM SNOC eine schwache, bei 0,25 mM Spe/NO nur noch eine sehr schwache Fluoreszenz der Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet wurde. Die Zellvitalität lag unverändert in allen Proben bei 70 –75 %. (s. Tab. 1)

Diese Ergebnisse zeigen, dass nitrosativer Stress zu einer Erniedrigung des GSH-Gehaltes in Inselzellen führt.

**Tabelle 1:** Darstellung des GSH-Gehalts von Inselzellen mittels mBCI-abhängiger Fluoreszenz. Die Fluoreszenzabnahme nach Inkubation mit Spe/NO bzw. SNOC im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wird verdeutlicht. Subjektive Skalierung der Fluoreszenzintensität von 0 - 5. Die Zellvitalität lag in allen Proben bei 70 –75 %. n=3

<b>Inkubation</b>	<b>1h</b>	<b>2 h</b>	<b>4 h</b>	<b>12h</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>0,1 mM SNOC</b>	<b>5</b>	<b>4,5</b>		
<b>0,25 mM SNOC</b>	<b>4,5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
<b>0,5 mM SNOC</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2,5</b>
<b>1,0 mM SNOC</b>	<b>3,5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	
<b>0,25 mM Spe/NO</b>		<b>4,5</b>	<b>4</b>	<b>0,5</b>
<b>0,5 mM Spe/NO</b>		<b>3</b>	<b>3</b>	

Des Weiteren wurden die Inselzellen mit den Inhibitoren BCNU (10 - 80 µM) für 2 bis 21 h bzw. mit BSO (0,5 - 1 mM) für 40 min - 21 h sowie mit dem GSH-Oxidans Diamid (0,1 - 2 mM), mit Diamid (1mM) + BCNU (80 µM) und Diamid (1 mM) + BSO (0,5 mM) für 30 min - 12 h inkubiert. (s. Tab. 2)

Nach einstündiger Inkubation mit 500 µM bzw. 1 mM des  $\gamma$ -GCS-Synthetase-Inhibitors BSO zeigten sich keine Fluoreszenzunterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. Erst nach 12 bzw. 21-stündiger Inkubation zeigte sich bei beiden BSO-Konzentrationen ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenzintensität, so dass nur



noch eine schwache bis sehr schwache blaue mBCI-abhängige Fluoreszenz sichtbar war, bei unveränderter Vitalität von 70 - 75%. (s. Tab. 2)

Nach 2-, 4- und 12-stündiger Inkubation mit 80  $\mu$ M des GSH-Reduktase-Inhibitors BCNU zeigte sich nach 2 Stunden eine deutliche, nach 4 Stunden eine weitere Abschwächung der Fluoreszenz und nach 12 Stunden eine nur noch sehr schwache Fluoreszenz wiederum bei einer unveränderten Vitalität von 70 - 75 %. (s. Tab. 2)

Daraufhin wurden Versuche mit 10 - 80  $\mu$ M BCNU mit 3 Stunden Inkubation durchgeführt. Dabei konnte bei 10  $\mu$ M noch keine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden, bei 20  $\mu$ M eine sehr geringe Abnahme und bei 30  $\mu$ M eine weitere leichte, aber jetzt deutliche Abnahme. Bei 40 bis 80  $\mu$ M BCNU setzte sich die konzentrationsabhängige Erniedrigung der Fluoreszenzintensität weiter fort bis zu einer deutlichen starken Abschwächung bei einer unveränderter Zellvitalität gegenüber den Kontrollen.(s. Tab. 2 und Abb. 5)

Die Verwendung des Mediums mit 10 % FCS bei den Versuchen mit BCNU verhinderte hier die Abnahme der mBCI-abhängigen Fluoreszenz nicht.

Dies bedeutet, dass eine Erniedrigung des GSH-Gehalts durch Inkubation mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU schneller erfolgt als durch den GSH-Synthese-Inhibitor BSO. Auch stellt eine hohe FCS-Konzentration keinen Schutz vor GSH-Abnahme nach Inkubation mit BCNU dar.

In den Versuchen mit dem GSH-Oxidans Diamid (1 und 2 mM) allein oder in Kombination mit 80  $\mu$ M BCNU bzw. 500  $\mu$ M BSO zeigte sich nach 30 minütiger Inkubation bereits keine Fluoreszenz mehr bei einer verbliebenen Vitalität von 20-30 %. Nach 12-stündiger Inkubation waren alle Zellen tot. (s. Tab. 2)

Daraufhin wurde die Konzentration von Diamid auf 0,1 mM, 0,25 mM und 0,5 mM reduziert und die Zellen wieder für 30 min inkubiert. Dabei zeigte sich bereits bei 0,1 mM Diamid eine sehr starke Abnahme der Fluoreszenzintensität, bei 0,25 mM eine weitere Abnahme und bei 0,5 mM Diamid keine mBCI-abhängige Fluoreszenz mehr bei einer Vitalität von 80 % wie in den unbehandelten Kontrollen.(s. Tab. 2)

Dies bedeutet, dass in Inselzellen Diamid intrazelluläres GSH in kürzester Zeit zu Glutathiondisulfid oxidiert.

**Tabelle 2:** Die mBCI-abhängige Fluoreszenz wird nach Inkubation mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU, dem  $\gamma$ -GCS-Inhibitor BSO und dem GSH-Oxidans Diamide im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Subjektive Skalierung der Fluoreszenzintensität von 0 - 5. Die Vitalität lag bei allen Proben bei 70-80 %, lediglich nach Inkubation mit 1 mM Diamid für 30 min bzw. für 12 h nur noch bei 25 % bzw. bei 0%. n=3.

<b>Inkubation</b>	<b>30 min</b>	<b>2 h</b>	<b>4 h</b>	<b>12 h</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>0,5 mM BSO</b>	<b>5</b>			<b>1</b>
<b>1mM BSO</b>				<b>0,5</b>
<b>0,1 mM Diamid</b>	<b>1</b>			
<b>0,25 mM Diamid</b>	<b>0,5</b>			
<b>0,5 mM Diamid</b>	<b>0</b>			
<b>1mM Diamid</b>	<b>0</b>			<b>0</b>
<b>Inkubation</b>		<b>3 h</b>	<b>5 h</b>	<b>13 h</b>
<b>10 <math>\mu</math>M BCNU</b>		<b>5</b>		
<b>30<math>\mu</math>M BCNU</b>		<b>4</b>		
<b>50<math>\mu</math>M BCNU</b>		<b>3</b>		
<b>70<math>\mu</math>M BCNU</b>		<b>2,5</b>		
<b>80 <math>\mu</math>M BCNU</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>

Weitere Versuche folgten mit einer Kombination aus Inhibitor und NO-Donor (20 - 80  $\mu$ M BCNU + 0,25 - 1mM SNOC, 10 - 80  $\mu$ M BCNU + 0,25 - 1 mM Spe/NO, 500  $\mu$ M BSO + 0,5 mM SNOC, 500  $\mu$ M BSO + 0,5 mM Spe/NO, 500  $\mu$ M BSO + 80  $\mu$ M BCNU + 0,25 mM Spe/NO), die unterschiedlich lange (0,5/ 2/ 4/ 12/ 24 h) inkubiert, mit mBCI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. BCNU wurde dabei immer eine Stunde vor den NO-Donoren zu den Zellen gegeben. (s.Tab. 3)

In Versuchen mit 80  $\mu$ M BCNU und 0,25 – 0,5 mM SNOC bzw. 0,25 – 0,5 mM Spe/NO über 2 und 4 Stunden zeigte sich konzentrations- und zeitabhängig eine sehr starke Fluoreszenzabnahme, die stärker als die Abnahme bei den jeweiligen Einzelsubstanzen war. Es zeigte sich vielfach nur noch eine schwache bis sehr schwache Fluoreszenz bei einer deutlichen abnehmenden Zellvitalität von 40 bis 60 %. (s. Tab. 3 und Abb. 5)

Überhaupt keine Fluoreszenz mehr wurde bei den Proben mit 80  $\mu\text{M}$  BCNU + 1 mM Spe/NO bereits nach 2 Stunden Inkubation sowie bei 80  $\mu\text{M}$  BCNU + 1 mM SNOC nach 4 Stunden beobachtet. Hier zeigte sich aber auch ein Abfall der Zellvitalität bis auf 20 – 30 %.(s. Tab. 3)

Nach Inkubation von 80  $\mu\text{M}$  BCNU + 0,5 mM Snoc bzw. 80  $\mu\text{M}$  BCNU + 0,25 mM Spe/NO für 12 Stunden zeigte sich kaum noch eine Fluoreszenz bei einer erniedrigten Vitalität von 50 % bzw. 30 %. Auch bei Versuchen mit 500  $\mu\text{M}$  BSO + 0,5 mM SNOC bzw. 500  $\mu\text{M}$  BSO + 0,25 mM Spe/NO über 12 Stunden zeigte sich nur eine minimale Restfluoreszenz bei einer Vitalität von 65 bzw. 55 %. (s.Tab. 3)

In Versuchen mit Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  - 80  $\mu\text{M}$  BCNU (1 h vorinkubiert) mit 0,25 mM Spe/NO über 2 Stunden zeigte sich eine allmähliche konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz, die jeweils etwas stärker war als bei der jeweiligen Konzentration der Einzelsubstanz BCNU bzw. Spe/NO. Die Zellvitalität sank dabei allmählich von 70 % auf 55%. (s. Tab.3 und Abb. 5)

Bei Inkubation mit 500  $\mu\text{M}$  BSO über 15 Stunden und anschließender Zugabe von 80  $\mu\text{M}$  BCNU für weitere 3 Stunden wurde wiederum nur eine sehr geringe Restfluoreszenz und eine Zellvitalität von 65 % beobachtet.

Im Falle der weiteren Zugabe von 0,25 mM Spe/NO für 2 Stunden zu Proben, die bereits mit 500  $\mu\text{M}$  BSO für 15 Stunden und 80  $\mu\text{M}$  BCNU für 1 Stunde vorinkubiert waren, konnte man keine Fluoreszenz mehr beobachten bei einer Zellvitalität von 60 %. Die Vitalität der Kontrollen lag bei 70-80 %.

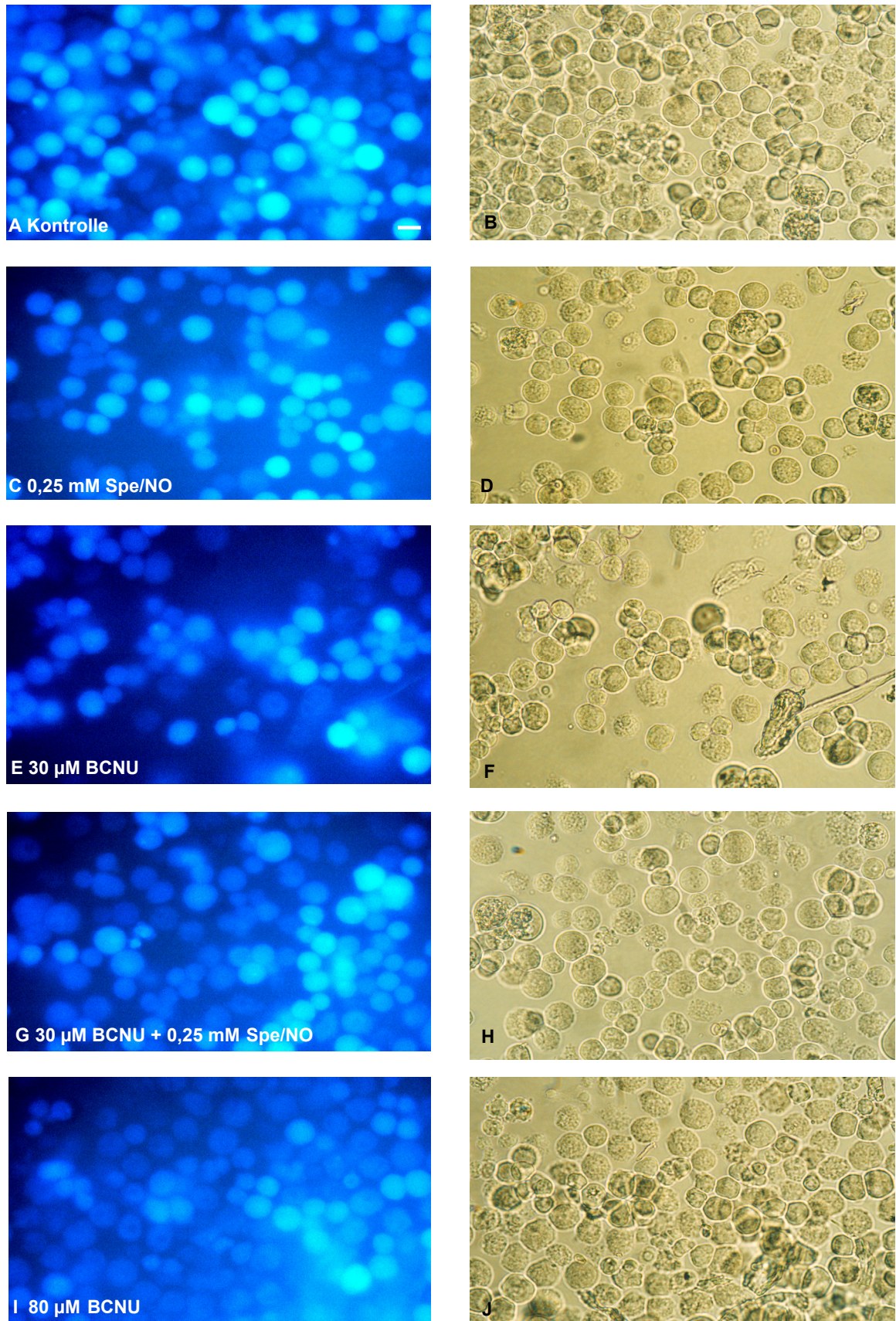
Dies bedeutet, dass bei Inselzellen die Inkubation mit einer Kombination von GSH-Inhibitor und NO-Donor zu einer sehr starken GSH-Abnahme führt mit zusätzlicher Abnahme der Zellvitalität.

**Tabelle 3:** Die mBCI-abhängige Fluoreszenzintensität wurde nach Inkubation mit den NO-Donor S-Nitrosocystein (SNOC) oder SperminNO (Spe/NO) sowie dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU oder dem  $\gamma$ -GCS-Inhibitor BSO über 2 Stunden dargestellt. BCNU wurde immer eine Stunde vorinkubiert. Subjektive Skalierung der Fluoreszenzintensität von 0 - 5. Die Vitalität nach 2 h Inkubation mit den Zusätzen lag bei 50-70 %. Nach längeren Inkubationszeiten (4 und 12 h) zeigte sich meist keine Fluoreszenz mehr und die Vitalität fiel auf unter 50 % ab. Die Vitalität der unbehandelten Kontrollen lag bei 70-80 %. n=3.

Inkubation	2h	4 h	12h
<b>K</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>80 <math>\mu</math>M BCNU+ 0,5 mM SNOC</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>80 <math>\mu</math>M BCNU+ 1 mM SNOC</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	
<b>500 <math>\mu</math>M BSO+ 0,5 mM SNOC</b>			<b>0</b>
<b>500 <math>\mu</math>M BSO+ 0,5 mM Spe/NO</b>			<b>0</b>
<b>10 <math>\mu</math>M BCNU + 0,25 mM Spe/NO</b>	<b>4</b>		
<b>30 <math>\mu</math>M BCNU + 0,25 mM Spe/NO</b>	<b>3,5</b>		
<b>50 <math>\mu</math>M BCNU + 0,25 mM Spe/NO</b>	<b>2,5</b>		
<b>70 <math>\mu</math>M BCNU + 0,25 mM Spe/NO</b>	<b>2</b>		
<b>80 <math>\mu</math>M BCNU + 0,25 mM Spe/NO</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>80 <math>\mu</math>M BCNU + 0,5 mM Spe/NO</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	

**Abbildung 5:** MBCI-abhängige Fluoreszenz von Inselzellen nach Inkubation über 2 Stunden (bzw. 3 Stunden bei BCNU). Unbehandelte, mBCI-gefärbte Zellen zeigten meist eine intensiv blaue Fluoreszenz mit mittelstark erscheinendem Zytoplasma und vielfach etwas stärker fluoreszierendem Zellkern (A). Die Vitalität der Zellen lag bei 70-80 % (A). Nach Inkubation mit 0,25 mM Spe/NO für 2 h (C) war eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen zu beobachten bei einer Zellvitalität von 70 %. Nach Inkubation der Inselzellen mit 30  $\mu$ M BCNU für 3 h (E) bzw. mit 30  $\mu$ M BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h) (G) zeigte sich eine leichte bis mittelstarke Abnahme der Fluoreszenz bei einer Vitalität von 70 bzw. 65%. Zudem beobachtete man nach Inkubation mit 80  $\mu$ M BCNU (3h) (I) eine starke Fluoreszenzabschwächung. Die Abbildungen B, D, F, H und J zeigen die entsprechenden durchlichtmikroskopischen Ausschnitte. Der weiße Balken entspricht 5  $\mu$ m. n=3. (siehe nächste Seite)

**Abbildung 5:**



### 3.7 Biochemische GSH-Bestimmung

Diese Versuche wurden zur Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes der Inselzellen nach nitrosativem Stress bzw. Enzymhemmung durchgeführt.

In ersten Versuchen wurde der GSH-Gehalt in unbehandelten, mit 80  $\mu\text{M}$  BCNU (3h), 0,25 mM Spe/NO (2h), 80  $\mu\text{M}$  BCNU (3h) + 0,25 mM Spe/NO (2h) sowie mit 1 mM Diamid (30 min) inkubierten Zellen gemessen. Pro Probe wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Dafür mußten die Inselzellen von drei Wistar Ratten eingesetzt werden. Die Messmethode musste mehrfach angepasst werden, da hier primäre Inselzellen eingesetzt wurden, die aufgrund der sehr aufwendiger Gewinnung, geringer Zellausbeute pro Ratte (max. 1,5 bis  $2 \times 10^6$  Inselzellen/Ratte) und ihrer begrenzten Lebenszeit in der Zellkultur von 2-3 Tagen nur in geringerer Anzahl als üblich vorgesehen eingesetzt werden konnten.

Die ersten Messungen, die in 96-well Platten in einem ELISA-Photometer (Titertek Multiskan Plus, MKII, Flow Laboratories) mit 30 mM Farbstoff DTNB durchgeführt wurden, zeigten keine positiven GSH-Messwerte bei jedoch messbaren Protein-Werten von 200 - 300  $\mu\text{g}$  Protein/ml. Es erfolgte eine Eichreihenoptimierung in einer Küvette in einem Spectrometer (Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrometer (Pharmacia)). In den nächsten Versuchen wurde dieses Spectrometer eingesetzt und hiermit konnte in 1 Probe mit jeweils  $1 \times 10^6$  unbehandelten Zellen nach 1 Stunde Ruhephase GSH-Werte von 659 und 1014  $\mu\text{M}$  GSH/mg Protein gemessen werden.

Anschließend wurden isolierte Inselzellen aus 4 Wistar Ratten (Ausbeute ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/Ratte) eingesetzt und GSH-Messungen für unbehandelte Zellen, mit 0,25 mM Spe/NO (2 h), 30  $\mu\text{M}$  BCNU (3 h), 30 mM BCNU (3h) + 0,25 mM Spe /NO (2 h) bzw. 0,25 mM Diamid (3 h) inkubierten Zellen durchgeführt. (s. Tab.4)

**Tabelle 4:** GSH-Konzentration, 30 mM Farbstoff DTMB, n=2

<b>Inkubation: (BCNU wurde 1 h vorinkubiert)</b>	<b>GSH [<math>\mu\text{M}</math> / <math>\mu\text{g}</math> Protein]</b>
Kontrolle (unbehandelt)	<b>920</b>
30 $\mu\text{M}$ BCNU (3 h)	<b>611</b>
0,25 mM Spe/NO (2 h)	<b>558</b>
30 $\mu\text{M}$ BCNU (3h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h)	<b>682</b>
0,25 mM Diamide (3 h)	<b>362</b>

Es folgte eine Austestung der GSH-Eichreihe mit Einsatz von nur noch 6 mM des Farbstoffes DTNB, aufgrund der Vermutung das der Farbstoff mit 30 mM für solch geringe Mengen GSH zu konzentriert sei. Aufgrund der Ergebnisse wurden fortan 6 mM DTNB eingesetzt.

Um Unterschiede zwischen den Präparationen auszugleichen, wurden die Zelllysate von 3 Versuchen gepoolt und anschließend die GSH-Messungen durchgeführt.

An 3 Tagen wurden Inselzellen von je 2 Ratten präpariert, am jeweiligen Präparationstag wurden die Zellen gleichmäßig mit 3 ml Medium in 3,5 cm Platten ausgesät, dann ohne Zusatz, mit 30 µM BCNU für 3 Stunden, mit 0,25 mM Spe/NO für 2 Stunden, 30 µM BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2h), sowie 0,25 mM Diamid für 30 min inkubiert und dann lysiert. Es wurden insgesamt ca.  $5 \times 10^6$  Zellen von 6 Ratten mit einer Vitalität von 70 - 75 % eingesetzt, d.h.  $1 \times 10^6$  Zellen pro gleichartig behandelte Probe. Die Lysate gleichartig behandelte Proben aus den 3 Versuchen wurden zusammengegeben und dann die GSH-Messung und Protein-Messung durchgeführt. (s. Tab.5)

**Tabelle 5:** GSH-Konzentration der gepoolten Proben, 6 mM Farbstoff DTMB, n=2

<b>Inkubation: (BCNU wurde 1 h vorinkubiert)</b>	<b>GSH [<math>\mu\text{M}</math> / <math>\mu\text{g}</math> Protein]</b>
Kontrolle (unbehandelt)	<b>1583</b>
30 $\mu\text{M}$ BCNU (3 h)	<b>1397</b>
0,25 mM Spe/NO (2 h)	<b>1087</b>
30 $\mu\text{M}$ BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h)	<b>910</b>
0,25 mM Diamid (30 min)	<b>968</b>

Die gemessenen GSH-Konzentrationen zeigten eine allmähliche Abnahme nach GSH-Reduktase-Hemmung, NO-Exposition mit Spe/NO sowie GSH-Reduktase-Hemmung + NO-Exposition im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Bei der Inkubation mit dem GSH-Oxidans Diamid zeigte sich auch eine deutliche Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentration. Diese Ergebnisse entsprechen tendentiell den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen.

Dies zeigt eine Korrelation der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse mit den biochemisch gemessenen GSH-Konzentrationen in den gepoolten Zellenproben.

### **3.8 Mitochondriales Membranpotential nach nitrosativem Stress und Störung des GSH-Stoffwechsels**

Diese Versuche wurden durchgeführt, um das mitochondriale Membranpotential von Inselzellen nach nitrosativem Stress bzw. nach Störung des Glutathionstoffwechsels zu untersuchen.

Für alle folgenden Versuche wurden nach der Inselzellisolierung die vereinzelt Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1ml Medium/well) -falls nicht anders vermerkt - in Medium mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glukose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert.

Nach einer Stunde Erholungsphase nach Zellvereinzeltung - falls nicht anders vermerkt - wurden die Inselzellen bei 37 °C ohne und mit Zusätzen inkubiert, anschließend wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIOC<sub>2</sub>(5), welcher nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotential in lebenden Zellen markiert, gefärbt, fluoreszenzmikroskopisch untersucht und photographiert.

In den unbehandelten Kontrollen zeigte sich nach Anfärben der Zellen mit DIOC<sub>2</sub>(5) eine kräftige rote Fluoreszenz der Mitochondrien in Form fadenförmiger Strukturen. Die Zellvitalität in den unbehandelten Kontrollen lag bei 70 - 80 %.

In den ersten Versuchen wurde mit 0,5 - 1 mM SNOC für 1 Stunde inkubiert. Nach DIOC<sub>2</sub>(5)-Markierung zeigten sich keine oder nur geringe Fluoreszenzunterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen bei unbeeinträchtigter Zellvitalität von 80 %.

Nach 2-stündiger Inkubation mit Spe/NO (0,05/ 0,1/ 0,25 mM) zeigte sich hingegen eine NO-Donor-konzentrationsabhängige (sehr leichte, leichte bzw. starke) Abnahme der rot-fluoreszierenden Mitochondrien bei einer unveränderten Zellvitalität von 80 % (s. Abb. 6). Nach Inkubation mit 80 µM BCNU für 3 Stunden zeigte sich eine sehr starke Abnahme der fluoreszierenden Zellen bei wiederum unveränderter Vitalität von 80%.(s. Abb.6)

Bei Inkubation mit 80 µM BCNU für eine Stunde und nachfolgender Zugabe von 0,25 mM Spe/NO für weitere 2 Stunden wurde eine noch stärkere Abnahme als bei 80 µM BCNU allein bei leichter Vitalitätserniedrigung auf 70% beobachtet. Hier zeigten nur noch sehr wenige Zellen fluoreszierende Mitochondrien. (s. Abb.6)

Bei der Inkubation mit 0,25 mM der Muttersubstanz von Spe (Spe x 4 HCl) zeigten sich keine Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen in Hinblick auf Fluoreszenz und Vitalität.



Des Weiteren wurde über 12 Stunden mit DETA/NO (0,1/ 0,25/ 0,5 mM) inkubiert. Hier zeigte sich ebenfalls eine NO-Donor-konzentrationsabhängige (leichte, mittlere bzw. starke) Abnahme der Fluoreszenz bei einer Vitalität von 80 % bei 0,1 mM und 0,25 mM DETA/NO bzw. 60 % bei 0,5 mM DETA/NO. Bei Inkubation für 13 Stunden mit 80  $\mu$ M BCNU zeigte sich eine sehr starke Fluoreszenzabnahme bei einer Vitalität von 60 %, bei Inkubation mit 0,5 mM DETA als Negativkontrolle über 12 Stunden ergaben sich keine Fluoreszenz- und Vitalitätsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. (s. Abb. 7)

Bei einstündiger Inkubation von 80  $\mu$ M BCNU mit anschließender Zugabe von 0,5 mM DETA/NO für weitere 12 Stunden zeigte sich eine noch stärkere Abnahme der Fluoreszenz als bei 80 mM BCNU allein, auch sank die Vitalität auf 40 %. (s. Abb.7)

Dies bedeutet eine deutliche Abnahme der mitochondrienabhängigen Fluoreszenz und somit Störung der Mitochondrienfunktion nach nitrosativem Stress (Spe/NO und DETA/NO) sowie eine stärkere Abnahme nach Störung des GSH-Stoffwechsels mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU.

Die Kombination von nitrosativem Stress und GSH-Stoffwechselstörung mit BCNU führte zu einer noch stärkeren Abnahme als nach Inkubation mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. In den Langzeitversuchen über 12 Stunden führte dies konzentrationsabhängig auch zum zunehmenden Vitalitätsverlust.

Bei Anwendung von 10 % FCS-haltigem Medium in Versuchen, bei denen mit Spe/NO (0,05/ 0,1/ 0,25 mM) und 0,25 mM Spe über 2 Stunden bzw. DETA/NO (0,1/ 0,25/ 0,5 mM) sowie 0,5 mM DETA über 8 Stunden inkubiert wurde, zeigte sich in alle Proben die gleiche intensive mitochondriale Fluoreszenz wie in den Kontrollen. Dies verdeutlicht die Schutzfunktion der höheren FCS-Konzentration gegenüber nitrosativem Stress.

Auch nach einer Ruhezeit über Nacht zeigte sich bei unbehandelten Proben eine unveränderte kräftige mitochondriale Fluoreszenz ohne Abschwächung im Vergleich zum Vortag.

**Abbildung 6:** Unbehandelte, DIOC<sub>2</sub>(5)-gefärbte Zellen zeigten eine intensiv rote Fluoreszenz, der im Zytoplasma liegenden intakten Mitochondrien, die Zellkerne zeigten keine Fluoreszenz. Die Vitalität der Zellen lag bei 80 % (A). Nach Inkubation mit 0,25 mM Spe/NO für 2 Stunden (C) war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität in den Zellen zu beobachten bei einer unveränderten Zellvitalität von 80 %. Nach Inkubation der Inselzellen mit 80 µM BCNU für 3 h (E) bzw. mit 80 µM BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h) (G) zeigte sich eine weitere starke bzw. sehr starke Abnahme der Fluoreszenz bei einer Vitalität von 80 bzw. 70%. Abbildung B, D, F, H zeigen die entsprechenden durchlichtmikroskopischen Ausschnitte. Der weiße Balken entspricht 5 µm. n=3 (siehe nächste Seite)

Abbildung 6:

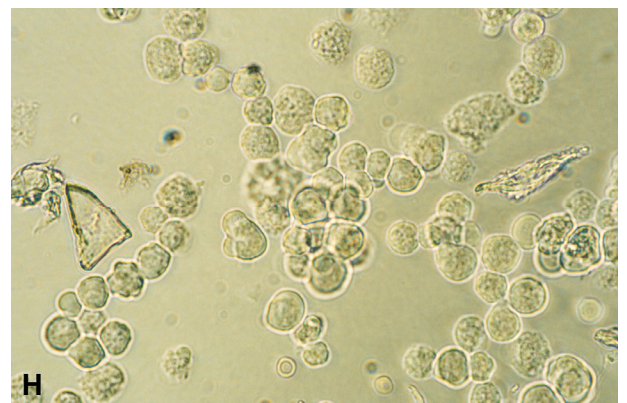
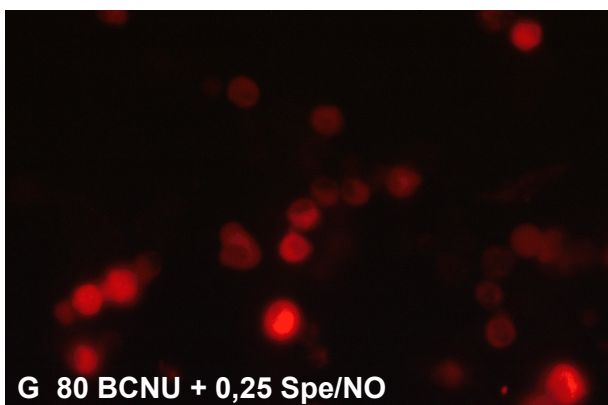
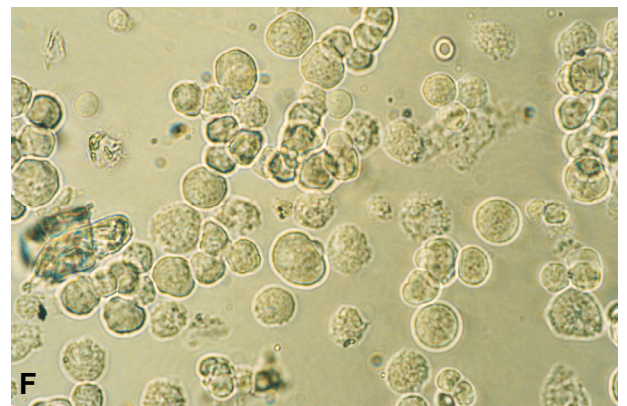
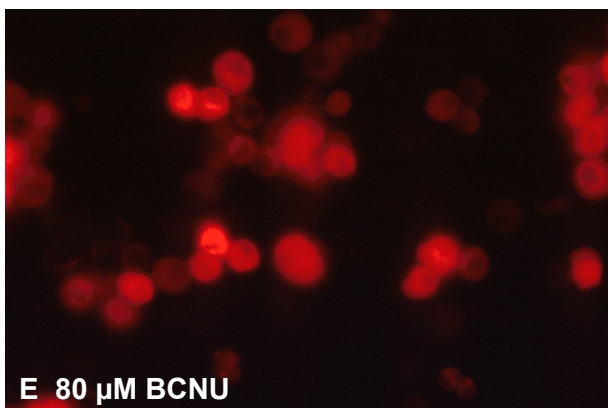
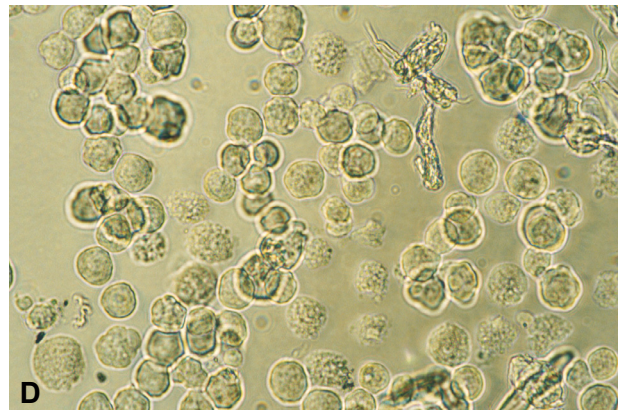
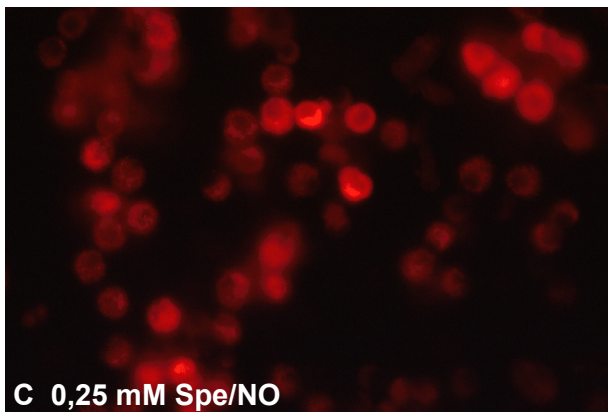
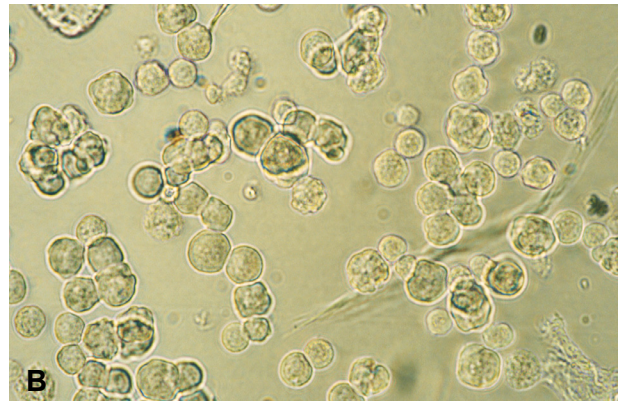
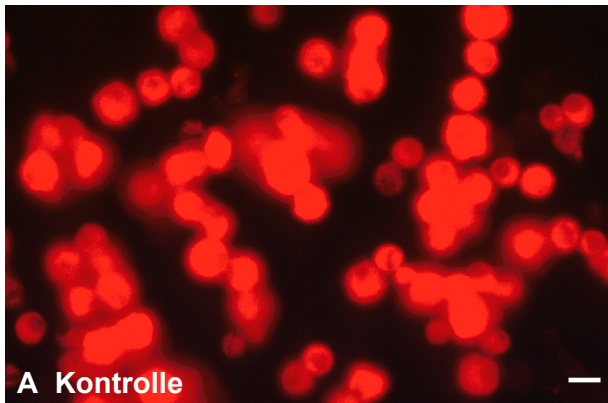
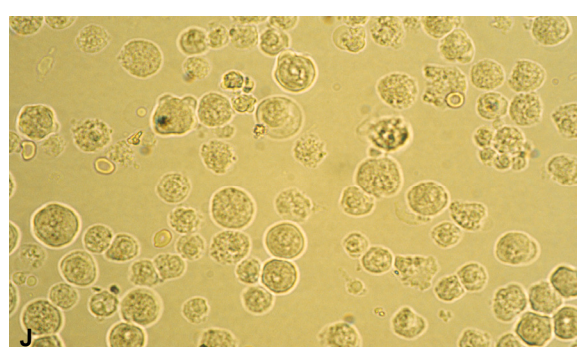
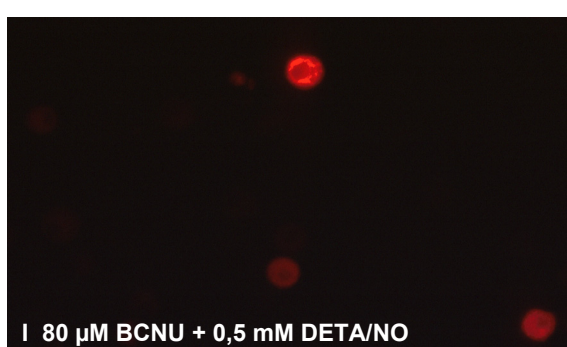
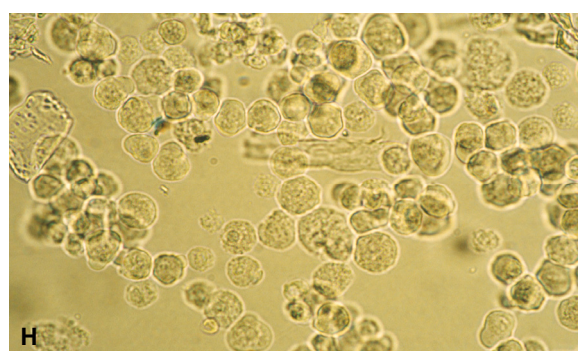
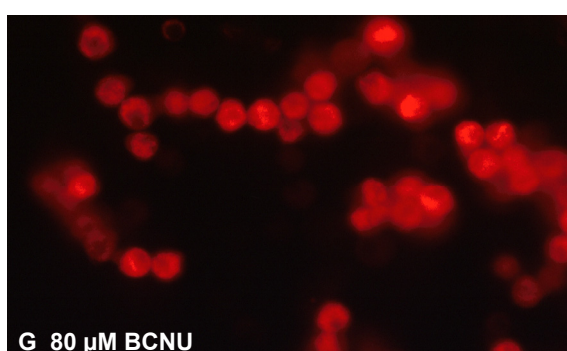
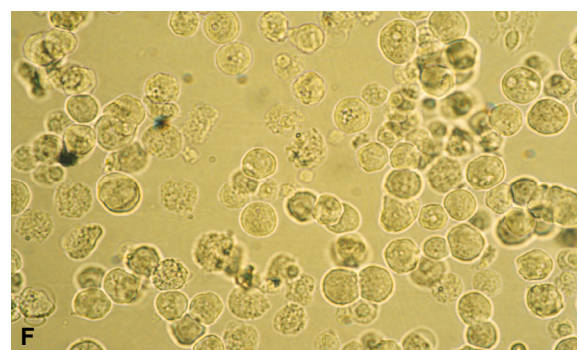
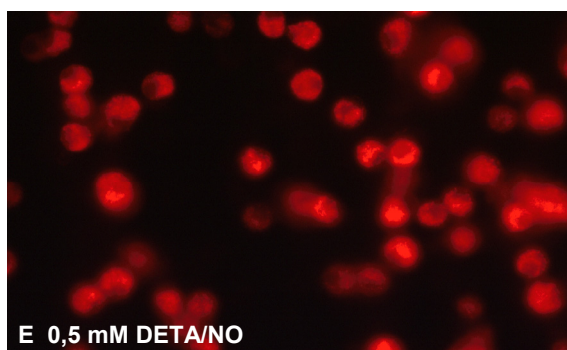
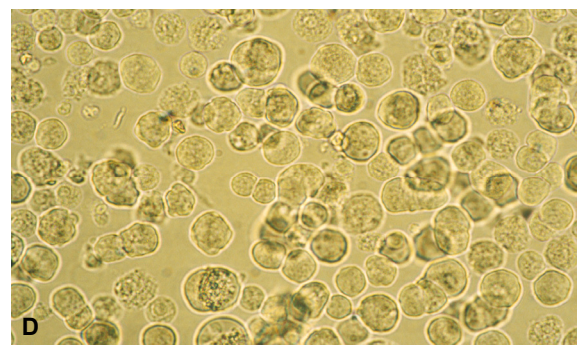
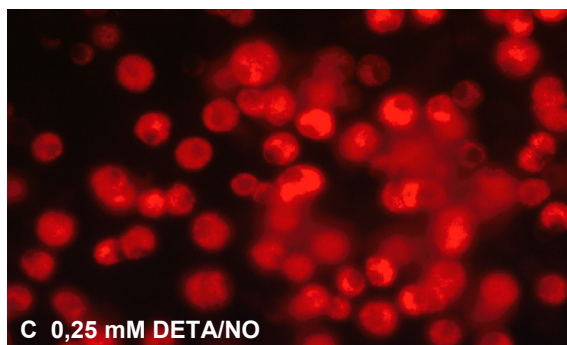
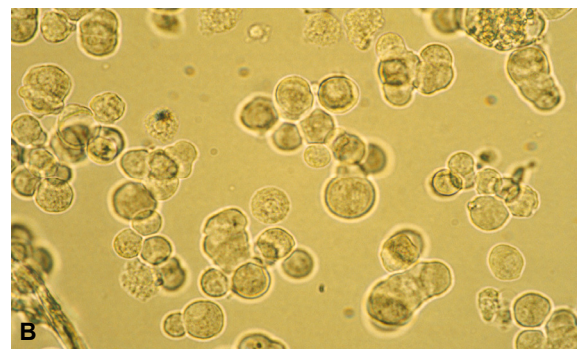
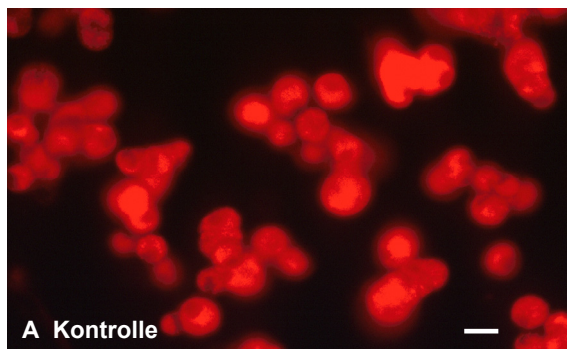


Abbildung 7:



**Abbildung 7:** In den Inselzellen, die mit 0,25 mM DETA/NO (C) bzw. mit 0,5 mM DETA/NO (E) für 12 Stunden behandelt wurden, zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der DIOC<sub>2</sub>(5)-abhängigen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A). Die Vitalität der Zellen sank dabei von 80 % in der Kontrolle und bei den mit 0,25 mM DETA/NO behandelten Zellen auf 60 % in den mit 0,5 mM DETA/NO behandelten Zellen. Nach Inkubation der Inselzellen mit 80 µM BCNU für 13 h (G) bzw. mit 80 µM BCNU (13 h) + 0,5 mM DETA/NO (12 h) (I) zeigte sich eine weitere starke bzw. sehr starke Abnahme der Fluoreszenz bei einer Vitalität von 60 % bzw. 40 %. Abbildung B, D, F; H und J zeigen die entsprechenden durchlichtmikroskopischen Ausschnitte. Der weiße Balken entspricht 5 µm. n=3.

Nun wurden in einem Parallelversuch die Inselzellen ohne Zusatz, mit 0,25 mM Spe/NO (2 h), 20 mM bzw. 30 mM BCNU (3 h), 20 µM BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h) bzw. 30 µM BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h) für 2 Stunden inkubiert, wobei mit BCNU immer 1 Stunde vorinkubiert wurde. Dann wurde mit mBCl oder DIOC<sub>2</sub>(5) und HOECHST 33342, einem Fluoreszenzfarbstoff, der Zellkerne markiert, angefärbt und mit unbehandelten gefärbten Zellen verglichen.

Bei den mit mBCl gefärbten Zellen zeigte sich bei 0,25 mM Spe/NO eine leichte, bei 20 µM BCNU ebenfalls eine leichte und bei 30 µM BCNU eine mittelstarke Abnahme der Fluoreszenzintensität bei einer Zellvitalität von 85 % wie bei den Kontrollen (s. Abb. 5). In den entsprechend behandelten Proben, die mit DIOC<sub>2</sub>(5) und HOECHST 33342 angefärbt wurden, zeigten sich bei 20 bzw. 30 µM BCNU keine Unterschiede der mitochondrialen Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen, bei 0,25 mM Spe/NO zeigte sich jedoch eine leichte Fluoreszenzabnahme. (s. Abb.8)

Bei den Proben, die mit 20 µM BCNU + 0,25 mM Spe/NO bzw. 30 µM BCNU + 0,25 mM Spe/NO behandelt wurden, zeigten sich bei beiden Färbungsansätzen eine starke Fluoreszenzabnahme, bei einer Vitalität von 75 % bzw. 65 %. (s. Abb. 5 u. 8) Die Fluoreszenzabnahme war dabei bei 30 µM BCNU + 0,25 mM Spe/NO etwas stärker als in den Proben mit 20 µM BCNU + 0,25 mM Spe/NO.

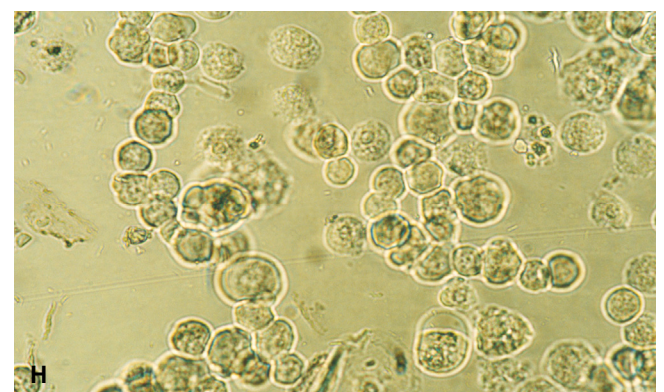
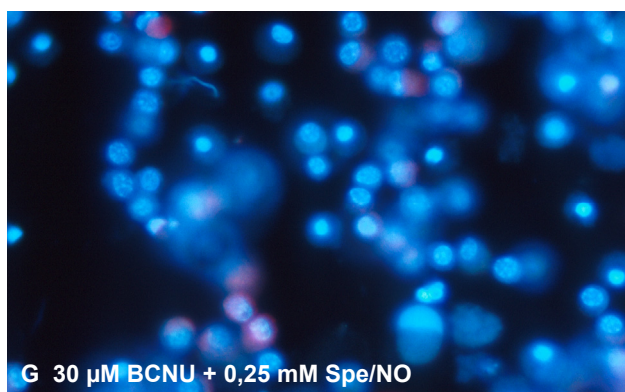
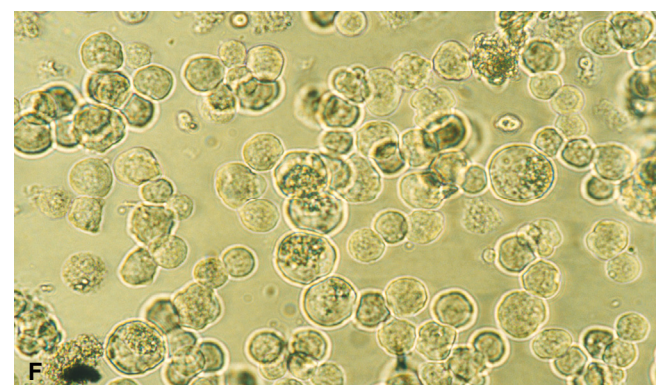
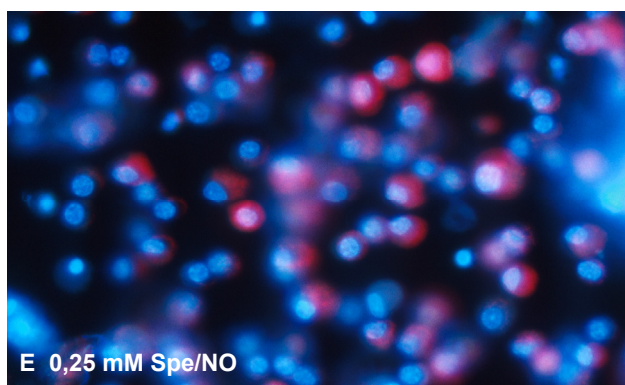
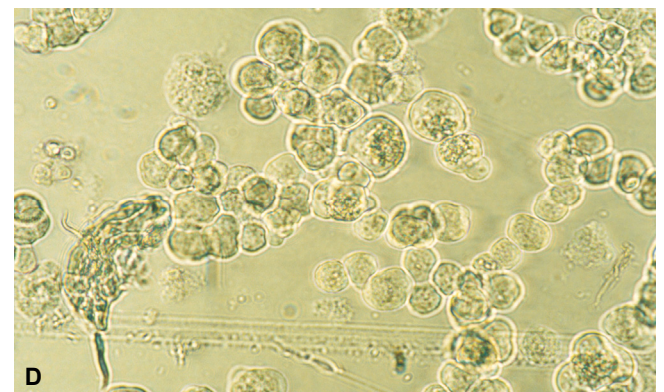
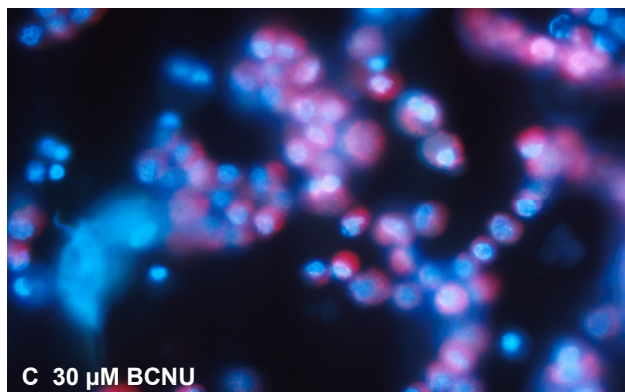
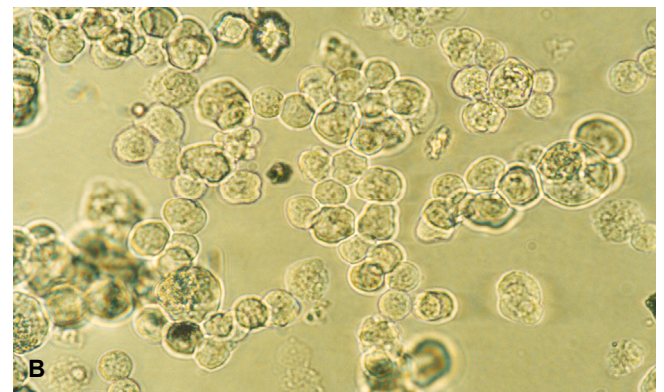
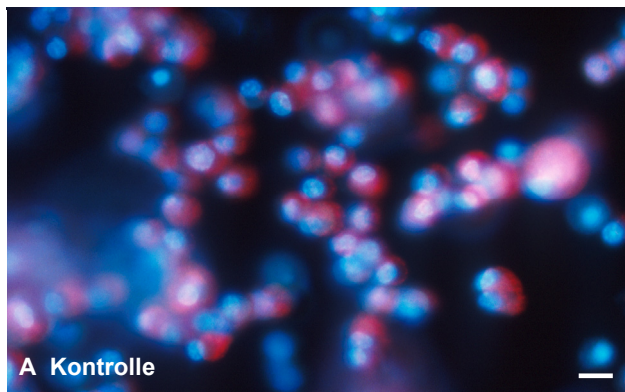
Dies bedeutet, dass der GSH-Stoffwechsel durch 0,25 mM Spe/NO und 20 µM BCNU leicht, jedoch durch 30 µM BCNU mittelstark gestört wird. Die mitochondriale Fluoreszenz wird jedoch durch 20 bzw. 30 µM BCNU nicht beeinträchtigt, bei 0,25 mM Spe/NO kommt es nur zu einer leichten Abschwächung und damit Störung der mitochondrialen Funktion.

Die Kombination von nitrosativem Stress und GSH-Reduktaseinhibitor führt jedoch zu einer deutlichen Störung sowohl des GSH-Stoffwechsels als auch der mitochondrialen Funktion mit leichtem Vitalitätsverlust.

Mit dem HOECHST 33342-Farbstoff wurden alle Zellkerne blau fluoreszierend dargestellt. Bei den lebenden Zellen beobachtete man einen großen hellblauen Kern, bei diesen Zellen war auch eine intensive mitochondrienabhängige Fluoreszenz zu erkennen. Pyknotische, kleine, intensiv blau fluoreszierende Zellkerne zeigten sich bei toten Zellen, diese wiesen auch keine mitochondriale Fluoreszenz mehr auf. Diese Färbung wurde zur Veranschaulichung der Zellvitalität durchgeführt.

**Abbildung 8:** Doppelfärbung mit DIOC<sub>2</sub>(5) und HOECHST 33342-Kernfärbung  
In Inselzellen, die 30 µM BCNU (C) für 3 Stunden behandelt wurden, zeigte sich keine Abnahme der DIOC<sub>2</sub>(5)-abhängigen Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A). Die Vitalität dieser Zellen lag wie bei den Kontrollen bei 85 %. Eine leichte Fluoreszenzabnahme wurde nach Inkubation mit 0,25 mM Spe/NO über 2 Stunden beobachtet (Vitalität: 85 %)(E). Eine deutliche Abnahme der DIOC<sub>2</sub>(5)-abhängigen Fluoreszenzintensität zeigte sich erst bei Inkubation mit 30 µM BCNU (3 h) + 0,25 mM Spe/NO (2 h) über 2 Stunden bei einer Vitalität von 65 % (G). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33342 wird der pyknotische Zellkern von toten Zellen intensiv blau und der große Zellkern der vitalen Zellen hellblau dargestellt. Abbildung B, D, F und H zeigen die entsprechenden durchlichtmikroskopischen Ausschnitte. Der weiße Balken entspricht 5 µm. n=3. (siehe nächste Seite)

**Abbildung 8:**



### 3.9 Versuche zur Reassoziaton der Inselzellen nach nitrosativem Stress

Es wurde beobachtet, dass Inselzellen nach Vereinzeln in der Erholungsphase und bei Langzeitversuchen über mehrere Tage die Tendenz zur Reassoziaton und Bildung von PseudoinseIn, d.h. Zusammenlagerung von vielen Zellen zu Zellkolonien, zeigen. In den folgenden Versuchen wurde diese Reassoziatonstendenz ohne und auch nach Inkubation mit dem NO-Donor DETA/NO untersucht.

Nach Inselzellisolierung wurden die vereinzeln Inselzellen ( $1,7 \times 10^5/2$  ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 5,5 mM Glukose in 6-well-Zellkultur-Schalen kultiviert und eine 3- oder 12-stündige Erholungsphase eingehalten. Danach wurde für 24 h ohne und mit 0,5 mM DETA bzw. 0,5 mM DETA/NO inkubiert, mit Zinquin gefärbt und besonders die Reassoziaton, aber auch die Fluoreszenz und die Vitalität der Zellen untersucht.

Dabei war nach 3-stündiger Erholungszeit nach Zellvereinzeln neben vielfach noch einzeln liegenden Zellen schon häufig die Reassoziaton von 2 oder 3 Zellen, jedoch noch keine PseudoinseIn zu beobachten. Nach 12-stündiger Erholungszeit lagen noch mehr 2er- bis 4er-Reassoziatonen sowie jetzt auch wenige PseudoinseIn vor.

Wurde nun nach der jeweiligen Erholungsperiode über weitere 24 Stunden ohne Zusatz bzw. mit 0,5 mM DETA inkubiert, zeigten sich in Proben mit unterschiedlichen Erholungszeiten keine Unterschiede mehr. Es lagen neben einzeln liegenden Zellen, nun viele 2er- bis 4er-Reassoziatonen und mehrere PseudoinseIn vor. Die Zellen zeigten die bereits beschriebene starke, heterogene  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz mit relativ dunklen Kernen, mittelstarkem Plasma und sehr starken, großen Granula bei einer Vitalität von 70-75 %.

Bei den über 24 Stunden mit 0,5 mM DETA/NO inkubierten Zellen mit 3-stündiger und auch mit 12-stündiger Ruhezeit wurde im Vergleich hauptsächlich einzeln liegende Zellen, nur einige 2er bis 4er-Reassoziatonen und wenige PseudoinseInbildung beobachtet. Die  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz war wiederum insgesamt deutlich schwächer und unterschied sich durch das Vorliegen von kleineren, weniger hellen Granula bei einer Vitalität von ca. 45-50%. Die Zellen mit 3-stündiger bzw. 12-stündiger Ruhezeit unterschieden sich nach weiterer 24-stündiger Inkubation in gleichartig behandelten Proben nicht mehr in ihrer Reassoziatonstendenz, Fluoreszenzintensität und Vitalität.



Dies zeigt, dass die Reassoziaton der Inselzellen durch NO gehemmt wird. Das deutet darauf hin, dass NO die Ausbildung von Interzellulärkontakten zwischen den Inselzellen stören könnte.

### **3.10 Versuche zum Inselzellverhalten nach Glukosezugabe**

Da Inselzellen bei Anstieg der Glukosekonzentration in vivo degranulieren und das Insulin aus den Granula ins Serum freisetzen, wurde untersucht, ob sich dieser Vorgang unter Zinquinanfärbung auch in vitro beobachten lässt.

Nach der Inselzellisolierung wurden die vereinzelteten Inselzellen ( $1 \times 10^5$ /1 ml Medium/well) in Medium mit 2,5 % FCS und 1 mM Glukose in 12-well-Zellkultur-Schalen kultiviert und eine 10-12 stündige Erholungsphase eingehalten.

Dann wurde zu einigen Proben 20 mM Glukose gegeben, die Zellen dann 10 min bzw. 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, mit Zinquin gefärbt und mit den Zellen in Medium mit nur 1 mM Glukose verglichen. Man konnte weder nach 10 min noch nach 1 Stunde Inkubation mit 20 mM Glukose eine Veränderungen der Granula beobachten. Insgesamt waren keine Unterschiede hinsichtlich Größe, Helligkeit und Anzahl der Granula sowie des Gesamtbildes zwischen den Proben zu erkennen. Die Vitalität lag in allen Proben bei 70 %.

Anschließend wurden Zellen erst mit Zinquin gefärbt, dann unter Sichtkontrolle 20 mM Glukose zugegeben und mit Zellen in 1mM Glukose-haltigen Medium verglichen. Auch hier waren keine Veränderungen der Fluoreszenz im Vergleich zu den Zellen ohne Glukosezugabe zu beobachten. Insgesamt waren keine Unterschiede hinsichtlich des Gesamtbildes und insbesondere bezüglich Größe, Helligkeit und Anzahl der Granula zwischen den Proben zu erkennen. Die Vitalität lag in allen Proben bei 70 %.

Somit konnte der physiologische Vorgang der Degranulation der Insulingranula in vitro unter diesen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden.

### **3.11 Zytokin-Aktivierung der iNOS in Inselzellen**

In diesen Versuchen wurde der Einfluss verschiedener proinflammatorischer Zytokine und deren Kombination auf die Aktivierung der iNOS in Ratteninselzellen und deren Einfluss auf die  $Zn^{2+}$ -Homöostase untersucht.

$1 \times 10^5$  Zellen wurden in 1 ml Medium pro Vertiefung in eine 12-well-Platte in RPMI 1640 Medium mit 2,5% FCS und 5,5 mM Glukose ausgesät. 12 Stunden

nach Inselzellvereinzelung wurden das Zytokin IL-1 $\beta$  (500 U/ml) bzw. eine Kombination aus verschiedenen Zytokinen (Cytomix: 200 U/ml IL-1 $\beta$  + 500 U/ml TNF- $\alpha$  + 250 U/ml  $\gamma$ -IFN) bzw. der iNOS-Inhibitor NIO (N<sup>o</sup>-Iminoethyl-L-Ornithin, 0,25 mM) in den jeweiligen Konzentrationen und Kombinationen zugegeben und die Zellen 24 h bzw. 48 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen in Medium ohne Zytokinzusätze bzw. nur mit NIO inkubiert sowie nur Medium ohne Zellen und ohne Zusätze bzw. mit NIO parallel inkubiert. Die Zellen wurden mit Zinquin angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop die intrazelluläre Zn<sup>2+</sup>-abhängige Fluoreszenz untersucht, photographiert und die Vitalität bestimmt.

Nach 24-stündiger Inkubation war in allen Proben die bereits beschriebene helle, inhomogene Fluoreszenz ohne Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu beobachten. Die Vitalität lag bei allen Proben bei 70 %.

Zur Quantifizierung der iNOS-Aktivierung wurden nach 24 Stunden Aliquots der Kulturüberstände (2x 10<sup>5</sup> Zellen in 300  $\mu$ l Medium/Probe) entnommen und als Maß für die Aktivität der NO-Synthase die Konzentration von Nitrit, einem Oxidationsprodukt von NO, mit Hilfe des Griess-Assays bestimmt.

Im Überstand der unbehandelten Zellen wurden 0,15 nM Nitrit/1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24 h gemessen. In den mit IL-1 $\beta$  behandelten Proben wurde 0,31 nM Nitrit/1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24 h und bei den mit dem Cytomix inkubierten Zellen wurde 0,64 nM Nitrit/1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24 h nachgewiesen. Dies entspricht einer zweifachen Zunahme der Nitritmenge bei IL-1 $\beta$  bzw. einer vierfachen Zunahme der Nitritmenge bei Inkubation mit Cytomix im Vergleich zum Kontrollwert. In den Überständen der Zellen, die nur mit NIO bzw. mit Cytomix und NIO inkubiert wurden, wurden 0,05 nM Nitrit/1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24 h bzw. 0,06 nM Nitrit/1 x 10<sup>5</sup> Zellen/24 h gemessen. (s. Tab. 8)

Diese Ergebnisse zeigten, dass Inselzellen nach Zytokin-Aktivierung zwar NO produzieren, jedoch nur in sehr geringen, im nanomolaren Bereich liegende Mengen. Diese Mengen führten nicht zu fluoreszenzmikroskopisch erfassbaren Veränderungen der Zink-Homöostase. Zudem zeigt sich, dass NIO auch eine konstitutive NO-Produktion in nicht-zytokinaktivierten Zellen hemmt, da die Nitrit-Werte der NIO-inhibierte Zellen unter denen der unbehandelten Kontrollen lagen.

Der Versuch zur Nitritbestimmung wurde zweimalig durchgeführt, da primäre Inselzellen eingesetzt wurden, die aufgrund des sehr aufwendigen Gewinnungsverfahrens und ihrer begrenzten Lebenszeit in der Zellkultur von 2-3 Tagen nur in geringer Anzahl zur Verfügung standen.

Anschließend wurde über 48 Stunden mit dem Cytomix bzw. Cytomix + NIO inkubiert und mit Zinquin markiert. Dabei wurde wiederum keine Abnahme der Fluoreszenzintensität in den Proben mit Cytomix im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bzw. den Proben mit Cytomix + NIO beobachtet. Es zeigten sich lediglich etwas kleinere und weniger hell fluoreszierenden Granula als in der Kontrolle. Die mit Cytomix + NIO behandelten Proben zeigten keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Vitalität lag in allen Proben wiederum bei ca. 70 %.

Es ist anzunehmen, dass auch nach 48 Stunden Inkubation die durch die Zytokinaktivierung über die iNO-Synthase gebildeten NO-Mengen zu gering sind, um die Zink-Homöostase der Inselzellen zu stören.

**Tabelle 8:** Nitritmenge nach Cytokinaktivierung über 24 Stunden

Nach 24-stündiger Aktivierung mit 500 U/ml IL-1 $\beta$  bzw. Cytomix (200 U/ml IL-1 $\beta$  + 500 U/ml TNF- $\alpha$  + 250 U/ml  $\gamma$ -IFN) zeigte sich eine 2- bzw. 4-fache Zunahme der Nitritmenge im Vergleich zum Kontrollwert. Zudem zeigte sich, dass der iNOS-Inhibitor NIO (0,25 mM) eine konstitutive NO-Produktion in nicht-zytokinaktivierten Zellen hemmt, da die Nitrit-Werte der NIO-inhibierte Zellen unter denen der unbehandelten Kontrolle lagen. n=2, aufgrund der nur begrenzten Anzahl und der Empfindlichkeit der eingesetzten primären Inselzellen.

Inkubation: 24 h	Nitrit [nM//1 x 10 <sup>5</sup> Zellen/24 h]
Kontrolle (unbehandelt)	0,15
IL-1 $\beta$	0,31
Cytomix	0,64
Cytomix + NIO	0,06
NIO	0,05

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss von NO auf die Zink-Homöostase in Pankreas-Inselzellen

Zur Veranschaulichung wurden die Betainselzellen in der Anti-Insulin-Antikörperfärbung durch die kräftige braune Anfärbung des Insulins im Zytoplasma dargestellt. Die Non-Betazellen ohne Insulinproduktion färbten sich lediglich hellgelb an. In der Negativkontrolle, bei der der 1. Antikörper weggelassen wurde, jedoch alle weiteren Schritte identisch waren, wurde nur die hellblaue Hämatoxylin-Kerngegenfärbung beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass Betainselzellen hier etwa denselben prozentualen Anteil von 60-70 % haben wie in vivo (Herold, 2001).

NO spielt in der Pathogenese des Typ1 Diabetes mellitus eine wichtige Rolle, da es als toxischer Mediator von insel-infiltrierenden Makrophagen freigesetzt wird. (Kröncke et al., 1991; Burkart, 2000). Zudem gilt das durch eine iNOS gebildete NO, das über einen längeren Zeitraum und in höheren Dosen gebildet wird (Marletta et al., 1988), als ein für die Zytotoxizität von aktivierten Makrophagen verantwortliches Agens (Hibbs et al., 1988; Xie und Nathan, 1994).

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den durch nitrosativen Stress hervorgerufenen Änderungen der  $Zn^{2+}$ -Homöostase in Inselzellen des Rattenpankreas.

Zur Darstellung von intrazellulärem labilem  $Zn^{2+}$  eignet sich das Fluorochrom Zinquin, welches nicht-fluoreszierend und membranpermeabel ist. Nach Bindung von  $Zn^{2+}$  wird es stark fluoreszierend und ermöglicht somit die Detektion von intrazellulärem  $Zn^{2+}$ . Zinquin formt Zinquin-Zink-Komplexe im Verhältnis 1:1 bzw. 2:1 mit einer Bindungskonstante von  $3 \times 10^6$  bzw.  $12 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Da die Bindungskonstante von  $Zn^{2+}$  in Metallothionein (MT) im Bereich von  $2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  liegt, ist eine Komplexierung von MT-gebundenen  $Zn^{2+}$  durch Zinquin unwahrscheinlich (Zalewski et al., 1993). Da Zinquin  $Zn^{2+}$  nicht aus Zinkfinger-ähnlichen Strukturen von Proteinen herauslösen kann, sind relative Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten somit ein Maß der Veränderungen der intrazellulären freien  $Zn^{2+}$ -Konzentration.

In pankreatischen Inselzellen wurde ein sehr großer Pool an  $Zn^{2+}$  gefunden, der die Menge im umgebenden azinärem Gewebe weit übertrifft (Zalewski et al., 1994). In Betainselzellen wird Insulin in sekretorischen Granula in Form von

Kristallen gespeichert, den Insulin-Hexamere, die 2 oder mehr Zinkionen enthalten. Man findet zudem auch einen großen extragranulären Pool an  $Zn^{2+}$  (Zalewski et al., 1994).

Mit dem  $Zn^{2+}$ -spezifischen Fluorochrom Zinquin wurde in verschiedenen Zelltypen eine niedrige  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenzaktivität als Zeichen für einen geringen Gehalt an freien, nicht Protein-komplexierten Zinkionen gefunden (Berendji et al., 1997). Nach Behandlung von unterschiedlichen Zelltypen mit NO-Donoren konnte eine Zunahme der freien intrazellulären  $Zn^{2+}$ -Konzentration vor allem im Zytoplasma beobachtet werden (Berendji et al., 1997; Haase & Beyersmann, 1999; St Croix et al., 2002).

Bei isolierten Inselzellen beobachtete ich bei einer großen Subpopulation eine starke  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenzaktivität mittels Zinquinmarkierung, besonders bei reassozierten Zellen. Dies wurde auch schon von Zalewski beschrieben (Zalewski et al., 1994). Eine starke  $Zn^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz wurde besonders in den Sekretionsgranula, eine etwas schwächere, aber deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma beobachtet, während sich in den Zellkernen keine Fluoreszenz zeigte. Nur die langzeitige Inkubation mit subtoxischen Konzentrationen des NO-Donors DETA/NO (0,25/ 0,5 mM) über 24 Stunden führte zu einer signifikanten Abnahme der stark fluoreszierenden Inselzell-Subpopulation, was fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und durchflusszytometrisch bestätigt werden konnte. Dies könnte am ehesten durch einen Verlust von  $Zn^{2+}$  aus Inselzellen unter nitrosativem Stress zu erklären sein. Im Zellkern konnte kein Anstieg der Fluoreszenz nach Inkubation mit DETA/NO beobachtet werden. Diese Beobachtungen konnten auch nur in Zellmedium mit reduzierter FSC- Konzentration von 2,5 % gemacht werden.

Bei Verwendung des Mediums mit 10 %-haltigen FCS zeigten sich in allen Versuchen keine zinquinabhängigen Fluoreszenzunterschiede. Dies deutet auf eine Schutzfunktion des FCS gegenüber nitrosativem Stress hin.

Ratteninselfzellen haben eine große Menge an Metallothionein (Andrews et al., 1990), welches für die intrazelluläre Aufnahme und Speicherung von  $Zn^{2+}$  mittels Bildung von Zink-Schwefel-Clustern verantwortlich ist (Hamer, 1986). Es wurde gezeigt, dass NO durch S-Nitrosierung der Thiol-Gruppen des Metallothioneins und nachfolgender Bildung von Disulfid-Gruppen zu einer Freisetzung von  $Zn^{2+}$

aus diesem Protein führt (Kröncke et al., 1994, Misra et al., 1996; Zangger et al., 2001).

Deshalb liegt es nahe, dass nitrosativer Stress in Inselzellen unter subtoxischen Bedingungen zu einer NO-medierten Störung der Komplexbildung und Speicherung von  $Zn^{2+}$  und anschließend zu einem Verlust der Zinkionen aus den Zellen führt.

Bei Endothelzellen wurde ein anderes Phänomen beobachtet. In diesen Zellen führte NO konzentrationsabhängig zu einem signifikanten Anstieg des freien intrazytoplasmatischen und intranukleären  $Zn^{2+}$ . Dies deutete darauf hin, dass nitrosativer Stress zu einer  $Zn^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Quellen führt (Berendji et al., 1997). Jedoch sind Endothelzellen im Gegensatz zu Inselzellen in der Lage, die Zinkionen im Zytoplasma und im Zellkern zu halten.

Da Inselzellen  $Zn^{2+}$  für die Synthese, Speicherung und Sekretion von Insulin brauchen, könnte die NO-medierte Störung der zellulären Zink-Homöostase einen molekularen Mechanismus darstellen, wie NO während lokaler entzündlicher Prozesse die Inselzellfunktion beeinträchtigt.

Auch können Betazellen selbst NO produzieren. So kann durch das Zytokin IL-1 $\beta$  in Inselzellen eine Expression der iNOS bewirkt werden (Welsh (a) und Sandler, 1992), wenngleich eine iNOS-Aktivierung humaner Inselzellen durch Kombinationen aus zwei, IL-1 $\beta$  und  $\gamma$ -IFN, bzw. drei, IL-1 $\beta$ ,  $\gamma$ -IFN und TNF- $\alpha$ , Zytokinen noch potenziert wird (Corbett et al., 1993).

Zytokine sind sehr potente Effektoren in vielen physiologischen und pathologischen Situationen. Sie spielen eine essentielle Rolle bei Entzündungsreaktionen, zellulärer Differenzierung sowie Proliferation und Reifung. Jedoch ist die Aktivität der einzelnen Zytokine abhängig vom Typ der jeweiligen Zielzelle (Karin et al., 1985).

Die 24-stündige Aktivierung der Inselzellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  bzw. einer Kombination aus IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und  $\gamma$ -IFN führte nicht zu fluoreszenzmikroskopisch erfassbaren Veränderungen der Zink-Homöostase. Nach mehrfacher Anpassung der Nachweismethoden konnte zwar 2- bzw. 4-fach mehr NO in den zytokin-aktivierten als in den nicht-zytokin-aktivierte Inselzellen nachgewiesen werden, jedoch lagen die Mengen nur in einem sehr geringen, nanomolaren Bereich. Zudem zeigte sich, dass der iNOS-Inhibitor NIO nicht nur

die iNOS der aktivierten Inselzellen, sondern auch eine konstitutive NO-Produktion in nicht-zytokinaktivierten Inselzellen hemmt, da die Nitrit-Werte der NIO-inhibierten Zellen unter denen der unbehandelten Kontrollen lagen. Die zinkunabhängige Fluoreszenzintensität mit NIO inkubierter Inselzellen zeigte keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Auch nach 48-stündiger Inkubation der Inselzellen mit den oben genannten Zytokinen zeigte sich keine Änderung der Fluoreszenzintensität. Es ist anzunehmen, dass auch nach 48 Stunden Inkubation die durch die Zytokinaktivierung über die endogene iNOS gebildeten NO-Mengen zu gering sind, um die Zink-Homöostase der Inselzellen zu stören. Somit zerstören sich Inselzellen durch endogen synthetisiertes NO nicht selbst. Diese Befunde deuten darauf hin, dass isolierte Inselzellen nach Aktivierung durch Zytokine zwar geringe NO-Konzentrationen synthetisieren, toxische Effekte jedoch nicht auftreten. Es wurde beschrieben, dass diese geringen Mengen an endogen produziertem NO aber ausreichen, um die Insulin-Sekretion in den Inselzellen nach einer Glukose-Stimulation zu hemmen (Southern et al. 1990, Corbett et al., 1993). Vielmehr ist das von der iNOS der Makrophagen in großen Mengen gebildete NO für die Inselzellen das toxische Agens (Hibbs et al., 1988; Xie und Nathan, 1994).

Da Zink als ein wichtiger Faktor in vielen antioxidativen Enzymen, wie der Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidase, fungiert, kommt es bei intrazellulärem Zinkmangel zu einer Beeinträchtigung der Zellabwehr gegen oxidativen und nitrosativen Stress (Sumovski et al., 1992). Um zu untersuchen, ob der freie Zinkgehalt in den Inselzellen und damit gegebenenfalls auch der Schutz gegen nitrosativen Stress gesteigert werden kann, wurde das Medium durch Zugabe eines  $Zn^{2+}$ -Histidin-Komplexes (Zn-His) zusätzlich mit Zink versetzt. Insgesamt erschienen die mit dem Zn-His-Komplex behandelte Zellen nicht stärker fluoreszierend. Nur einige Zellen zeigten eine stärkere granuläre Fluoreszenz. Auch nach 24-stündiger Inkubation dieser Zellen mit dem NO-Donor DETA/NO zeigte sich insgesamt immer noch eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität, jedoch keine Fluoreszenzunterschiede und auch keine Vitalitätsunterschiede zwischen Zn-His-behandelten und -unbehandelten Proben. Dies verdeutlicht, dass der Gehalt an freien Zink-Ionen in Inselzellen durch

Inkubation mit diesem zusätzlichen Angebot an  $Zn^{2+}$ -Ionen nicht wesentlich gesteigert werden kann.

Da beobachtet wurde, dass Inselzellen nach Vereinzelung in der Erholungsphase und bei Langzeitversuchen über mehrere Tage die Tendenz zur Reassoziaton und zur Bildung von PseudoinseIn zeigen, wurde diese Reassoziatonstendenz nach Inkubation mit dem NO-Donor DETA/NO untersucht.

Hier wurde bei unbehandelten Zellen mit ansteigender Inkubationszeit bis 36 Stunden eine zunehmende Bildung von Zellketten und PseudoinseIn beobachtet. Wurden die Inselzellen nach 12-stündiger Ruhezeit über 24 Stunden mit 0,5 mM DETA/NO inkubiert, beobachtet man im Vergleich hauptsächlich einzeln liegende Zellen und viel weniger 2er- bis 4er-Reassoziatonen und PseudoinseInbildung.

Dies zeigt, dass die Reassoziaton der Inselzellen durch NO gehemmt wird. Das deutet darauf hin, dass NO die Interzellulärkontakte zwischen den Inselzellen stören könnte. Es ist bekannt, dass NO mit Rezeptoren und bestimmten SH-Gruppen-abhängige Transportproteinen der Plasmamembran von Zielzellen reagiert (Lei et al., 1992, Patel et al., 1996). So haben beispielsweise Untersuchungen ergeben, dass NO in Inselzellen reversibel das Plasmamembran-Potential und irreversibel spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle hemmt (Krippeit-Drews et al., 1995).

Da Inselzellen bei Anstieg der Glukosekonzentration im Serum in vivo degranulieren, d.h. das Insulin aus den Granula ins Serum freisetzen, und bekannt ist, dass NO bereits in geringen Mengen die Insulin-Sekretion in Inselzellen hemmen kann (Southern et al., 1990, Corbett et al., 1991), wurde untersucht, ob sich dieser Vorgang unter Zinquinanfärbung auch in vitro beobachten lässt. Nach der Inselzellisolierung wurden die Inselzellen in Medium mit 1 mM Glukose kultiviert. Bei manchen Zellen erfolgte die Zinquinanfärbung vor Glukosezugabe (20 mM), bei anderen nach Glukosezugabe. In beiden Versuchsansätzen waren keine Veränderungen der granulären Fluoreszenz, insbesondere bezüglich Größe, Helligkeit und Anzahl der Granula, im Vergleich zu den Zellen ohne Glukosezugabe zu beobachten. Der physiologische Vorgang der Degranulation der Insulingranula konnte in vitro in diesem Versuch unter diesen



Versuchsbedingungen also nicht beobachtet werden. Daher wurden keine weiteren Versuche hinsichtlich NO-Hemmung der Degranulation gemacht.

Da Zink-Ionen mit den Carboxyl-Gruppen des Insulins in den Sekretionsgranula ionische Bindungen eingehen, Insulin in Form von Kristallen gelagert wird, und da Zinquin freies  $Zn^{2+}$  in den Zellen komplexiert (Zalewski et al., 1993), könnte man vermuten, dass Zinquin durch Komplexierung der freien Zink-Ionen in Inselzellen die Degranulation von Insulin nach Glukosezugabe verhindert. Zink ist ja neben der Synthese und Speicherung auch für die Sekretion von Insulin und damit die Freisetzung von Insulingranula notwendig (Chausmer, 1998).

#### **4.2 Wirkung von NO auf den GSH-Gehalt und auf das mitochondriale Membranpotential**

In der Vergangenheit wurden große Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Zelltypen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von NO gefunden, dabei zeigten sich Pankreas-Inselzellen besonders empfindlich gegenüber NO (Kröncke et al, 1993).

Eines der intrazellulären molekularen Ziele von NO ist GSH, das in praktisch allen Zellen in einer Konzentration von 0,5 bis 10 mM vorkommt und so das wichtigste intrazelluläre Thiol ist. (Meister et al, 1983)

NO kann unter physiologischen aeroben Bedingungen freie SH-Gruppen in Proteinen nitrosylieren (Kröncke, 1998). Der Hauptreaktionspartner von NO in Proteinen ist die Aminosäure Cystein, deren SH-Gruppen mit NO in Gegenwart von  $O_2$  zu S-Nitrosothiolen reagieren (Wink et al., 1994; Kröncke, 2001a).

Glutathion (GSH), das Tripeptid  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin mit einer SH-Gruppe als maßgeblicher funktioneller Gruppe, spielt eine entscheidende Rolle als Antioxidans (Deneke et al, 1989, Meister, 1994). So schützt es Zellen vor Schäden, die von oxidativem Stress verschiedenen Ursprungs (Sies, 1993) oder von nitrosativem Stress verursacht werden (Padgett et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass Erniedrigung des zellulären GSH die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber den toxischen Effekten von NO erhöht (Wink et al, 1994, Walker et al., 1994, Luperchio et al., 1996)

Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion, die von der GSH-Reduktase katalysiert wird, wieder zu GSH reduziert. Das intrazelluläre GSH:GSSG-Verhältnis wird so von der GSH-Reduktase-Aktivität, der

Verfügbarkeit von NADPH und der Fähigkeit zur GSH-Neusynthese über die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS)- und die GSH-Synthetase-Aktivität bestimmt. (Meister et. al., 1983). Im Folgenden untersuchte ich die Wirkung von NO auf den intrazellulären GSH-Gehalt in Inselzellen sowie auch im Zusammenhang mit einer Hemmung der Enzyme des GSH-Redox-Systems.

Die Inselzellen wurden nach nitrosativem Stress mittels NO-Donoren wie SNOC bzw. Spe/NO sowie nach Störung der de-novo GSH-Synthese durch den  $\gamma$ -GCS-Inhibitor BSO bzw. nach Hemmung der GSH-Reduktase durch den GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU untersucht. Diamid, das relativ spezifisch Glutathion zu Glutathiondisulfid oxidiert, wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Zellen wurden mit mBCI, einem Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von intrazellulärem GSH, gefärbt.

Die unbehandelten, mBCI-gefärbten Zellen zeigten insgesamt eine intensiv blaue, relativ homogene Fluoreszenz. Auch waren die Zellkompartimente unterschiedlich stark fluoreszierend. Das Zytoplasma erschien meist mittelstark, die Zellkerne vielfach noch etwas stärker fluoreszierend. Nach längerer Inkubation (12 und 24 h) war bei den unbehandelten Zellen insgesamt eine allmähliche Abnahme der stark fluoreszierenden Zellpopulation zu beobachten ohne eine Abnahme der Zellvitalität, was auf eine Abnahme des GSH-Gehalts alleine aufgrund der Inkubationsbedingungen hindeutete.

Nach Inkubation mit NO-Donoren (SNOC bzw. Spe/NO; 0,25 - 1 mM; 1 - 4 h) war eine deutliche, zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der GSH-abhängigen Fluoreszenzintensität der Zellen zu beobachten. Nach 12-stündiger Inkubation zeigte sich insgesamt eine weitere, jetzt starke Fluoreszenzabnahme, so dass nur eine schwache (0,5 mM SNOC) bis sehr schwache Fluoreszenz (0,25 mM Spe/NO) der Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet wurde, bei unbeeinträchtigter Zellvitalität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nitrosativer Stress allein zu einer deutlichen Erniedrigung des GSH-Gehaltes in Inselzellen führt.

Bei dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU (80  $\mu$ M) zeigte sich nach 2 Stunden eine deutliche, nach 4 Stunden Inkubation eine noch stärkere Abschwächung der mBCI-abhängigen Fluoreszenz und nach 12 Stunden eine nur noch sehr schwache Fluoreszenz ohne Abnahme der Vitalität. Daraufhin wurde die

Konzentration von BCNU (10 - 80  $\mu\text{M}$ ) gesenkt und über 3 Stunden inkubiert. Dabei fand sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz, die keine Abnahme bei 10  $\mu\text{M}$ , eine leichte Abnahme bei 30  $\mu\text{M}$  sowie eine starken Fluoreszenzabschwächung bei 80  $\mu\text{M}$  BCNU bei wiederum unveränderter Zellvitalität zeigte.

Bei dem  $\gamma$ -GCS-Inhibitor BSO (0,5 - 1 mM) zeigte sich erst nach 12- bzw. 21-stündiger Inkubation ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenzintensität, so dass nur noch eine schwache bis sehr schwache blaue mBCI-abhängige Fluoreszenz sichtbar war ohne Vitalitätseinbußen.

Die Verwendung des Mediums mit 10 % FCS bei den Versuchen mit BCNU verhinderte hier die Abnahme der mBCI-abhängigen Fluoreszenz nicht.

Dies bedeutet, dass eine deutliche Erniedrigung des GSH-Gehalts durch Inkubation mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU schneller erfolgt als durch den GSH-Synthese-Inhibitor BSO. Auch stellt eine hohe FCS-Konzentration keinen Schutz vor GSH-Abnahme nach Inkubation mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor BCNU dar.

Bei dem GSH-Oxidans Diamid zeigte sich bereits nach 30-minütiger Inkubation bei 0,1 mM eine sehr stark Abnahme der Fluoreszenzintensität, bei 0,25 mM eine weitere Abnahme und bei 0,5 mM keine mBCI-abhängige Fluoreszenz mehr bei unbeeinträchtigter Vitalität .

In den Versuchen mit höheren Konzentrationen von Diamid (1 und 2 mM) allein oder in Kombination mit BCNU (80  $\mu\text{M}$ ) bzw. BSO (500  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich nach 30 minütiger Inkubation bereits keine Fluoreszenz mehr gekoppelt mit Zelltod (Vitalität von 20 - 30 %). Nach längerer Inkubation (12 h) waren jedoch alle Zellen tot.

Dies bedeutet, dass in Inselzellen Diamid intrazelluläres GSH in kürzester Zeit zu Glutathiondisulfid oxidiert, damit völlig verbraucht und bei höheren Konzentrationen bzw. länger Inkubation auch die Zellvitalität stark beeinträchtigt.

Weitere Versuche folgten mit einer Kombination aus Inhibitor (10 - 80  $\mu\text{M}$  BCNU, 500  $\mu\text{M}$  BSO) und NO-Donor (SNOC bzw. Spe/NO; 0,25 - 0,5 mM), die unterschiedlich lange (0,5 - 24 h) zugegeben wurden. BCNU wurde dabei immer

eine Stunde vor den NO-Donoren zu den Zellen gegeben, um die Enzymhemmung zu gewährleisten.

Die Inselzellen zeigten dabei nach kurzzeitiger (2 - 4 h) Inkubation mit einer Kombination von GSH-Reduktase Inhibitor und NO-Donor eine sehr starke konzentrations- und zeitabhängige GSH-Abnahme mit allmählicher Abnahme der Zellvitalität (Vitalität von 40 - 60%), dabei war die Fluoreszenzabnahme stärker als bei den jeweiligen Einzelsubstanzen. Nach längerer Inkubation (12 - 24 h) sowie auch bei höheren Konzentrationen der NO-Donoren (1 mM) in Kombination mit dem Reduktase-Inhibitor zeigten sich keine Fluoreszenz mehr und noch höhere Vitalitätseinbußen (Vitalität von 30 - 50%). Bei Kombination des  $\gamma$ -GCS-Inhibitors BSO (500  $\mu$ M) und eines NO-Donors über 12 Stunden zeigte sich nur noch eine sehr geringe Restfluoreszenz bei mäßig erniedrigter Vitalität (55 - 65%).

Die Kombination von NO und der Hemmung der Enzymaktivität von  $\gamma$ -GCS oder GSH-Reduktase führten neben einer starken GSH-Abnahme zudem zu einem deutlichen Verlust der Zellvitalität.

Zur Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes durchgeführte biochemischen GSH-Bestimmungen entsprachen den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen und verdeutlichten den Einfluss von nitrosativem Stress, GSH-Enzymhemmung sowie deren Kombination auf den GSH-Gehalt und die Vitalität der Inselzellen. Die gemessenen GSH-Konzentrationen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Probe) zeigten eine allmähliche Abnahme nach GSH-Reduktase-Hemmung (30  $\mu$ M BCNU; 3 h), NO-Exposition (0,25 mM Spe/NO; 2h) und GSH-Reduktase-Hemmung (30  $\mu$ M BCNU; 3 h) + NO-Exposition (0,25 mM Spe/NO; 2h) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Bei der Inkubation mit dem GSH-Oxidans Diamid (0,25 mM; 30 min) zeigte sich auch eine deutliche Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentration.

Berendij et al. untersuchten auch den Einfluss von NO auf den intrazellulären GSH-Gehalt verschiedener Zellen (Berendji et al., 1999). Dabei zeigte sich bei den relativ NO-empfindlichen Maus-Lymphozyten nach kurzzeitiger sowie nach langzeitiger Inkubation mit subtoxischen Konzentrationen von NO-Donoren (SNOC, DETA/NO) ein fast vollständiger Verlust an intrazellulärem GSH. Kurzzeitige NO-Behandlung von P815 Mastozytomzellen, die sehr empfindlich gegenüber einem NO-medierten Zelltod sind, zeigten eine ähnliche Erniedrigung

des GSH-Gehalts nur bei gleichzeitiger spezifischer Hemmung entweder der GSH-Reduktase oder der  $\gamma$ -GCS. Langzeitige NO-Behandlung von P815 Zellen aber zeigte eine signifikante Erniedrigung des GSH-Gehalts, die noch durch die Hemmung der  $\gamma$ -GCS gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde der intrazelluläre GSH-Gehalt von L929 Fibroblasten, die sehr resistent gegenüber NO sind, weder durch kurzzeitige noch durch langzeitige NO-Exposition beeinträchtigt; nur eine zusätzliche Hemmung der  $\gamma$ -GCS, aber nicht der GSH-Reduktase, führte zu einem völligen Verlust an intrazellulärem GSH (Berendji et al., 1999). Diese Resultate zeigten, dass unterschiedliche Zelltypen verschiedene Mechanismen anwenden, um eine ausreichende GSH-Konzentration zu erhalten und somit den nitrosativen Stress zu bewältigen. Die Fähigkeit, diesen kritischen GSH-Gehalt aufrecht zu erhalten, korreliert mit der Empfindlichkeit gegenüber dem NO-induzierten Zelltod.

Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass NO auch in der Lage ist, die mitochondriale Funktion über eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung zu hemmen (Granger et al., 1980; Radons et al., 1994). In der Folge kommt es zur Peroxidation von Lipiden, zur Inaktivierung von eisen-schwefelhaltigen Atmungskettenenzymen, zur Hemmung der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase (White et al., 1996) sowie zum Kalziumausstrom aus den Mitochondrien in das Zytosol durch Beeinflussung von Ionenkanälen (Nishikawa et al., 1996; Richter et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass in Analogie zur Plasma-Membran NO auch reversibel das mitochondriale Membranpotential hemmt und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Mitochondrien beeinträchtigt (Schweizer und Richter, 1994). Zudem ist reduziertes GSH, das im Zytosol synthetisiert und in die Mitochondrien transportiert wird, für Mitochondrien ein essentieller Schutz vor oxidativem Stress. Es fungiert dabei nicht nur als Antioxidans und Radikalfänger, sondern ist auch für die Aktivität mitochondrialer Enzyme wie die Glutathionperoxidase erforderlich, die ROS abbauen. Oxidiertes Glutathiondisulfid (GSSG) kann jedoch nicht wieder aus dem Mitochondrien in das Zytosol transportiert werden und muss dort durch die mitochondriale Glutathion-Reduktase zu GSH regeneriert werden (Jo et al., 2001).

Es wurden Versuche durchgeführt, um das mitochondriale Membranpotential von Inselzellen nach nitrosativem Stress und auch nach Störung des

Glutathionstoffwechsels fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff DIOC<sub>2</sub>(5) eingesetzt, der nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotential anfärbt. Die Inselzellen zeigten eine deutliche Abnahme der mitochondrienabhängigen Fluoreszenz und somit eine Störung der Mitochondrienfunktion nach kurz- bzw. langzeitigem nitrosativem Stress mit subtoxischen Konzentrationen von NO-Donoren (Spe/NO; bis 0,25 mM; 2 h und DETA/NO; bis 0,5 mM; 12 h) sowie eine noch stärkere Fluoreszenzabnahme nach Störung des GSH-Stoffwechsels mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor (80 µM BCNU; 3 h; 13 h) ohne bzw. mit leichten Vitalitätseinbußen.

Die Kombination von nitrosativem Stress (0,25 mM Spe/NO; 2 h) und GSH-Stoffwechselstörung mit BCNU (80 µM, 3h) führte zu einer noch stärkeren Fluoreszenzabnahme als nach Inkubation mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. In den Langzeitversuchen mit Kombination von DETA/NO (0,5 mM; 12 h) und BCNU (80 µM; 13 h) über 12 Stunden führte dies neben einer sehr starken Fluoreszenzabnahme jedoch auch zum deutlichen Vitalitätsverlust (Vitalität: 40%). Dies verdeutlicht, dass die Mitochondrienfunktion durch die alleinige Störung des GSH-Stoffwechsels mit dem GSH-Reduktase-Inhibitor stärker beeinträchtigt wird als durch den nitrosativen Stress mit NO-Donoren. Die Kombination des GSH-Reduktase-Inhibitors und eines NO-Donors führt zu einer noch stärkeren Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion bei erhöhter Zelltoxizität.

Bei Anwendung von 10 % FCS-haltigem Medium in Versuchen, bei denen mit einem NO-Donor (Spe/NO, 2 h; DETA/NO, 8 h) inkubiert wurde, zeigte sich in allen Proben die gleiche intensive mitochondriale Fluoreszenz wie in den Kontrollen. Dies verdeutlicht die Schutzfunktion der hohen FCS-Konzentration gegenüber NO.

Auch nach einer Ruhezeit über Nacht zeigte sich bei unbehandelten Proben eine kräftige mitochondriale Fluoreszenz ohne Abschwächung im Vergleich zum Vortag. Im Vergleich dazu zeigte sich eine Abschwächung der GSH-abhängigen Fluoreszenz der unbehandelten Inselzellen nach einer Inkubation länger als 4 Stunden. Dies deutet darauf hin, dass eine Abnahme der GSH-Konzentration unter normalen Zellkultur-Bedingungen nicht mit einer Abnahme der Mitochondrienfunktion korreliert.

Um Unterschiede der Empfindlichkeit der Mitochondrienfunktion und des GSH-Gehalts der Inselzellen zu verdeutlichen, wurden nun in einem Parallelversuch die Inselzellen mit einem NO-Donor (Spe/NO, 0,25 mM, 2 h), einer geringeren Konzentration des GSH-Reduktase-Inhibitors (BCNU, 30  $\mu$ M, 3 h) oder deren Kombination (GSH-Reduktase-Inhibitor + NO-Donor) inkubiert. Dann wurde mit mBCI oder DIOC<sub>2</sub>(5) und HOECHST 33342, einem Fluoreszenzfarbstoff, der Zellkerne markiert und damit die Zellvitalität dargestellt, angefärbt. Nur lebende Zellen mit großem hellblauem Kern zeigten auch eine intensive mitochondrienabhängige Fluoreszenz.

Hier zeigte sich, dass der GSH-Stoffwechsel durch den NO-Donor (0,25 mM Spe/NO) sowie durch eine geringe Konzentration des Reduktase-Inhibitors (30  $\mu$ M BCNU) gestört wird. Die mitochondriale Fluoreszenz wird jedoch durch geringe Konzentrationen des GSH-Reduktase-Inhibitors (30  $\mu$ M BCNU) nicht beeinträchtigt, bei dem NO-Donor (0,25 mM Spe/NO) kam es jedoch zu einer Fluoreszenzabschwächung und damit Störung der mitochondrialen Funktion.

Die Kombination von NO-Donor und GSH-Reduktase-Inhibitor führte jedoch bei beiden Färbungsansätzen zu einer noch deutlicheren, starken Fluoreszenzabnahme und damit zu einer deutlichen Störung sowohl des GSH-Stoffwechsels als auch der mitochondrialen Funktion mit jetzt leichtem Vitalitätsverlust (65%).

Dieser Versuch verdeutlicht, dass die Mitochondrienfunktion durch eine Störung des GSH-Stoffwechsels mittels einer geringen Konzentration des GSH-Reduktase-Inhibitors nicht beeinträchtigt wird, wohingegen der kurzzeitige nitrosative Stress zu einer deutlichen Störung führt. Der GSH-Gehalt wurde hingegen durch die geringe Konzentration des GSH-Reduktase-Inhibitors und den kurzzeitigen nitrosativen Stress gleich stark beeinträchtigt.

#### **4.3 Synopse und Ausblick: weitere Einflüsse von NO beim Diabetes mellitus Typ 1 und Schutzmechanismen gegen NO**

Neben der Störung der Zinkhomöostase, des Glutathionstoffwechsels und der mitochondrialen Funktion durch NO konnte gezeigt werden, dass hohe NO-Konzentrationen in der Lage sind, DNA-Schäden zu verursachen (Fehsel et al., 1993). Diese können zum einen Betazellen so in ihrer Funktion einschränken, dass es zu einer verminderten Insulinsyntheseleistung kommt (Heitmeier et al., 1997), zum anderen aber auch den Untergang von humanen Inselzellen bewirken (Eizirik et al., 1996).

Somit kommt der iNOS aufgrund der hohen NO-Freisetzung in Bezug auf den immunvermittelten Betazelluntergang beim Typ 1 Diabetes, zumindest im Tiermodell, die wichtigste Rolle der drei Isoenzyme zu (Kolb und Kolb-Bachofen, 1992; Corbett und McDaniel, 1992).

Bei den ersten infiltrierenden Zellen, die bei der Insulitis in Tiermodellen des Typ 1 Diabetes nachweisbar sind, handelt es sich um aktivierte Makrophagen (Hananberg et al., 1989; Lee et al., 1988). Es ist daher davon auszugehen, dass das für die initiale Schädigung von Betazellen verantwortliche NO von diesen Makrophagen produziert wird, die im übrigen auch weitere, betazellschädigende Substanzen wie IL-1 $\beta$  (Mandrup-Poulsen et al., 1986 und 1990; Pukel et al., 1988), TNF- $\alpha$  (Rothe et al., 1990) oder ROS synthetisieren, die ebenfalls mit der Betazellzerstörung in Verbindung gebracht werden (Burkart et al., 1992). So konnte in Gewebläsionen von Inseln in Diabetes-suszeptiblen Ratten in der prädiabetischen Phase eine erhöhte Expression der iNOS nachgewiesen werden (Kleemann et al., 1993).

Auch Endothelzellen von Kapillargefäßen aus Pankreasinseln sind in der Lage, nach Behandlung mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und  $\gamma$ -IFN große Mengen an NO zu produzieren und damit Inselzellen zu schädigen (Steiner et al., 1997), so dass das hier produzierte NO, neben dem von Makrophagen und Betazellen produzierten NO, eine Rolle bei frühen Stadien des Typ 1 Diabetes spielen könnte. Das eine Glukoseabhängigkeit bei der NO-Produktion von Endothelzellen besteht, konnten Suschek et al. anhand von aus Kapillaren von Ratteninseln isolierten Endothelzellen zeigen (Suschek et al., 1994).



Während der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus werden Insulinproduzierende Betazellen durch oxidativen und nitrosativen Stress zerstört (Eizirik et al., 1996, Suarez-Pinzon et al., 1997, Corbett & McDaniel 1992, Corbett et al., 1992, Delaney et al., 1997). Betazellen sind sehr empfindlich gegenüber zytotoxischem Stress, da sie nur sehr wenige antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase exprimieren (Grankvist et al., 1981, Lenzen et al., 1996, Tiedge et al., 1997). Bast et al. zeigten, dass Betazellen ein weiteres antioxidatives System, die Peroxiredoxine I und II, die zu den Thioredoxin-abhängigen Peroxidreduktasen gehören, besitzen, die in Pankreasinseln der Maus durch oxidativen wie auch nitrosativen Stress induziert werden (Bast et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass das Thioredoxin-abhängige antioxidative System die Zerstörung von Betazellen verhindern kann (Hotta et al. 1998). So stellen Peroxiredoxine, die bereits auch in vielen anderen Zelltypen gefunden wurden, wichtige antioxidative Proteine der Betazellen dar, die Teil der zellulären Antwort auf oxidativen und nitrosativen Stress sind (Bast et al., 2002).

Die Wichtigkeit von NO im Entstehungsprozeß des Typ 1 Diabetes wird dadurch untermauert, daß es in Tiermodellen gelang, durch Inhibitoren der NO-Synthase wie N-Methyl-L-Arginin (L-NMA) den Krankheitsbeginn zu verzögern (Wu, 1995) oder die Hyperglykämie bzw. das Ausmaß der Insulinitis zu reduzieren (Lukic et al., 1991). Auch die orale Gabe von N-Nitro-L-Arginin Methylester erbrachte ähnliche Ergebnisse (Kolb et al., 1991; Lindsay et al., 1995; Papaccio et al., 1995). Eine Verhinderung der Erkrankung mit Manifestation des Typ 1 Diabetes konnte hierdurch jedoch nicht erzielt werden.

Die NO-medierte Zerstörung von Ratten- und Maus-Langerhansinseln und sein Effekt auf die Insulin-Sekretion lassen auch auf den Einfluss von NO beim humanen Diabetes schließen (Kröncke et al., 1998). Mögliche Strategien für eine therapeutische Intervention gegen die NO-medierte Toxizität in der Inselentzündung (Zamora et al. 2000) könnte die Gabe eines natürlichen IL-12-Antagonisten sein, der das Voranschreiten der Inselentzündung und die begleitende Hochregulation der iNOS unterdrückt (Rothe & Kolb, 1999), oder auch die Überexpression des anti-apoptotischen Gens A20, das die Zytokin-induzierte

NO-Produktion aufhebt und humane und Ratten-Inselzellen vor Apoptose schützt (Grey et al., 1999). Jedoch ist noch nicht bekannt, ob die Hemmung der humanen iNOS die Zerstörung von über 90 % der pankreatischen Inseln, wie sie beim Diabetes Typ 1 gefunden wird, verringert (Zamora et al. 2000).

## 5. Literaturverzeichnis

**Akerboom TP, Sies H:** Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.** **1981**; 77: 373-82

**Anderson ME:** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem. Biol. Interact** **1998** Apr 24; 111-112:1-14

**Andrews GK, Kage K, Palmiter-Thomas P, Sarras MP:** Metal ions induce expression of metallothionein in pancreatic exocrine and endocrine cells. **Pancreas** **1990**; 5: 548-554

**Anggard E:** Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. **Lancet** **1994**; 343: 1199-1206

**Bast A, Wolf G, Oberbäumer I, Walther R:** Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. **Diabetologia** **2002**; 45:867-76

**Becherel PA, Le Goff L, Ktorza S, Chosidow O, Frances C, Issaly F, Mencia-Huerta JM, Debre P, Mossalayi MD, Arock M:** CD23-mediated nitric oxide synthase pathway induction in human keratinocytes is inhibited by retinoic acid derivatives. **J. Invest. Dermatol.** **1996**; 106(6):1182-1186

**Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F:** A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. **Cytometry** **1994** Sep 1; 17(1):59-65

**Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V, Kroncke KD:** Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. **FEBS Lett.** **1997**; 405: 37-41

**Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Kröncke KD:** Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. **Free Radic. Biol. Med.** **1999**; 27: 773-80

**Bofill R, Capdevila M, Cols N, Atrian S, Gonzalez-Duarte P:** Zinc(II) is required for the in vivo and in vitro folding of mouse copper metallothionein in two domains. **J.Biol.Inorg.Chem.** **2001**; 6: 405-417

**Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchan S, Land JM, Clark JB, Heales SJR:** Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. **J. Neurochem.** **1997**; 68: 2227-2240

**Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D:** Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet** **1974**; 2 (7892): 1279-1283

**Bredt DS, Snyder SH:** Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **1990**; 87: 682-685

**Briviba K, Klotz LO, Sies H:** Defenses against peroxynitrite. **Methods Enzymol.** **1999**; 301: 301-311

**Burkart V, Koike T, Brenner HH, Kolb H:** Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islets cells in vitro. **Diabetologia** **1992**; 35:1028-1034

**Burkart V:** Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in the pathogenesis of pancreatic islet cell death and type 1 diabetes. Cell death. The role of PARP / edited by Csaba Szabo. **Pharmacology and toxicology** **2000**; 103-129

**Cai L, Klein JB, Kang YJ:** Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. **Journal of Biological Chemistry** **2000**; 275: 38957-38960

**Cao J, Cousins RJ:** Metallothionein mRNA in monocytes and peripheral blood mononuclear cells and in cells from dried blood spots increases after zinc supplementation of men. **Journal of Nutrition** **2000**; 130: 2180-2187

**Caselli A, Camici G, Manao G, Moneti G, Pazzagli L, Cappugi G, Ramponi G:** Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. **Journal of Biological Chemistry** **1994**; 269: 24878-24882

**Coyle P, Zalewski PD, Philcox JC, Forbes IJ, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I, Rofe AM:** Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. **Biochem. J.** **1994**; 303: 781-786

**Chausmer AB :** Zinc, insulin and diabetes. **J. Am. Coll. Nutr.** **1998**; 17: 109-115

**Coblentz A, Wolf, K:** The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiol.Rev.** **1994**; 14: 303-308

**Coleman JE :** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. **Annu.Rev.Biochem.** **1992**; 61: 897-946

**Corbett JA, Lancaster JR Jr, Sweetland MA, McDaniel ML:** Interleukin-1 beta-induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans. Role of nitric oxide in interleukin-1 beta-induced inhibition of insulin secretion. **J Biol Chem.** **1991** Nov 15;266 (32): 21351-4

**Corbett JA, McDaniel ML:** Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$ -cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. **Diabetes** **1992**; 41:897-903

**Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, Wolf BA, Sweetland MA, Lancaster JR, McDaniel ML:** Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1 beta in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction. **Biochem J.** **1992**; 287: 229-235

**Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster Jr. JR, McDaniel ML:** Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **1993**; 90: 1731-1735

**Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM:** Metallothionein: the multipurpose protein. **Cell Mol.Life Sci.** **2002**; 59: 627-647

**De SK, McMaster MT, Andrews GK:** Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. **Journal of Biological Chemistry** **1990**; 265: 15267-15274

**De Meyts P:** Insulin and its receptor: Structure, function and evolution. **Bioessays**, **2004** Dec; 26 (12):1351-62

**Deckert T, Poulsen JE, Larsen M:** Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirtyone. Factors influencing the prognosis. **Diabetologia** **1978**; 14: 371-377

**Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL:** Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. **Endocrinology** **1997**; 138: 2610-2614

**Deneke SM, Fanburg BL:** Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.** **1989**; 257: L163–L173

**Drago RS, Paulik FE:** The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. **J. Am. Chem.soc.****1960**; 82:96-98

**Eizirik DL, Flodström M, Karlsten AE, Welsh N:** The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. **Diabetologia** **1996**; 39: 875-890

**Eizirik DL, Delaney CA, Green MH, Cunningham JM, Thorpe JR, Pipeleers DG, Hellerstrom C, Green IC:** Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. **Mol. Cell. Endocrinol.****1996**; 118: 71-83

**Eizirik DL, Pavlovic D:** Is there a role for nitric oxide in  $\beta$  cell dysfunction and Damage in IDDM? **Diabetes Metab. Rev.****1997**; 13: 293-307

**Feelisch M:** The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** **1991**;17 (Suppl.3): S25-S33

**Fehsel K, Jalowy A, Qi S, Burkart V, Hartmann B, Kolb H:** Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. **Diabetes** **1993**; 42: 496-500

**Fehsel K, Kröncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Bachofen V:** Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. **J. Immunol.** **1995**; **155**:2858–2865

**Field L, Dilts RV, Ravichandran R, Lenhert PG, Carnahan GE:** An unusually stable thionitrite from N-Acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(Acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc.; Chem.Comm.**,**1978**: 249-250

**Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHW, Heller M, Murad F:** Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991**; 88: 1788-1792

**Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL :** The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **Journal of Nutrition 2000**; 130: 1399S-1406S

**Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U:** Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. **J. Biol. Chem. 1993**; 268: 27180-27185

**Gow A, Ischiropoulos H :** NO running on MT: regulation of zinc homeostasis by interaction of nitric oxide with metallothionein. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol. 2002**; 282: L183-L184

**Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT:** Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **J. Clin. Invest. 1990**; 85: 264-273

**Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB:** CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. **Biochem J 1981**; 199: 393-398

**Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C:** A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. **J Exp. Med. 1999**; 190: 1135-1146

**Griffith OW:** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic Biol Med. 1999** Nov; 27(9-10): 922-35

**Hamer DH:** Metallothionein. **Annu. Rev. Biochem. 1986**; 55, 913-951

**Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H:** Macrophag infiltration precedes and is prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. **Diabetologia 1989**; 32: 126-134

**Haase H, Beyersmann D:** Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. **Biometals. 1999** Sep; 12 (3): 247-54

**Heitmeier MR, Scarim AL, Corbett JA:** Interferon-gamma increases the sensitivity of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. **J. Biol. Chem. 1997**; 272: 13697-13704

**Hendriks W:** Neuronal nitric oxide synthase contains a discs-large homologous region (DHR) sequence motif. **Biochem. J. 1995**; 305:687-688

**Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A:** EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. **FASEB J. 1993**; 7: 1124-1134.

**Herold, G. 2001. Innere Medizin. Gerd Herold (Hrsg.), Köln.**

**Hevel JM, White KA, Marletta MA:** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase as a flavoprotein. **J. Biol. Chem.** **1991**; 266: 22789-91

**Hibbs JB Jr., Taintor RR, Vavrin Z:** Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science** **1987**; 235, 473-476

**Hibbs JB Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM:** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **1988**; 157, 87-94.

**Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J:** Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. **J Exp Med** **1998**; 188:1445-1451

**Hrabie J A, Klose JR, Wink DA, Keefer LK:** New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. **J. Org. Chem.** **1993**; 58, 1472-1476

**Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, Huh TL:** Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** **2001**; 276(19): 16168-76

**Kagi JH:** Overview of metallothionein. **Methods Enzymol.** **1991**; 205: 613-626

**Kallmann B, Burkhart V, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V, Kolb H:** Toxicity of chemically generated nitric oxide towards pancreatic islet cells can be prevented by nicotinamide. **Life Sciences** **1992**; 51: 671-678

**Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC:** Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols - a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). **Anal. Biochem.** **1996**; 241: 75-81

**Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH:** Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. **Anal. Biochem.** **2000** Nov 1; 286(1): 35-7

**Karin M, Imbra RJ, Heguy A, Wong G:** Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. **Mol. Cell Biol.** **1985**; 5, 2866-2869

**Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W:** Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. **Genomics** **1992**; 14(3): 802-804

**Kleemann R, Rothe H, Kolb-Bachofen V, Xie QW, Nathan C, Martin S, Kolb H:** Transcription and Translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats. **FEBS Lett.** **1993**; 328(1-2): 9-12.

**Klug A, Schwabe JW:** Protein motifs 5. Zinc fingers. **FASEB J.** **1995**; 9: 597-604.

**Knowles RG, Moncada S:** Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.** **1994**; 298: 249-258

**Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS:** Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature** **1994**; 372:546-548

**Kolb H** 1991. Diabetes. In: D. Gemsa, J.R. Kalden, K. Resch (Hrsg.): **Immunologie** **1991**: 503

**Kolb H, Kiesel U, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V:** Suppression of low dose streptozotocin-induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor. **Life Sci.****1991**; 49(25): PL213-7.

**Kolb H, Kolb-Bachofen V:** Type 1 (Insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. **Diabetologia** **1992**; 35: 796-797

**Kolb H 1993:** Ursachen und Mechanismus der entzündlich bedingten Inselzellschädigung. In: Pathogenese des Diabetes mellitus und moderne Aspekte der Diagnostik. B. Porstmann. **Urban & Vogel, München 1993**: 22-25

**Kolb H:** Diabetes Typ I. Immunologische Aspekte. **Deutsche Apotheker Zeitung** **1996**; 5: 329-332

**Kolb H, Kolb-Bachofen V:** Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol.Today** **1992**; 13, 157-160

**Krippeit-Drews P, Kröncke KD, Welker S, Zempel G, Roenfeldt M, Ammon HPT, Lang F, Drews G:** The effect of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells. **Endocrinology** **1995**; 136: 5363-5369

**Kröncke KD (1998):** Über die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes. (Habilitationsschrift)

**Kröncke KD (2001a):** Cystein-Zn<sup>2+</sup> complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. **FASEB J.** **2001** Nov; 15(13):2503-7

**Kröncke KD (2001b)** Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. **Antioxid.Redox.Signal.** **2001**; 3: 565-575.

**Kröncke KD, Brenner HH, Rodriguez ML, Etkorn K, Noack EA, Kolb H, Kolb-Bachofen V:** Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. **Biochim. Biophys. Acta** **1993**; 1182: 221-229

**Kröncke KD, Carlberg C:** Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. **FASEB J.** **2000**; **14**: 166-173

**Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V:** Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. **Biol.Chem.Hoppe Seyler** **1995**; **376**: 327-343



**Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V:** Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when, and where? **Nitric.Oxide.** **1997;** 1: 107-120

**Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V:** Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin.Exp.Immunol.** **1998;** 113: 147-156

**Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V:** Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **1994;** 200: 1105-1110

**Kröncke KD, Klotz LO, Suschek CV, Sies H.:** Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO. **Journal of Biological Chemistry** **2002;** 277: 13294-13301

**Kröncke KD, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H:** Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **1991;** 175: 752-758

**Kröncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V:** Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. **Antioxid.Redox.Signal.****2000;** 2: 585-605

**Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schäfer UW, Wernet P, Bertrams J, Grosse Wilde H, Griess FA, Kolb H:** Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. **Lancet** **1993;** 341: 1243-1244

**Lancaster J:** A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide** **1997;** 1:18-30

**Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP :** Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. **Biochem. J.** **1996;** 314 (Pt 1):109-113

**Laval F, Wink DA :** Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Carcinogenesis** **1994;** 15: 443-447

**Lee KU, Amano K, Yoon JW:** Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. **Diabetes** **1988;** 37: 989-991

**Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartmann J, Sucher NJ, Lipton SA:** Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron** **1992;** 8: 1087-1099

**Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M:** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radic Biol Med** **1996;** 20: 463-466

**Liew F, Cox FEG:** Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today** **1991;** 12: A17-A21.

**Lindsay RM, Smith W, Rossiter SP, McIntyre MA, Williams BC, Baird JD:** N omega-nitro-L-arginine methyl ester reduces the incidence of IDDM in BB/E rats. **Diabetes** 1995; 44: 365-368

**Liu S, Kawai K, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Fabisiak JP, Quinn PJ, Pitt BR, Kagan VE:** Nitric oxide-dependent pro-oxidant and pro-apoptotic effect of metallothioneins in HL-60 cells challenged with cupric nitrilotriacetate. **Biochem.J.** 2001; 354: 397-406

**Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH:** Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann.Intern.Med.** 1994; 120: 227-237

**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951 Nov;193(1):265-75

**Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Ostojic N, Chan WL, Liew FY 1991:** Inhibition of nitric oxid generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**1991; 178: 913-920

**Luperchio S, Tamir S, Tannenbaum SR :** NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. **Free Radic. Biol. Med.**1996; 21: 513-519

**MacDonald RS:** The role of zinc in growth and cell proliferation. **Journal of Nutrition** 2000; 130:1500S-1508S

**Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH:** Affinity-purified human interleukin I is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. **Diabetologia.** 1986 Jan; 29(1): 63-7

**Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Pociot F, Johanesen J, Nerup J:** Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 1990; 164: 169-193

**Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS:** Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry** 1988; 27: 8706-8711

**Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, al. e:** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **J. Biol. Chem.** 1993; 268: 17478-17488

**Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO:** Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. **N. Engl. J. Med.** 2001; 345: 1036-1040

**Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD :** Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 1994; 91: 584-588.

**Mayer B, John M, Böhme E:** Purification of a calcium/ calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. **FEBS-Letters** **1990**; 277:215-219

**McCormick CC, Menard MP, Cousins RJ:** Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. **Am.J.Physiol.** **1981**; 240: E414-E421.

**Meister A, Anderson ME:** Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.** **1983**; 52:711–760

**Meister A:** Glutathione, ascorbate, and cellular protection. **Cancer Res.** **1994**; 54 (Suppl.):1969s–1975s

**Michel T, Feron O:** Nitric oxide synthases: which, where, how and why. **J. Clin. Invest.****1997**; 100: 2146-2152

**Mirna A, Hofmann K:** Über den Verbleib von Nitrit in Fleischwaren. I. Umsetzung von Nitrit mit Sulfhydryl-Verbindungen. **Fleischwirtschaft** **1969**; 49:1361-1366

**Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA :** Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. **Chem.Res.Toxicol.** **1996**; 9: 326-332

**Mitchell P:** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature** **1961**; 191: 144-148

**Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, DiSilvio M, Billiar TR, Lapetina EG:** Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. **J. Biol. Chem.** **1992**; 267: 24929-32

**Moncada S, Palmer RMJ (1990):** The L-arginine-nitric oxide pathway in the vessel wall. In: Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system. Hrsg.: S. Moncada, E.A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, **1990**: 19-33

**Moncada S, Higgs EA:** The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** **1993**; 329: 2002-2012

**Nathan C:** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** **1992**; 6: 3051-3064

**Nathan C, Xie QW:** Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell** **1994**; 78: 915-918

**Nathan C, Xie QW:** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.** **1994**; 269: 13725-8.

**Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J:** The HLA-IDDm association: Implications for etiology and pathogenesis of IDDm. **Diab. Metab. Rev.** **1987**; 3: 779-802

**Nikulina MA, Andersen HU, Karlsen AE, Darville MI, Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T:** Glutathione depletion inhibits IL-1 beta-stimulated nitric oxide

production by reducing inducible nitric synthase gene expression. **Cytokine**. 2000 Sep; 12(9) : 1391-4

**Nishikawa M, Sato EF, Utsumi K, Inoue M**: Oxygendependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. **Cancer Res**. 1996; 56: 4535-4540

**Padgett CM, Whorton AR**: Regulation of cellular thiol redox status by nitric oxide. **Cell Biochem. Biophys**. 1997; 27:157-177

**Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL**: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science** 1983; 222: 1337-1339

**Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S**: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** 1988; 333: 664-666

**Palmiter RD** : The elusive function of metallothioneins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 1998; 95: 8428-8430

**Papaccio G, Esposito V, Latronico MVG, Pisanti FA**: Administration of nitric oxide synthase does not suppress low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Int. J. Pancreatol**. 1995; 17: 63-68

**Patel JM, Abeles AJ, Block ER**: Nitric oxide exposure and sulfhydryl modulation alter L-arginine transport in cultured pulmonary endothelial cells. **Free Rad. Biol. Med**. 1996; 20: 629-637

**Pearce LL, Gandley RE, Han W, Wasserloos K, Stitt M, Kanai AJ, McLaughlin MK, Pitt BR, Levitan ES (2000a)**: Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 2000; 97: 477-482

**Pearce LL, Wasserloos K, St Croix CM, Gandley R, Levitan ES, Pitt BR (2000b)**: Metallothionein, nitric oxide and zinc homeostasis in vascular endothelial cells. **Journal of Nutrition** 2000; 130: 1467S-1470S

**Pollock J, Klinghofer V, Förstermann U, Murad F**: Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. **FEBS Lett**. 1992; 309: 402-404

**Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HW, Nakane M, Murad F**: Purification and characterization of particulate endothelium-derived-relaxing-factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 1991; 88:10480-4

**Powell SR**: The antioxidant properties of zinc. **Journal of Nutrition** 2000; 130: 1447S-1454S

**Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A**: Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1. **Diabetes** 1988; 37: 133-136.

**Radons J, Fengler E, Bürkle A, Heller B, Burkart V, Kolb H:** Oxygen radicals induce ADP-ribose polymerization and NAD-depletion in isolated pancreatic islets. **Diabetologia** 1993; 36 (Suppl1): 1270-1277

**Radons J, Heller B, Bürkle A, Hartmann B, Rodriguez M-L, Kröncke K-D, Burkart V, Kolb H:** Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADPribose) polymerase activation and concomitant NAD<sup>+</sup> depletion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994; 199: 1270-1277

**Richards MP :** Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. **Journal of Nutrition** 1989; 119: 1062-1070

**Richards MP, Cousins RJ:** Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. **Biochem.Biophys.Res.Comm.** 1975; 64: 1215-1223

**Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, Schweizer M, Schlegel J:** Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994; 205: 1143-1150

**Rossini AA, Greiner DL, Friedmann HP, Mordes JP:** Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diab. Rev.** 1993; 1: 43-75

**Roth HP and Kirchgessner M:** Zinc and insulin metabolism. **Biol. Trace Elem. Res.** 1981; 3: 13-32

**Rothe H, Fehsel K, Kolb H:** Tumor necrosis factor alpha production is upregulated in diabetes prone BB rat. **Diabetologia** 1990; 33: 573-575

**Rothe H, Kolb H:** Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islet inflammation. **J. Mol. Med.** 1999; 77: 40-44

**Schmidt HHW, Walter U:** NO at work. **Cell** 1994;78: 919-925

**Schmidt K, Desch W, Klatt P, Kukovetz WR, Mayer B:** Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentrations in aerobic solutions. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 1997; 355: 457-462

**Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr., Pitt BR:** Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 1995; 92: 4452-4456

**Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich J.C, Reynolds I, Kagan VE, Tyurin V, Kim YM, Watkins SC, Pitt BR:** Cytoplasmic metallothionein overexpression protects NIH 3T3 cells from tert-butyl hydroperoxide toxicity. **Journal of Biological Chemistry** 1994; 269: 15238-15243.

**Schweizer M, Richter C:** Nitric oxide potently and reversibly deengizes mitochondria at low oxygen tension. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994; 204:169-175

**Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA:** Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct antibody patterns in patients with acute onset and slow progressive disease. **Diabetologia** 1998; 8: 891-897

**Sen CK, Packer L :** Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.** 1996; 10: 709-720

**Sesti G:** Pathophysiology of insulin resistance. **Best Pract Res Endocrinol Metab.** 2006 Dec; 20(4):665-79

**Sibley RK, Sutherland D, Goetz FC, Michael AF 1985:** Recurrent diabetes mellitus in the pancreatic iso- and allograft period. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. **Lab. Invest.**1985; 53: 132-144

**Sies H:** Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** 1993; 215: 213–219

**Sies H:** Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic.Biol.Med.** 1999; 27: 916-921

**Southern C, Schulster D, Green IC:** Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. **FEBS Lett.** 1990; 276: 42-44

**Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J:** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science** 1992; 258: 1898-1902

**St Croix CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR :** Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol** 2002; 282: L185-L192

**Steiner L, Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V:** Endothelial cells as cytotoxic effector cells: cytokine activated rat islet endothelial cells lyse syngenic islets via nitric oxide. **Diabetologia** 1997; 40: 150-155

**Stiefelhagen P:** Präventionsstrategien in der Diabetologie. **Der Internist** 1998; 11: 1192-1195

**Suarez-Pinzon WL, Szabo C, Rabinovitch A:** Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet betacells. **Diabetes** 1997; 46:907-911

**Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF:** FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. **Biochem.Biophys.Res.Comm.** 1990; 168: 558-565.

**Stuehr DJ, Nathan CF:** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J.Exp.Med.** **1989**; 169: 1543-1555

**Suhy DA, Simon KD, Linzer DI, O'Halloran TV :** Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. **Journal of Biological Chemistry** **1999**; 274: 9183-9192

**Sullivan VK, Burnett FR, Cousins RJ:** Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. **Journal of Nutrition** **1998**; 128: 707-713

**Sumovski W, Baquerizo H, Rabinovich A.** Oxygen free radical scavenger protect rat islet cells from damage by Cytokines. **Diabetologica** **1992**; 32: 792-796

**Suschek C, Fehsel K, Kröncke KD, Sommer A, Kolb-Bachofen V:** Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophagelike nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration. **Am. J. Pathol.** **1994**; 145: 685-695

**Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S:** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes** **1997**; 46: 17333-1742

**Tietze F:** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem.** **1969** Mar; 27 (3): 502-22

**Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H:** Protection by superoxide dismutase, catalase and poly-(ADP-ribose) synthase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. **J. Biol. Chem.****1982**; 257: 6084-6088

**Von Meyenburg H:** Über „Insulitis“ bei Diabetes. **Schweiz. Med. Wochenschr.** **1940**; 21: 554 – 557

**Vasak M, Hasler DW:** Metallothioneins: new functional and structural insights. **Curr.Opin.Chem.Biol.****2000**; 4: 177-183

**Walker MW, Kinter MT, Roberts RJ, Spitz DR:** Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection. **Pediatr. Res.** **1994**; 37:41–49

**Welsh, W.J.(a), Sandler S:** Interleukin-1 $\beta$  induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **1992**; 182: 333-340.

**White CR, Darley UV, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA:** Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **1996**; 93: 8745-8749

**Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer JK:** DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science** **1991**; 254: 1001-1003

**Wink DA, Mitchell JB:** Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic.Biol.Med.** **1998**; 25: 434-456

**Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook JA, Krishna MC:** Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. **Chem.Res.Toxicol.** **1994**; 7: 519-525

**Wood KS, Buga GM, Byrns RE, Ignarro LJ:** Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** **1990**; 170: 80-88

**Wu G:** Nitric oxide synthesis and the effect of aminoguanidine and NG-monomethyl-L-arginine on the onset of diabetes in the spontaneously diabetic BB rat. **Diabetes** **1995**; 44: 360-364

**Xie QW, Nathan C:** The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **J. Leukoc. Biol.** **1994**; 56: 576-582

**Yaguzhinsky LS, Yurkov VI, Krasinskaya IP:** On the localized coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria. **Biochim Biophys Acta.** **2006**; 1757(5-6): 408-414

**Zalewski PD, Forbes IJ, Betts WH:** Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). **Biochem.J.** **1993**; 296 (Pt 2): 403-408

**Zalewski PD, Milliard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavorinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF und Mahadevan IJ:** Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic cells using a specific fluorescent probe for zinc. **Histochem. Cytochem.** **1994**; 42: 877-884

**Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR:** Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Mol.Med.** **2000**; 6: 347-373

**Zangger K, Oz G, Haslinger E, Kunert O, Armitage IM :** Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. **FASEB J.** **2001**; 15: 1303-1305



## 6. Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung während meiner Zeit im Labor und im Rahmen der Korrektur der Arbeit. Ihre konstruktive Kritik und wertvollen Anregungen haben wesentlich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke für seine kompetente Betreuung der Arbeit, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und seine Hilfsbereitschaft in allen Bereichen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Priv.- Doz. Dr. Christoph Suschek und auch Frau Dr. Karin Fehsel für ihre hilfreichen, kreativen Ratschläge und Informationen und ihre freundliche Bereitschaft, mir in fachlichen Fragen zur Seite zu stehen.

Ferner danke ich Herrn Dr. Klaus L. Meyer für die Unterstützung bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Frau Ulla Lammersen danke ich für die Hilfe bei der Erlangung labortechnischer Fähigkeiten, insbesondere für ihre Anregungen zum Umgang mit der Zellkultur.

Frau Marija Lenzen sei gedankt für ihre freundliche Einarbeitung in immunzytochemische Methoden.

Frau Martha Turken möchte ich für die professionelle Erstellung der zahlreichen Fotoarbeiten danken.

Frau Dr. med. Roswitha Voss danke ich für ihre Freundschaft während des ganzen Studiums bis heute, insbesondere auch während dieses Forschungssemesters und für unsere anregenden Gespräche.

Schließlich geht mein tiefer Dank und die Widmung dieser Arbeit an meine Familie, die mich in jeder Beziehung unermüdlich unterstützt hat.

## 7. Lebenslauf

**Name, Vorname:** Tartler, Ulrike

**Geburtsdatum/-ort:** 03.11.1974 in Klausenburg

**Schule:** 1981 – 1985: St. Remigius-Grundschule, Bergheim/Erft  
1985 – 1988: Humanistisches Gymnasium, Viersen  
1988 – 1994: Gertrud-Bäumer-Gymnasium, Remscheid  
Juni 1994: Abitur, Durchschnitt: 1,3

**Studium:** 10/1994 – 11/2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
November 2001: 3. Staatsexamen (Note 2)

**Promotionsarbeit:** 09/1997 – 04/1998: Forschungsgruppe Immunbiologie im Institut für Molekulare Medizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen

**Publikation:** Nitric oxide interferes with islet cell zinc homeostasis; Ulrike Tartler, Klaus-D. Kröncke, Klaus L. Meyer, Christoph-V. Suschek and Victoria Kolb-Bachofen; NITRIC OXIDE: Biol. Chem. Vol. 4, No. 6, pp. 609 - 614 (2000)

**Praktisches Jahr:** 10/2000 – 02/2001 PJ-Tertial: Dermatologie bei Prof. Dr. Dr. T. Ruzicka in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

02/2001 – 05/2001 PJ-Tertial: Chirurgie in Concord Hospital, University of Sydney, Faculty of Medicine, Australia

05/2001 – 09/2001 PJ-Tertial: Innere Medizin bei Prof. Dr. R. Haas in der MNR-Klinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### **Beruflicher Werdegang:**

02.01.2002 – 01.07.2003 Arzt im Praktikum und im Anschluß vom 02.07.2003 – 31.03.2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

01.04.2006 – 31.12.2006 Weiterbildungsassistentenärztin (Allergologie) in der Praxis von Herrn PD Dr. Lutz, Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Allergologie,

Umweltmedizin, Phlebologie und Naturheilverfahren, Wesseling sowie in der Praxis von Frau Dr. Stöckel, Fachärztin für Dermatologie und Venerologie, Allergologie und Phlebologie, Bonn

01.01.2007 – 31.12.2007 Assistenzärztin in der Gemeinschaftspraxis von Herrn Dr. Köllner und Herrn Dr. Feistkorn, Fachärzte für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Allergologie, Phlebologie, Umweltmedizin, Duisburg

seit 01.01.2008 Assistenzärztin in der Praxis von Herrn Dr. Bielicky, Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Allergologie, Umweltmedizin, Düsseldorf

**23.08.2006** Anerkennung als Fachärztin für Haut- und Geschlechtskrankheiten

**19.04.2007** Anerkennung der Zusatzbezeichnung Allergologie

## 8. Zusammenfassung

NO wird als wichtiger toxischer Mediator von infiltrierenden Makrophagen freigesetzt und spielt eine wesentliche Rolle bei der Inselzellschädigung in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus im Tiermodell. In dieser Arbeit wurden fluoreszenzmikroskopisch und biochemisch intrazelluläre Effekte von NO auf isolierte Pankreas-Inselzellen der Ratte untersucht, insbesondere der Einfluss von NO auf die Zink-Homöostase, die für die Insulin-Synthese, -Speicherung und -Sekretion essentiell ist, sowie auf das Antioxidans GSH und die Mitochondrienfunktion.

Freies intrazelluläres Zink wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zinquin dargestellt. Die Behandlung mit exogenem nitrosativen Stress durch den NO-Donor DETA/NO zeigte erst nach 24-stündiger Inkubation in den Inselzellen fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch eine signifikante Abnahme des Zinkgehaltes. Bei kürzeren Inkubationen oder anderen NO-Donoren (Spe/NO, SNOC) ergaben sich keine Veränderungen des Zinkgehalts. Dies deutet auf eine NO-medierte Störung der Komplexierung und Speicherung von  $Zn^{2+}$  mit anschließendem Verlust der Zinkionen aus den Inselzellen hin. Dies scheint inselzellspezifisch zu sein, da in anderen Zellarten NO zu einem Anstieg des intrazytoplasmatischen und intranuklearen  $Zn^{2+}$  führt.

Die Aktivierung der Inselzellen über 24 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen ( $IL1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN) zeigte eine 2- bis 4-fache Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration, jedoch führte diese nicht zu einer fluoreszenzmikroskopisch fassbaren Abnahme des Zinkgehalts. Dies deutet darauf hin, dass Inselzellen sich durch endogen synthetisiertes NO nicht selbst schädigen.

Der GSH-Gehalt in Inselzellen wurde durch nitrosativen Stress mit NO-Donoren (Spe/NO, SNOC, 2 - 12 h), spezifische Hemmung der GSH-Reduktase mit BCNU (2 - 12 h) sowie spezifische Hemmung der GSH-Synthese mit BSO (12 - 21 h) konzentrationsabhängig erniedrigt. Die Inkubation mit einer Kombination von GSH-Reduktase Inhibitor bzw. GSH-Synthese Inhibitor und NO-Donor zeigte eine noch stärkere konzentrationsabhängige GSH-Abnahme. Dies konnte fluoreszenzmikroskopisch durch spezifische Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff mBCI beobachtet und durch biochemische GSH-Konzentrationsmessung bestätigt werden.

Auch das mitochondriale Membranpotential wurde fluoreszenzmikroskopisch durch nitrosativen Stress mit NO-Donoren (Spe/NO, 2 h, DETA/NO, 12 h), sowie auch durch die Störung des GSH-Stoffwechsels mit spezifischer GSH-Reduktase Hemmung durch BCNU (2 - 12 h) beeinträchtigt. Die Kombination von GSH-Reduktase-Inhibitor und eines NO-Donors führte auch hier zu einer noch stärkeren Störung der Mitochondrienfunktion. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde hier  $DiOC_2(5)$  eingesetzt, das nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotential markiert.

Diese Ergebnisse korrelieren mit der bekannten Empfindlichkeit der Ratten-Inselzellen gegenüber NO und veranschaulichen, wie NO die Zink-Homöostase, den GSH-Gehalt und die Mitochondrienfunktion in isolierten Inselzellen beeinträchtigt.