

Weisheit erwerben ist besser als Gold und Einsicht erwerben edler als Silber.

Sprüche 16,16

Meiner Familie gewidmet

# **Oxidativer Streß induzierte Apoptose in Endothelzellen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dietrich Potthoff

aus Madrid, Spanien

Neuß am Rhein

2001

3

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Rösen

Korreferent: Prof. Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2001

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Die innerste Schicht aller Blutgefäße: das Endothel	7
1.2 Oxidativer Streß führt zu Endotheldysfunktion und verursacht Gefäßkomplikationen	9
1.3 Der Zelltod: Apoptose oder Nekrose	10
1.4 Oxidativer Streß induziert Apoptose	12
1.5 Ziele der Arbeit.	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Präparation von Endothelzellen aus Schweineaorten	20
2.2 Zellkultur und Passagieren	21
2.3 Messungen am Durchflusszytometer	22
2.3.1 Detektion der Apoptose und Nekrose mit den Zellfarbstoffen Annexin-V-FITC und Propidium Iodid	23
2.3.2 Nachweis von intrazellulären ROS in Zellen	25
2.3.3 Messung des $\Delta\Psi_M$	27
2.4 Immunologischer Nachweis von Cytochrom-c	28
2.4.1 Zellaufarbeitung	28
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.4.4 Western Blott	30
2.4.5 Antikörper Färbung	30
2.5 Bestimmung des Glutathion Gehaltes der Zellen	31
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Bestimmung der Apoptose und Nekrose	33
3.1.1 In welchen Maße induziert t-BHP Apoptose und Nekrose?	35
3.1.2 Hyperglykämie und Apoptose	39
3.1.3 Induziert die Oxidation des GSH-Pool Apoptose?	40
3.1.4 Die protektive Wirkung von Radikalfänger	41
3.2 Untersuchung der ROS-Bildung in Endothelzellen	42
3.2.1 Bildung von ROS bei Inkubation mit t-BHP	43
3.2.2 Auswirkung von Hyperglykämie auf die ROS-Konzentration	48

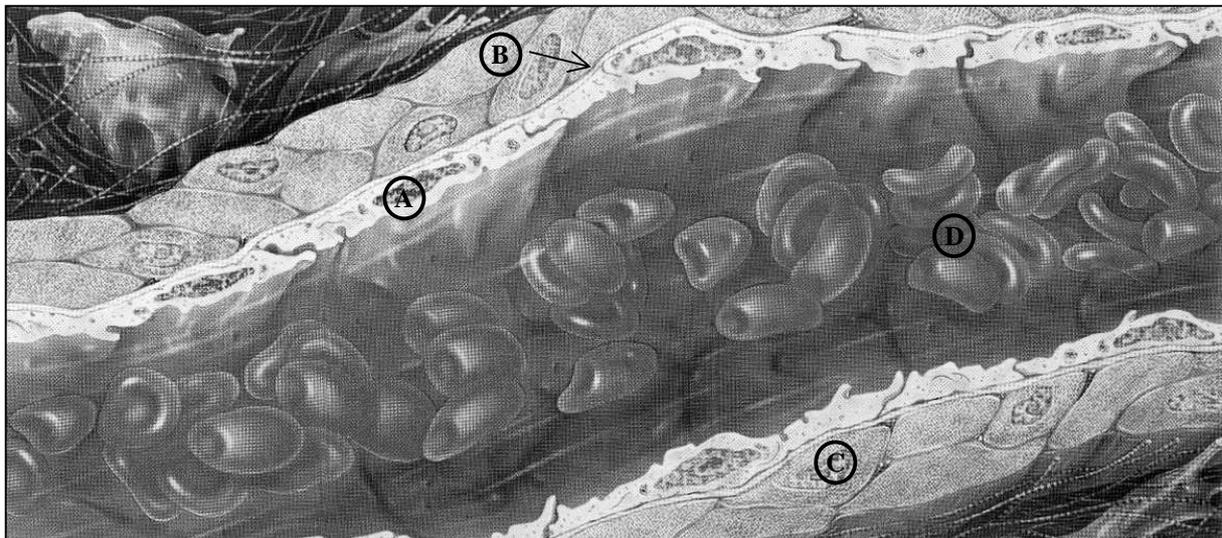
3.2.3 Veränderung der ROS-Konzentration bei Inkubation mit EA	48
3.2.4 Senken Radikalfänger die intrazelluläre ROS-Konzentration?	50
3.3 Auswirkung von oxidativem Streß auf den GSH-Gehalt	51
3.3.1 Veränderung des GSH-Gehaltes durch t-BHP	51
3.3.2 Vergrößerung des GSH-Pools bei Inkubation mit 30 mM Glucose	53
3.3.3 Veränderung des GSH-Gehaltes durch EA	54
3.4 Veränderung des $\Delta\Psi_M$ bei oxidativem Streß	55
3.4.1 Erniedrigung des $\Delta\Psi_M$ bei Inkubation mit t-BHP	57
3.4.2 Erhöhung des $\Delta\Psi_M$ bei Inkubation mit 30 mM Glucose	59
3.4.3 Zunahme der Zellen mit erniedrigtem $\Delta\Psi_M$ bei Inkubation mit EA	60
3.4.4 Schutzwirkung von $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE	61
3.5 Freisetzung von Cytochrom-c ins Zytosol	63
<b>4 Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1 Welchen Einfluss hat t-BHP auf die Induktion von Apoptose und Nekrose?	67
4.1.1 Einfluß von t-BHP als exogener Streßor auf die intrazelluläre ROS-Bildung	68
4.1.2 Wie verändert t-BHP den intrazelluläre Glutathiongehalt?	71
4.1.3 Einfluss von t-BHP auf das Mitochondrienmembranpotentials	72
4.1.4 Auslösen der Degradations Phase durch Cytochrom-c	73
4.1.5 Einfluss von Radikalfänger auf die Induktion der Apoptose	74
4.2 Auswirkungen von Hyperglykämie auf Endothelzellen	76
4.3 Die Oxidation des GSH-Pools führt zur Apoptose	79
4.4 Zusammenfassung	83
<b>5 Anhang</b>	<b>84</b>
5.1 Abkürzungsverzeichnis	84
5.2 Lösungen und Material	85
5.3 Tabellenverzeichnis	90
5.4 Literaturverzeichnis	99
5.5 Danksagungen	111

# 1 Einleitung

## 1.1 Die innerste Schicht aller Blutgefäße: das Endothel

Alle Blutgefäße bestehen aus mehreren Zellschichten. Dem Blutstrom zugewandt (luminal) liegt die einzellige Schicht des Endothels. Das Endothel kann als Organ betrachtet werden, welches beim erwachsenen Menschen eine Zelloberfläche von 700-1000 m<sup>2</sup> umfaßt. Das Gewicht aller Endothelzellen des Körpers entspricht dem der Leber [1]. Eine Basallamina grenzt das Endothel gegen die anderen Zellen des Gefäßes ab. In mikrovaskulären Gefäßen ist der Basallamina eine Schicht aus Perizyten aufgelagert. Perizyten sind kontraktile Bindegewebszellen, die den Querschnitt der Kapillaren regulieren [2] und den Stoffaustausch zwischen Blut und umgebendem Gewebe fördern [3]. In makrovaskulären Gefäßen folgen auf die Basallamina eine oder mehrere Muskelzellschichten [4], die primär der Regulation und Erhaltung des Gefäßdurchmessers dienen.

Abbildung 1.1: Gefäßquerschnitt einer kleinen Arterie



Die Endothelzellen (A) kleiden die Blutgefäße von innen aus, die sich anschließende Basallamina (B) wird von Muskelzellen (C) umgeben. Die Erythrozyten (D) fließen ohne an die Gefäßwände zu stoßen im Axialstrom in der Gefäßmitte [5].

Die Funktion des Endothels differiert entsprechend seiner Lokalisation in der Strombahn, einige Charakteristika sind jedoch allgemein gültig. So müssen Endothelzellen stets den Austritt von Blut aus den Gefäßen verhindern (Barrierefunktion) und trotzdem den gezielten Stoffaustausch zwischen Blut und Körperzellen ermöglichen. Die Barrierefunktion beruht auf den Verbindungen einzelner Endothelzellen [6], welche die interzellulären Räume dicht gegen das Blut und Blutbestandteile verschließen. Ihre Anzahl bestimmt die Undurchlässigkeit des Endothels. In Bereichen ohne „tight junctions“ befinden sich im Interzellularraum ca. 4 nm breite, wassergefüllte Poren, in denen Wasser und Elektrolyte aus dem Blut durch das Endothel diffundieren können. Da die luminale Oberfläche der Endothelzellen überwiegend negativ geladen ist, gelangen auf diesem Weg primär Kationen durch das Endothel [7].

Der Blutdruck eines Gefäßes wird unter anderem durch den Gefäßwiderstand bestimmt. In Widerstandsgefäßen wird der Gefäßdurchmesser durch die Kontraktion oder Relaxation der Muskulatur eingestellt, die das Gefäß umgibt. In mikrovaskulären Gefäßen reguliert die Kontraktion oder Relaxation der Perizyten [2] gemeinsam mit den vorgeschalteten Gefäßen des Kapillarsystems den lokalen Blutdruck [4].

Der Gefäßwiderstand wird wesentlich durch die Aktivität des Endothels bestimmt, das durch die Produktion von Stickstoffmonoxid [8, 9] und Prostazyklin [10] die Relaxation (Vasodilation) und durch die Synthese von Angiotensin II und Endothelin die Kontraktion (Vasokontraktion) der Gefäße steuert.

Das Endothel sorgt auch für einen ungehinderten Blutfluß, indem es durch die Abgabe von Heparin [11] und Protein-C [12] die Blutgerinnung hemmt. Endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin verhindern ebenfalls die Blutgerinnung, indem sie die Aggregation von Blutplättchen hemmen.

## 1.2 Oxidativer Streß führt zu Endotheldysfunktion und verursacht Gefäßkomplikationen

Akuter und chronischer oxidativer Streß auf das Endothel ist eine wichtige Ursache der endothelialen Dysfunktion wie z.B. eine verändert endotheliale Relaxation [13], eine erhöhte Permeabilität [14] oder eine erhöhte endothelialen Adhäsion für Leukozyten [14]. Darüberhinaus spielt es eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von verschiedenen Gefäßkrankheiten wie z.B. Athereosklerose, Diabetes mellitus oder Bluthochdruck.

Dabei kann der oxidative Streß eine Vielzahl von Quellen haben. Bei Diabetes mellitus kommt es zu einer Hyperglykämie, die durch autooxidative Glycosilierung zur Quervernetzung von Proteinen führt, den sogenannten „advanced glycosylated endproducts“ (AGE) [15, 16]. Sowohl bei diesen Reaktionen als auch von den AGE selbst können Sauerstoffradikale den „reactive oxygen spezies“ (ROS) generiert werden. Aber auch „oxidised low density lipoproteins“ (ox LDL) [17, 18], erhöhte Strömungsturbulenzen durch Bluthochdruck [19], oder Tabakkonsum [20] führen zu oxidativen Streß.

ROS sind Sauerstoffverbindungen in denen der Sauerstoff nicht vollständig reduziert ist wie z.B. Superoxidanion (Hyperoxid) ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxylradikale ( $OH^{\cdot}$ ) [19, 21, 22]. ROS können verschieden Funktionen ausüben, sie dienen unter anderem als Signalmoleküle und stimulieren zelluläre Aktivitäten von der Cytokinsekretion bis hin zur Zellproliferation. Bei höheren Konzentrationen verursachen sie aber Zellschädigungen und können den Zelltod einleiten [14].

Bei vermehrter Bildung von ROS, kommt es zur Schädigung des Endothels und zur Veränderung der Intima [3]. Dadurch wird die Bildung von Plaques und die Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßwand gefördert [3]. Diese sklerotischen Beete haben eine Verengung des Gefäßes zufolge, was zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und kompensatorisch zu einer Blutdruckerhöhung führt. Auch werden die dahinterliegenden Gewebeteile schlechter durchblutet und können absterben, was zu mikrovaskulären Komplikationen wie einem Raucherbein oder einem Diabetiker Fuß führen kann. Zusätzlich besteht die große Gefahr, daß sich Thromben bilden, bzw. gebildete Thromben abreißen und zur Verstopfung eines Gefäßes führen. Als Folge kann es zu einem Herzinfarkt, Schlaganfall oder einer Embolie kommen.

### 1.3 Der Zelltod: Apoptose oder Nekrose

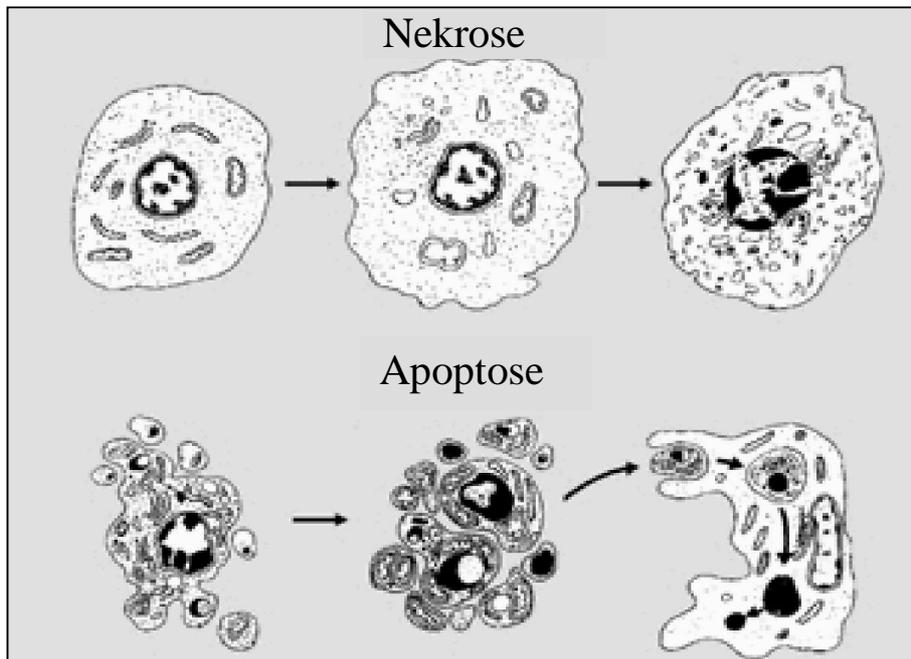
Die Apoptose beschreibt Vorgänge bei dem programmierten Zelltod. Der Begriff „Apoptose“ wurde das erste Mal von Kerr, Wyllie und Currie bei Beobachtungen an toxinbehandelten Leberzellen geprägt [23, 24]. Dieser Begriff ist dem Griechischen entlehnt und meint Ursprünglich das Herabfallen der Blätter von den Bäumen.

Die Apoptose ist nicht nur in der embryonalen Entwicklung von Bedeutung, sie spielt auch bei der Erhaltung der Gewebshomöostase eine große Rolle [23]. Apoptose ist durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, das zumeist in der Peripherie des Zellkerns aggregiert. Die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen charakteristisch gespalten. Dies führt zum Entstehen von DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon (DNA-Leiter). Die Zellmembranstabilität geht verloren, und Ausstülpungen der Zelle (Zeiose) werden beobachtet. Schließlich werden membranumschlossene Säckchen abgeschnürt (Blebbing), die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Parallel dazu wird die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche beobachtet, die zu einem Verlust der Membranasymmetrie führt. Anschließend werden die apoptotischen Körperchen von Fresszellen und den Nachbarzellen aufgenommen [23].

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zelle (Oncoze) charakterisiert. Dies führt zum Reißen der Plasmamembran und zur Freisetzung des Inhalts des Zytoplasmas und von Zellorganellen in den interzellulären Raum. Als Folge kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion mit einhergehenden Gewebeschädigungen, in der sich die Nekrose ausbreitet. In vitro können apoptotische Körperchen nicht von Fress- und Nachbarzellen aufgenommen werden, sodaß sie reißen und sekundär nekrotisch werden [25]. In Abbildung 1.2 ist der morphologische Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose dargestellt.

Obwohl lange Zeit Apoptose und Nekrose als zwei vollständig verschiedene Vorgänge betrachtet wurden, wird heute angenommen, daß die beiden Formen des Zelltodes zwei Endpunkte eines Vorganges darstellen. Verschieden Beobachtungen bestätigen diese Ansicht. Dasselbe Toxin kann sowohl Nekrose, als auch bei einer subnekrotischen Konzentration Apoptose auslösen [25, 26, 27]. Wird die Apoptose durch Caspaseinhibitoren unterbunden, kommt es zur Nekrose [25, 28, 29]. Darüberhinaus spielt die mitochondriale

Abbildung 1.2 Morphologischer Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose



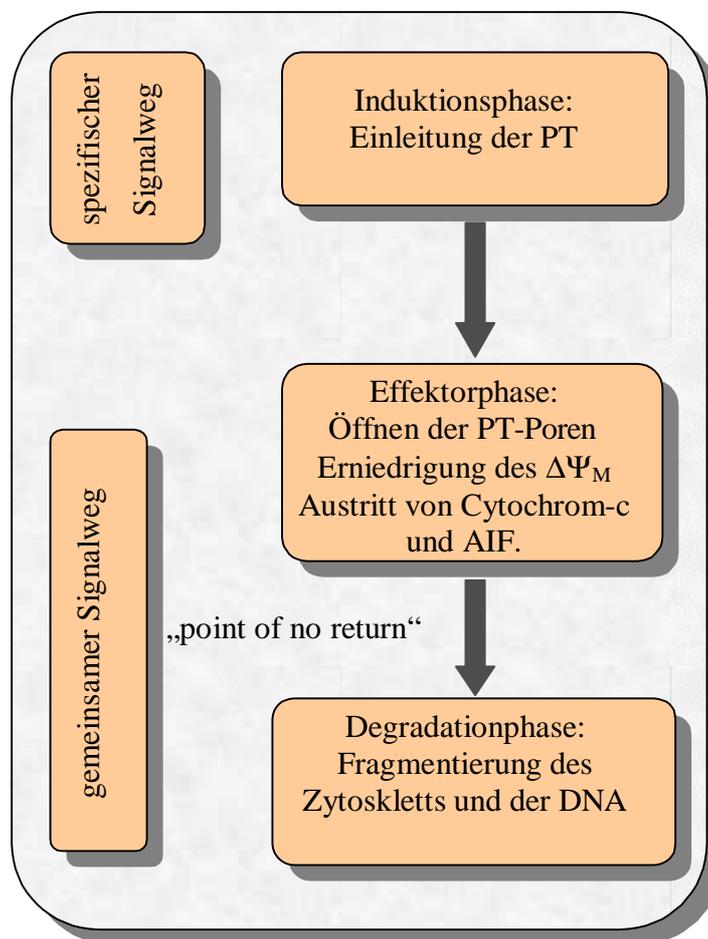
Bei der Nekrose schwillt die Zelle an, es bilden sich Löcher in der Zellmembran, das Zytoplasma fließt aus, und es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Die Apoptose ist die häufigste Form des Zelltods im Organismus. Die Zellen zeigen zunächst wilde Bewegungen, dann wirft die Zelle verpackte Bläschen, der Zellkern zerfällt, das Chromatin kondensiert und die Reste der Zellen werden sehr schnell von Fresszellen oder kannibalischen Nachbarzellen aufgenommen. Es kommt nicht zu einer Entzündungsreaktion. Graphik von Kramer [23].

Permeabilitätstransition (PT), die zu einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ) führt, sowohl bei der Nekrose als auch bei der Apoptose eine entscheidende Rolle [25, 26, 30]. Auch können typische apoptotische Merkmale wie die DNA-Leiter auch während der Nekrose vorkommen [25, 29, 31]. Die Beobachtungen führen zu der Vermutung, daß während der Apoptose und Nekrose verschiedene Reize über „private“ Signalwege zu der Induktion der PT führen. Abhängig von der Stärke und Dauer der induzierten PT kommt es entweder zur Apoptose oder zur Nekrose. Bei der Nekrose führt eine massive PT zu einem schnellen Verlust von ATP und NAD(P)H<sub>2</sub>. Als Folge kommt es zur bioenergetischen Katastrophe, einer starken Veränderung des Redoxpotentials und zum Permeabilisieren der Zellmembran. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Apoptose zu einer schwachen PT, bei der sich die ATP Konzentration nicht drastisch verändert, aber Cytochrom-c austritt und die Caspasekaskade aktiviert. Es kommt zur Fragmentierung des Cytoskletts und der DNA, dabei bilden sich apoptotische Körperchen die in vivo von Makrophagen und Nachbarzellen einverleibt werden.

## 1.4 Oxidativer Streß induziert Apoptose

Die Vorgänge während der Apoptose werden in drei unterschiedliche Phasen unterteilt. In der Induktionsphase der Apoptose können verschiedene Reize über spezifische Signalwege die Effektorphase auslösen. Ab dort läuft ein gemeinsamer Signalweg ab, der ab Erreichen der Degradationsphase nicht mehr umkehrbar ist. Da die Ursachen oxidativer Streßfaktoren unterschiedlich sind, können sie sowohl getrennt über spezifische Signalwege als auch synergistisch zur Induktion der Apoptose führen.

Abbildung 1.3 Induktion der Apoptose in drei Phasen



In der Induktionsphase führen verschiedene den Zelltod induzierende Reize über spezifische Signalwege zur Induktion der PT. Die PT ist der erste gemeinsame Schritt des Signalwegs und markiert den Beginn der Effektorphase; dabei gelangen die Apoptose induzierenden Faktoren Cytochrom c und AIF ins Zytosol. Danach kann die Induktion der Apoptose nicht mehr rückgängig gemacht werden, und es kommt in der Degradationsphase zur Zerlegung der Zelle.

### Induktionsphase:

In der Induktionsphase führt exogener oxidativer Streß zunächst zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Bildung, wobei die Atmungskette der Mitochondrien eine Hauptquelle der ROS darstellt. Selbst unter physiologischen Bedingungen gehen ca. 1-5 % der Elektronen der Atmungskette verloren und dienen der ROS-Bildung [32, 19]. In Streßsituationen kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Bildung, wobei ROS nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch durch die NADPH-Oxidase, die Monoamin-Oxygenase, die Xanthin-Oxidase oder die Cytochrom P450 (CYP) Mono-Oxygenase generiert werden können [17, 19, 33]. Da ROS als „second messenger“ für viele Wachstumsfaktoren oder Cytokine dienen, kann ihre Überproduktion einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene haben [19, 34, 35, 36].

Darüberhinaus kommt es aufgrund der erhöhten ROS-Konzentration zu einer Beeinflussung des Oxidationsschutzes. Da ROS ständig produziert werden und eine Anhäufung in der Zelle zu Schäden führen würden, werden sie unter physiologischen Bedingungen von einem Antioxidationssystem abgefangen. Dabei macht sich die Zelle die reduzierende Eigenschaft der Thiolgruppe des Glutathions zunutze [22, 32, 36, 37]. Das Glutathion kommt intrazellulär, abhängig vom Zelltyp, in einer Konzentration von ca. 1-10 mM vor und dient als Redoxpuffer. In den Zellen reagiert Glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycin, [GSH]) schnell und nichtenzymatisch mit Hydroxylradikalen, Superoxidanionen (Hyperoxid) und Peroxynitriten. Darüberhinaus nimmt GSH an der enzymatischen Entgiftung von Wasserstoffperoxid und Lipidperoxid teil. Jede dieser Reaktionen führt direkt oder indirekt zur Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG)[34, 60-67].

Das GSH-Niveau in der Zelle wird durch ein Gleichgewicht von Synthese und Verlust konstant gehalten. Das entstehende GSSG wird unter physiologischen Bedingungen durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert, so daß das Verhältnis ( $[GSH]/[GSSG] > 100$ ) gleich bleibt [34, 68, 69]. Dieses  $[GSH]/[GSSG]$  Verhältnis bestimmt den Redoxstatus der Zelle.

Abbildung 1.4 ROS Erzeugung und Entgiftung

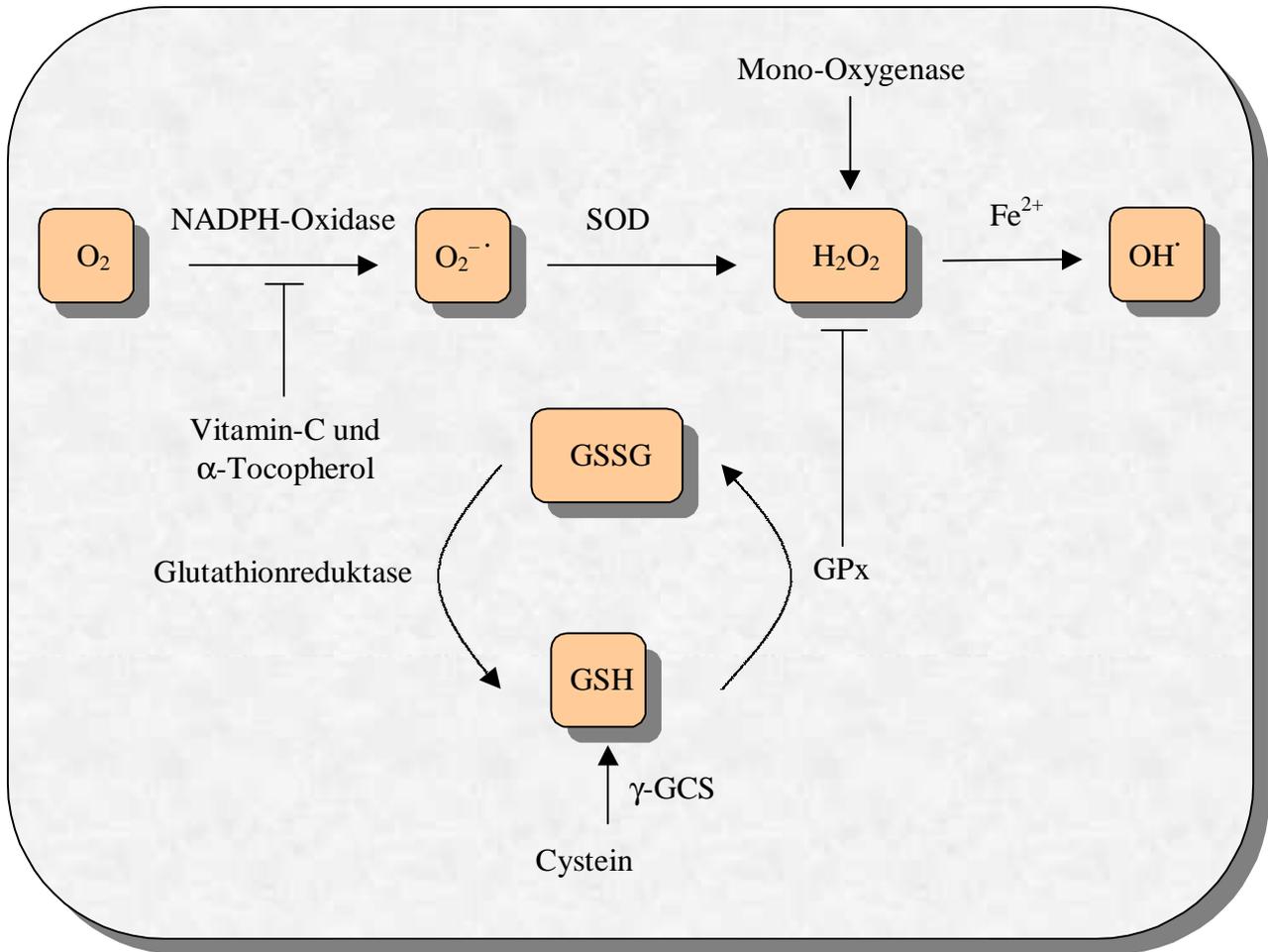


Abb tXt: Verschiedene chemische Reaktionen führen mit oder ohne enzymatische Katalyse zur Erzeugung von ROS. Das Sauerstoffmolekül ( $O_2$ ) unterläuft sukzessiver Reduktion, wobei es die Stadien des Superoxidanion (Hyperoxid) ( $O_2^{\bullet -}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), und Hydroxylradikal ( $OH^\bullet$ ) durchläuft. Das Antioxidationsystem inaktiviert ROS und erhält so den Redoxstatus aufrecht. Vitamin-C und  $\alpha$ -Tocopherol fangen freie Radikale ein, die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid bzw. Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Das GSH ist entweder durch direkte Reaktion oder indirekt durch enzymatische Reaktion der Glutathionperoxidase (GPx) an der Entgiftung durch den zellulären Redoxschutz beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen kann das entstehende GSSG durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert werden. Durch Veränderung des Redoxstatus wird die GSH-Neusynthese aus Cystein verstärkt, wobei die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase ( $\gamma$ -GCS) das limitierende Enzym ist. Modifiziert nach Morel et al. [19].

Unter Bedingungen des oxidativen Stresses kann die Kapazität des antioxidativen Schutzsystems überschritten werden, dann kommt es zur Anhäufung von GSSG in der Zelle, sowie zur Veränderung des Redoxstatus der Zelle [19, 34, 38]. Zur Wiederherstellung des Redoxstatus wird zum einem das GSSG aus der Zelle sekretiert [34, 68-71] und zum anderen

die Neusynthese von GSH verstärkt [34, 35, 72-74]. Es ist bekannt, daß durch oxidativen Streß die Transcription von GSH-Synthetisierende Proteinen wie z.B. der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase ( $\gamma$ -GCS) verstärkt wird [34, 35, 72-74]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß deren Aktivität durch Phosphorylierung oder Nitrosylierung moduliert werden kann [34].

Da der Redoxstatus einiger Proteinthiole abhängig vom Redoxstatus der Zelle ist, verändern sie ihre Redoxform bei oxidativen Streß. Dadurch kann es zu Konformationsveränderungen kommen, die bei einigen Transkriptionsfaktoren wie z.B. „nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF- $\kappa$ B) oder „activator protein 1“ (AP-1) [19, 75, 76] zur Veränderung der Gentranskription führen kann.

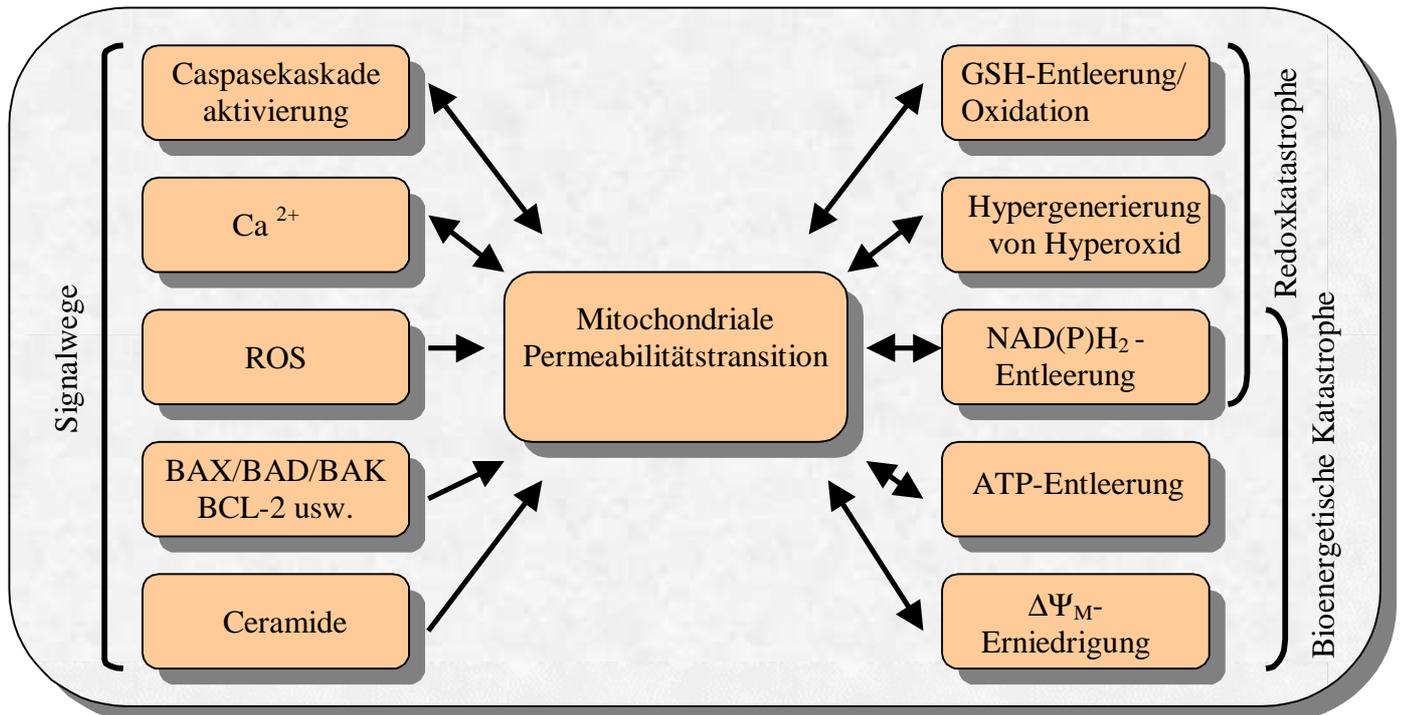
### Effektorphase:

Die Effektorphase wird mit der Öffnung der Permeabilitätstransitionporen (PT-Poren) in den Mitochondrienmembranen eingeleitet und spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Die Permeabilitätstransition kann verschiedene Ursachen haben und unterschiedlich induziert werden. In Abbildung 1.5 sind einige Induktionsursachen dargestellt.

Bislang ist die genau Zusammensetzung der PT-Poren nicht geklärt, es ist lediglich bekannt, daß Membranproteine beider Mitochondrienmembranen beteiligt sind. Es wird vermutet, daß unter anderem der „adenin nucleotid translocator“ (ANT) der inneren Membran und das Porin/„voltage dependet anion channel“ (VDAC) der äußeren Membran beteiligt sind. Darüberhinaus könnten auch die Hexokinase, der Benzodiazepinrezeptor, die Kreatinkinase und das Cyclophilin-D daran mitwirken [32, 77, 78].

Der exakte Mechanismus der PT-Porenöffnung ist bislang unbekannt. Allerdings wird vermutet, daß es aufgrund der Oxidation von Proteinthiolen der PT-Poren zu Konformationsveränderungen kommt, welche die Öffnung der PT-Poren verursachen [39, 79]. Weiterhin könnten das proapoptische BAX und andere Proteine aus dieser Familie (BCL-2, BAD usw) an der Regulation der PT-Porenöffnung beteiligt sein [32, 39, 80].

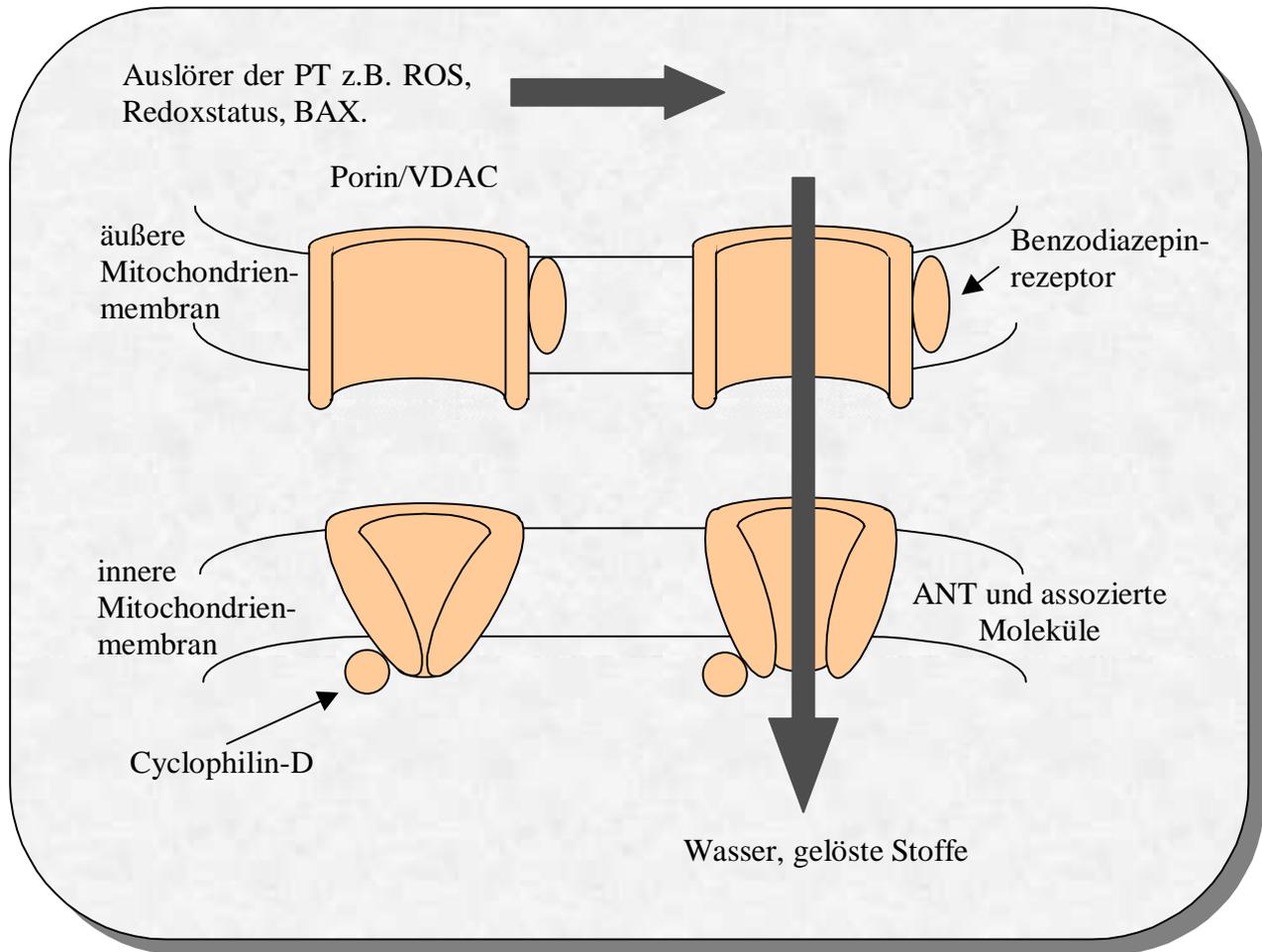
Abbildung 1.5 Ursachen und Ereignisse der mitochondrialen Permeabilitätstransition



Hier sind einige Ursachen dargestellt, die zur Induktion der mitochondrialen PT führen können. Über verschiedene Signalwege z.B. die Aktivierung der Caspasekaskade, den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die verstärkte Generierung von ROS, eine Veränderung des BAX/BCL-2 Verhältnisses oder Lipidmediatoren wie Ceramide kann die PT verursacht werden. Aber auch starke Veränderungen des Redoxstatus oder der bioenergetischen Parameter wie der ATP- oder NAD(P)H<sub>2</sub>-Konzentration können zu einer Öffnung der Poren führen. Zusätzlich führen einige Effekte der PT wie die GSH-Entleerung oder die Erniedrigung des ΔΨ<sub>M</sub> zur Selbstverstärkung der PT. Modifiziert nach Krömer et al. [25].

Durch das Öffnen der PT-Poren können Proteine und Moleküle, die ≤ 1,5 kD [32, 81] sind, aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol übertreten. Es kommt zur Erniedrigung des ΔΨ<sub>M</sub> und zum Anschwellen der Matrix durch den osmotischen Ausgleich. Da die innere Mitochondrienmembran stark gefaltet ist, reißt dadurch die äußere Mitochondrienmembran, sodaß Apoptose induzierende Proteine wie „apoptosis inducing factor“ (AIF) und Cytochrom-c ins Zytosol gelangen können [32, 40, 41]. Durch das Austreten von Cytochrom-c kommt es zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, sodaß es zu einer verstärkten Bildung von ROS [25, 32, 42] kommt und zum anderen weniger ATP produziert wird [32, 39]. Beides führt zur Oxidation des GSH-Pools und zur Verstärkung der PT. Diese verschiedenen sich selbst verstärkenden Effekte können erklären warum, die PT und damit der Zelltod als ein „entweder oder“ Phänomen auftritt [25, 32, 40, 41, 90].

Abbildung 1.6 Schematische Zusammensetzung der PT-Poren



Die mitochondriale Permeabilitätstransition wird durch Öffnung der PT-Poren verursacht. Komponenten dieser Poren könnten unter anderem die membranständigen Proteinen Porin/VDAC, ANT und der Benzodiazepinrezeptor sein. In der offenen Konfiguration gelangen Wasser und gelöste Stoffe in die Matrix und verursachen ein Anschwellen der Matrix und ein Reißen der äußeren Mitochondrienmembran. Folgen sind die Translokation von Cytochrom-c und AIF in das Zytosol. Modifiziert nach Green et al. [32]

## Degradationsphase:

Mit dem Erscheinen von Cytochrom-c und AIF im Zytosol wird die Degradationsphase eingeleitet, in der es unter anderem zur Fragmentierung des Cytoskeletts und der DNA kommt. In den Mitochondrien liegt das Cytochrom-c im Intermembranraum vor. Dabei ist es durch das Membranpotential elektrostatisch an der Aussenseite der inneren Mitochondrienmembran gebunden und überträgt bei der oxidativen Phosphorylierung Elektronen von der Ubichinol:Cytochrom-c Oxidoreduktase zur Cytochrom-c Oxidase. Der

genaue Mechanismus, durch den Cytochrom-c während der PT freigesetzt wird, ist noch unklar. Durch die Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  löst sich die elektrostatische Bindung des Cytochrom-c, sodaß nach Anschwellen und Reißen der äußeren Mitochondrienmembran das Cytochrom-c ins Zytosol gelangen kann [40, 23]. Im Zytosol bindet Cytochrom-c an „apoptosis protease activating factor-1“ (Apaf-1), welches zur Aktivierung von Caspase-9 führt [23], was die Aktivierung der Caspasenkaskade zur Folge hat und letztlich zur DNA-Fragmentierung führt [32, 23, 82-86].

Das AIF besitzt Proteaseaktivität und ist in der Lage, Caspase-3 ähnliche Caspasen zu aktivieren [23]. Ferner verursacht es eine DNA-Fragmentierung in Zellkernen [23, 41] und eine Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran [23, 41, 87-89]. Diese an der äußeren Zellemembran exponierten Phosphatidylserine werden von Makrophagen erkannt, sodaß die so markierten Zellen phagozytiert werden [23].

## 1.5 Ziele der Arbeit.

Oxidativer Streß wird als ein Hauptgrund für die Entstehung von Gefäßschäden und den daraus resultierenden Komplikationen diskutiert. Bei der Schädigung des Endothels spielt der Zelltod von Endothelzellen eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob und auf welchem Signalweg oxidativer Streß den Zelltod induziert. Als Modellsystem wurden kultivierte Schweineaorten-Endothelzellen (porcine aortic endothelial cells [PAEC]) verwendet.

- Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit die Art des Zelltodes differenziert und untersucht, in welchem Konzentrationbereich, bei Inkubation mit tert-Butylhydroperoxid (t-BHP) als exogener Streßor, Apoptose oder Nekrose induziert wird.

Anschließend wurden wichtige Stationen in der Signalkette intensiver Betrachtung unterzogen:

- Dazu wurde die Veränderung der intrazellulären ROS-Konzentration durch exogenen oxidativen Streß untersucht.
- Die Auswirkungen von oxidativen Streß auf den Redoxstatus der Zelle wurde durch Messung des intrazellulären Glutathions bestimmt.
- Die Induktion der PT wurde durch Messung des  $\Delta\Psi_M$  überprüft.
- Als wichtiger Apoptose induzierender Faktor zur Einleitung der Degradationsphase, wurde das Austreten des Cytochrom-c ins Zytosol untersucht.
- Es wurde geprüft, ob und inwieweit die Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathionethylester (GSH-EE) Endothelzellen vor den Folgen des oxidativen Streß schützen können.
- Weiterhin sollte die besondere Bedeutung der Oxidation des GSH-Pools durch Inkubation der Zellen mit Ethacrylsäure (EA) untersucht werden.
- Zum Schluß sollte die Auswirkungen von Hyperglykämie auf dieses Model überprüft werden.

## 2 Material und Methoden

Die unterstrichenen Lösungen und Geräte sind in dem Anhang 5.2 Lösungen und Material angegeben.

### 2.1 Präparation von Endothelzellen aus Schweineaorten

Die Isolierung der PAEC aus Schweineaorten erfolgte nach der Methode von Booyse et al. [43], modifiziert nach Oestreich [44] und Zink [45].

Die Aorten frisch geschlachteter Schweine wurden einzeln verpackt zum Labor transportiert, wo alle weiteren Schritte unter einer Werkbank durchgeführt wurden. Die Aorten wurden dort rasch von Fett und Bindegewebe befreit, von außen vorsichtig mit 70%igem Ethanol abgetupft und schließlich der Länge nach dicht neben den abführenden Intercostalgefäßen aufgeschnitten. Die luminale Seite wurde mit Waschpuffer blutfrei gewaschen, dann wurde die Leiste mit den Intercostalgefäßen abgeschnitten um eine geschlossene Aortenfläche zu erhalten. Die Aortenwand wurde im Bereich der Media eingeritzt, sodaß die Adventitia von der Intima abgezogen werden konnte. Letztere wurde bis zur Enzyminkubation maximal eine Stunde in Aufbewahrungsmedium bei 25°C aufbewahrt.

Für die Enzyminkubation wurden die in Streifen geschnittenen Gefäße in eine Dispaselösung gegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Gefäßstreifen aus der Dispaselösung genommen und mit der Intima nach oben auf eine glatte Unterlage gelegt. Mit einem Teflonspatel wurden die Endothelzellen vorsichtig abgestrichen und in 3 ml Medium M1 abgespült. Die Zellen wurden resuspendiert und gleichmäßig auf 3 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verteilt, in denen schon 2 ml Medium M1 vorlag.

Nach 24 Stunden im Begasungsbrutschrank wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und erneut mit 37°C warmen Medium M1 versetzt. Bei jeder Präparation wurden 10 Aorten verarbeitet und die Zellen jeder Aorta getrennt kultiviert, wobei die Zellen einer Aorta als Zell-Linie bezeichnet wurden. Zur Identifikation der Endothelzellen wurde das Glykoprotein Faktor-VII-assoziiertes-Antigen auf der äußeren Zellmembran nach der Methode von Hoyer et

al. [46] nachgewiesen. Dieses Glykoprotein Faktor-VII-assoziiertes-Antigen stabilisiert das Faktor-VIII-Protein im Blut und wird nur von Endothelzellen exprimiert.

### 2.2 Zellkultur und Passagieren

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in Begasungsbrutschränken bei 37°C und einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft. Dabei wurden die Zellen in Kulturflaschen aus Polypropylen mit einer Bodenfläche von 12,5 cm<sup>2</sup> und 25 cm<sup>2</sup> gehalten, die vorher durch Inkubation mit einer Gelatinelösung mit Gelatine beschichtet wurden.

Endothelzellen wachsen in einer einzelligen Schicht (Monolayer) auf definiertem Untergrund. Sobald die Zellen zu einem dichten, konfluenten Monolayer gewachsen sind (ca. 100.000 EC/cm<sup>2</sup>), müssen sie passagiert werden, d. h. von ihrem Untergrund abgelöst und auf frische Kulturflaschen verteilt werden. Die Anzahl von Passagen ist somit ein Maß für das Alter einer Linie.

Zum Ablösen der Endothelzellen wurde das Medium M1 entfernt, einmal mit 37°C warmen PBS gewaschen und eine Trypsinlösung (1 ml Lösung/25 cm<sup>2</sup>) hinzugegeben. Dadurch werden adhäsive Proteine verdaut, welche die Haftung der Zellen an der Matrix und untereinander bewirken. Das Ablösen wurde unter dem Mikroskop verfolgt und durch Zugabe von 5-10 ml/12,5 cm<sup>2</sup> 37°C warmen Medium M1 gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und auf neue Kulturflaschen gegeben, sodaß die Endothelzellenkonzentration ca. 50.000-25.000 Endothelzellen/cm<sup>2</sup> betrug. Am nächsten Tag wurde das Medium M1 abgesaugt und durch frisches 37°C warmes Medium M1 ersetzt. Dabei wurde in einer 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche 2 ml und in einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche 5 ml 37°C warmes Medium M1 gegeben. Das Medium M1 wurde alle 2 Tage gewechselt.

## 2.3 Messungen am Durchflußzytometer

Für eine Messung am Durchflußzytometer werden 10.000 Zellen benötigt. In einer Monolayerschicht von PAEC wachsen ca 100.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Als effizient hat sich die Arbeit mit einer 24-Loch-Platten erwiesen. Konfluente Zellen der Passage 1 wurden 1-2 Tage vor Messung am Durchflußzytometer auf eine 24-Loch-Platte passagiert, sodaß sie konfluent waren. Die Zellen wurden mit 1 ml Medium M1 pro Loch bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank inkubiert. Für jeden Wert wurden mindestens 2 Proben von 2 verschiedene Zelllinien bestimmt.

Wurden die Zellen mit α-Tocopherol, GSH-EE, oder EA, inkubiert, wurde vor Zugaben der Stimulantien das Medium M1 abgesaugt, einmal mit warmen PBS gewaschen, neues warmes Medium M1 hinzugefügt und dann die Stimulantien zugefügt. Wenn mit einer tert-Butylhydroperoxidlösung (t-BHP-Lösung) inkubiert wurde, dann wurde vorher warmes FCS freies Medium M2 hineinpipettiert, zu der die t-BHP-Lösungen hinzupipettiert wurden. Bei Messungen mit einer Inkubationszeit von vier, sechs und acht Stunden wurde das FCS freie Medium M2 nach einer Stunde abgesaugt, die Zellen mit warmen PBS gewaschen und für drei, fünf, und sieben Stunden ohne t-BHP mit warmen Medium M1 inkubiert. Das bedeutet, daß bei einer vierstündigen Inkubationszeit die Zellen eine Stunde mit t-BHP inkubiert wurde, dann ein Mediumwechsel statt fand und anschließen noch drei Stunden ohne t-BHP bis zur Aufarbeitung und Messung inkubiert wurde. Wurden die Zellen mit 30 mM Glucose Medium M3 inkubiert, wurde dieses Medium M3 alle 24 Stunden gewechselt. Bei den Kontrollwerten mit normalem Medium M1 wurde dann ebenfalls alle 24 Stunden das Medium M1 gewechselt.

Zur Aufarbeitung der Zellen wurde das Medium am Ende der Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Trypsinlösung vom Untergrund abgelöst. Zum Abstoppen wurden die Zellen in 1 ml kaltem Medium M1 suspensiert und in ein 15 ml Falcon gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zellen wurden mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4°C wurde das Sediment in 500 µl kaltem PBS resuspensiert und in ein Durchflußzytometerröhrchen pipettiert. Die Zellproben wurden bis zur Messung auf Eis aufbewahrt und innerhalb einer Stunde vermessen. Alle Messungen wurden am

Durchflußzytometer mit identischen Geräteeinstellungen durchgeführt und mit WinMDI 2.8 ausgewertet. Die Anregungswellenlänge des Lasers betrug 488 nm.

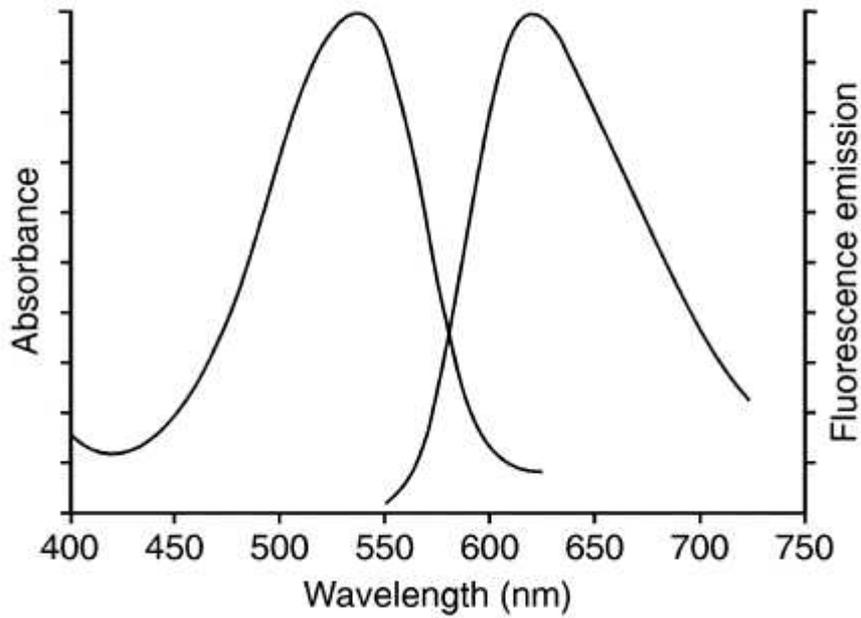
### 2.3.1 Detektion der Apoptose und Nekrose mit den Zellfarbstoffen Annexin-V-FITC und Propidium Iodid

Bei diesem Nachweis werden die Zellen gleichzeitig mit zwei Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt, um nekrotische von apoptotischen Zellen unterscheiden zu können. Propidium Iodid (PI) [3,8-Diamino-6-phenyl-5-(3-diethylaminopropyl)-phenanthridiniumjodid-methiodid] dringt durch permeabilisierte Zellmembranen und lagert sich in der DNA ein. Annexin-V-FITC bindet mit hoher Affinität an das in der Zellmembran liegende Phosphatidylserin. Es wurden fertige Fluoreszenzfarbstofflösungen und HEPES-Bindungspuffer des Annexin-V-FLUOS Staining Kit von Roche eingesetzt und gemäss der Anleitung des Herstellers verwendet.

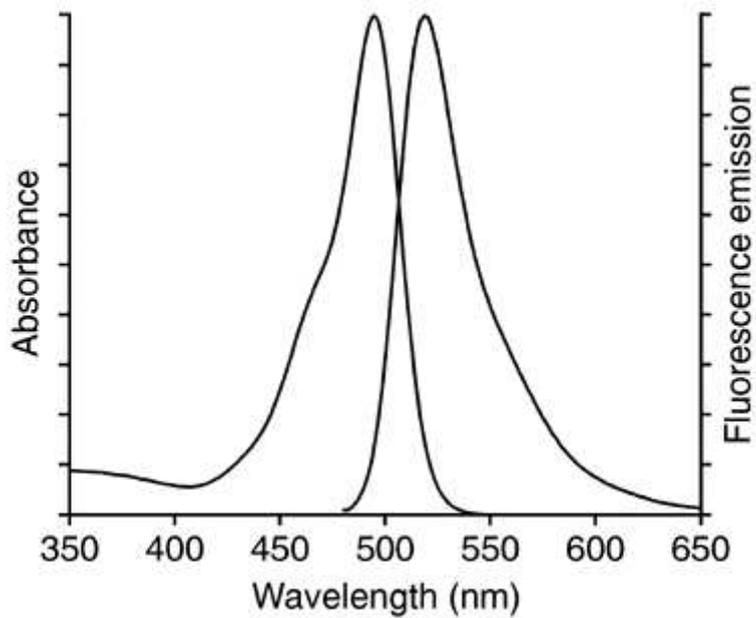
Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen wie unter 2.3 beschrieben aufgearbeitet. Allerdings wurden das Sediment zum Schluß nicht in 500 µl PBS suspensiert sondern, in 100 µl Fluoreszenzfarbstofflösung resuspensiert und in ein Durchflußzytometerröhrchen pipettiert. In dem Durchflußzytometerröhrchen wurden die Zellen bei Raumtemperatur vor Licht geschützt für 10-15 min inkubiert. Anschließend wurde zu den Proben noch 250 µl HEPES-Bindungspuffer zugefügt. Die Zellproben wurden bis zur Messung auf Eis aufbewahrt und innerhalb einer Stunde vermessen. Am Durchflußzytometer wurden für alle Messungen identische Geräteeinstellungen verwendet

Die grüne Fluoreszenz des Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markierten Annexins wurde mit einem 515 nm Bandpassfilter gemessen. Die rote Fluoreszenz des PI wurde mit einem 600 nm Bandpassfilter gemessen.

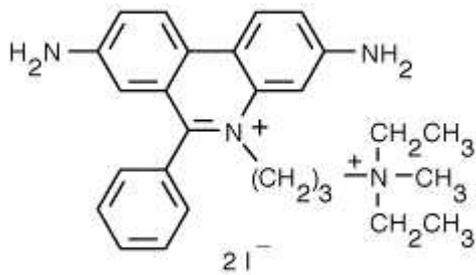
Abbildung 2.1: Spektrum von PI und FITC gekoppelt an Annexin, Molekülstruktur von PI und FITC



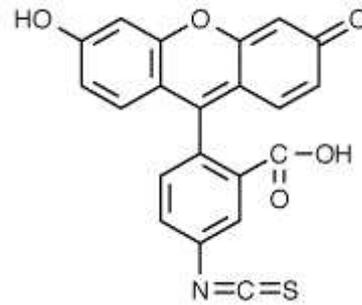
(A)



(B)



(C)



(D)

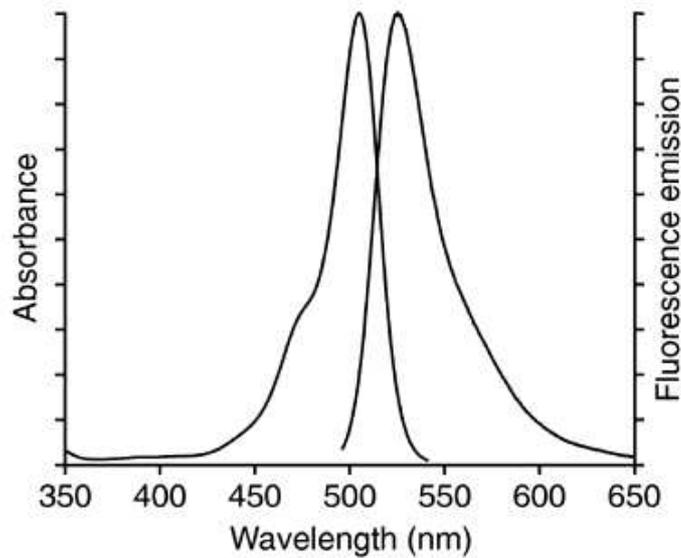
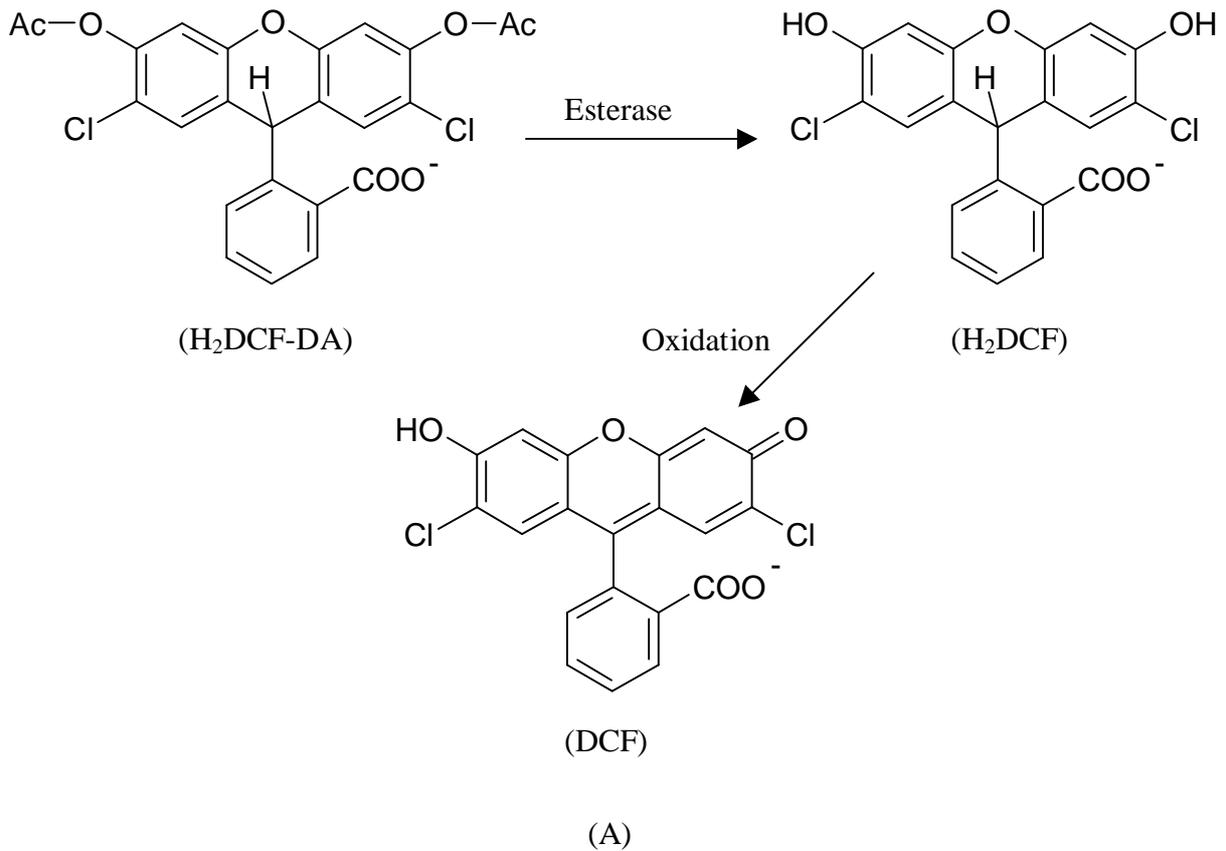
In den Abbildung A) und B) werden das Exitations- und Emissionsspektrum von PI gebunden an DNA und von FITC gekoppelt an Annexin in pH 8,0 Puffer gezeigt; Spektrum aus [47]. In C) und D) sind die Molekülstruktur von PI und FITC wiedergegeben.

### 2.3.2 Nachweis von intrazellulären ROS in Zellen

Mit dieser Methode werden ROS in den Zellen nachgewiesen. Der Farbstoff Dihydrodichlorfluoresceindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) wird von der Zelle aufgenommen und in der Zelle zu Dihydrodichlorfluorescein (H<sub>2</sub>DCF) gespalten. Dies reagiert mit ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff Dichlorfluorescein (DCF).

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubationszeit mit warmen PBS gewaschen, 1 ml warmes Medium M1 wurde zugefügt und anschließend wurde sie für 15 min mit 10 µl einer 1 mM H<sub>2</sub>DCF-DA Lösung inkubiert. Die Zellaufarbeitung erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. Die grüne Fluoreszenz des Dichlorfluorescein wurde mit einem 515 nm Bandpassfilter gemessen.

Abbildung 2.2: Spektrum von DCF und Struktur und intrazelluläre Reaktion von H<sub>2</sub>DCF-DA



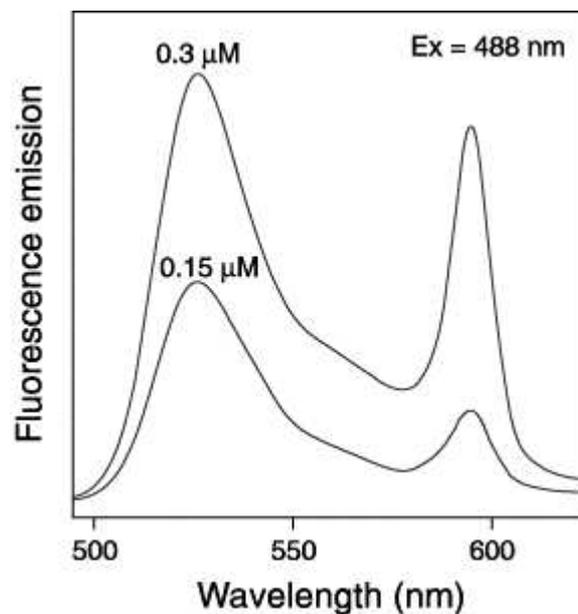
In (A) ist die Molekülstruktur und intrazelluläre Reaktion von (H<sub>2</sub>DCF-DA) dargestellt. (B) zeigt das Excitations- und Emissionsspektrum von 5-(and-6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein in pH 9,0 Puffer. Spektrum aus [47].

## 2.3.3 Messung des $\Delta\Psi_M$

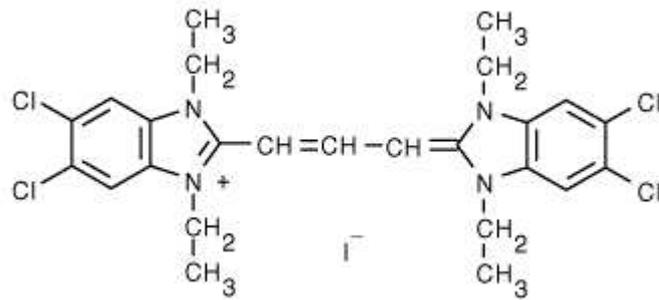
Mit diesem Fluoreszenzfarbstoff kann das  $\Delta\Psi_M$  der Zellen überprüft werden. Der Farbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid (JC-1) liegt in niedriger Konzentration als grün fluoreszierendes Monomer vor. Bei hohen Konzentrationen in wässriger Lösung oder hohen Potentialen bildet JC-1 rot fluoreszierende J-Aggregate. Bedingt durch das Membranpotential der Mitochondrien bilden sich dort rot fluoreszierende J-Aggregate. Wird eine Zelle apoptotisch wird das Membranpotential erniedrigt und die rote Fluoreszenz nimmt ab. Somit kann mit Hilfe von JC-1 die Veränderung des Membranpotential bestimmt werden.

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubationszeit mit warmen PBS gewaschen, 1 ml warmes Medium M1 wurde zugefügt und anschließend wurde sie für 15 min mit 10  $\mu$ l einer 1 mM JC-1 Lösung inkubiert. Die Zellaufarbeitung erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. Die grüne Fluoreszenz des JC-1 Monomers wurde mit einem 515 nm Bandpassfilter gemessen. Die rote Fluoreszenz der JC-1 Aggregate wurde mit einem 600 nm Bandpassfilter gemessen.

Abbildung 2.3: Spektrum und Struktur von JC-1



(A)



(B)

In A) sind die Emissionsspektren einer 0,15 $\mu$ M und eine 0,3  $\mu$ M JC-1 Lösung (50 mM Tris-HCl, pH 8,2, 1% DMSO) dargestellt; Zu sehen ist die Zunahme der roten Fluoreszenz, bedingt durch Bildung der J-Aggregate. Spektrum aus [47].

B) Struktur von JC-1.

## 2.4 Immunologischer Nachweis von Cytochrom-c

Hierbei sollte überprüft werden, ob während der Induktionsphase der Apoptose proapoptotische Faktoren wie Cytochrom-c ins Zytosol gelangten.

### 2.4.1 Zellaufarbeitung

Zwei 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit konfluenten PAEC wurden pro Bestimmung verwendet. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 1 ml Trypsinlösung vom Untergrund abgelöst. Zum Abstoppen wurde die Zellen in einem 1 ml kaltem Medium suspensiert und in ein 15 ml Falcon gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zellen wurden mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4°C wurde das Sediment in 500  $\mu$ l kaltem PBS resuspensiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde mit einer 1 ml Insulinspritze mit einem Nadeldurchmesser von 29 Gauge 2-3 mal aufgezogen. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 14.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Sediment wurden 500  $\mu$ l dest. H<sub>2</sub>O

hinzugegeben. Anschließend wurde der Proteingehalt beider Fraktionen bestimmt. Im Sediment befinden sich Zellmembranstücke, Mitochondrien und andere Zellorganellen. Der Überstand enthält die zytosolischen Proteine.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Proben erfolgte mit einer modifizierten Lowry-Reaktion. Einige Aminosäuren reduzieren in alkalischer Lösung Kupferionen aus der zweiwertigen Oxidationsstufe in die einwertige. Bei Annahme einer ausgeglichenen Aminosäure-Verteilung und mit Hilfe eines Standardproteins kann so die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden. Die Bicinchoninsäure verleiht dem Test erhöhte Sensitivität, da sie einen farbigen Komplex mit den einwertigen Kupferionen bildet.

Es wurden fertige Lösungen von Pierce benutzt und gemäß den Herstellerangaben verwandt. Von den Proteinproben wurden jeweils zwei Verdünnungen vermessen. 100µl Probe (geschätzte Proteinmenge weniger als 20µg) wurden mit 2 ml eines Gemisches aus 50 Teilen Bicinchoninsäure-Lösung (Lösung A) sowie einem Teil Kupfer-II-sulfat-Lösung (Lösung B) versetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 60°C inkubiert und in kaltem Wasser abgekühlt. Die Absorption wurde bei 540 nm mit einem Spektralphotometer bei 25°C gemessen. Die Proteinmengen der Proben wurden anhand einer zuvor ermittelten Kalibrierfunktion mit Standardlösungen von Rinderserumalbumin im Bereich 0 bis 100 µg ermittelt.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Jeweils 15 µg Proteine des Sediments und des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer und 1/10 Volumen der DTT-Lösung vermischt. Die Proben wurden 2-5 min in kochendem Wasser inkubiert. Zur Trennung der Proteinproben wurde ein 8-18 % Polyacrylamidgel verwendet, was auf eine horizontale auf 15°C gekühlte Elektrophoreseeinheit gelegt wurde. In einem Abstand von jeweils 0,5 cm wurden Filterpapierstücke mit einer Größe von 1 cm x 0,5 cm auf die Oberfläche des Sammelgels gelegt. Auf die Geloberfläche wurden die Kathoden- und Anodenpufferstreifen aufgelegt. Die Proteinproben wurden auf die Filterpapierstücke aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung von maximal 200 V und ein Stromfluss von 2 mA/cm Gelkantenlänge für 30 min angelegt. Danach wurden die Filterpapierstücke entfernt und der

Anodenpufferstreifen wurde auf die Position der Filterpapierstücke vorgelegt. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von maximal 600 V und ein Stromfluss von 2 mA/cm Gelkantenlänge bis die Bromphenolblau Front am Kathodenpufferstreifen angelangt war (ca 1,5 Stunden).

### 2.4.4 Western Blott

Der Transfer von Proteinen auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotting Apparatur. Auf die Anode wurden aufeinanderfolgend sechs in Anodenpuffer I, drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere sowie eine in Methanol aktivierte und dann in Anodenpuffer II equilibrierte PVDF-Membran gelegt. Nun folgte das Gel und neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Alle Filterpapiere und die PVDF-Membran hatten Gelgröße und wurden luftblasenfrei geschichtet. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche auf die PVDF-Membran transferiert. Dabei bewirkte die im Kathodenpuffer vorhandene 6-Aminohexansäure eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit der niedermolekularen Proteine, sodaß ein gleichmäßiger Transfer von Proteinen aller Molekulargewichte gewährleistet war (diskontinuierliches Puffersystem).

### 2.4.5 Antikörper Färbung

Die PVDF-Membran wurden nach dem Proteintransfer eine Stunde in Blockierlösung geschüttelt, um potentielle Bindungsstellen abzusättigen, an denen es zu einer unspezifischen Bindung von Antikörpern an das Membranmaterial kommen könnte. Dann wurde die Membran dreimal für 10 min mit dem Waschpuffer (TTBS) gewaschen. Danach wurden die Membran in Blockierlösung, in dem der ersten Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben wurde, über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach erneutem dreimaligem waschen á 10 min wurde die Membran in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, Dazu wurde der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min im Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion des zweiten Antikörpers wurden fertige Lösungen des Lumi-Light Western Blotting Kit von Roche gemäß den Herstellerangaben verwendet. Eine 1:1 Mischung der

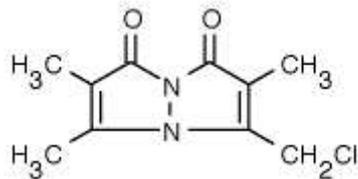
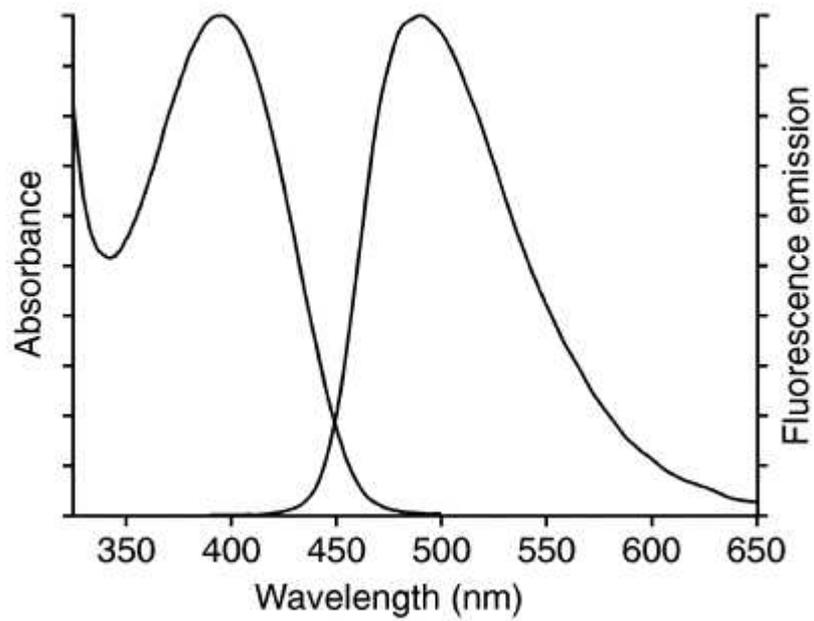
Peroxidlösung und der Entwicklungslösung wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Lmiimager registriert und mit der zugehörigen Software Lumianlayst ausgewertet.

## 2.5 Bestimmung des Glutathion Gehaltes der Zellen

Bei dieser Analyse wurden die Zellproben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monochlorbiman (MCB) inkubiert. Der Farbstoff MCB reagiert spezifisch mit der Thiolgruppe des Glutathions, zu einem fluoreszierenden Produkt. In Abbildung 2.4 ist einmal das Excitations- und Emissionsspektrum und die Strukturformel von MCB wiedergegeben.

Eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit konfluenten PAEC wurde für die Messung des GSH verwendet. Jede Messung wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 500 µl Lysispuffer für 1-2 min inkubiert. Die Zellen und Zelltrümer wurden mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach spülen mit 500 µl Lysispuffer wurde die lysierte Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubiert und zur Vervollständigung der Lyse mit einer 1 ml Insulin Spritze, mit einem Nadeldurchmesser von 29 Gauge, 2-3 mal aufgezogen. Anschließend wurde die Probe für 10 min mit 14.000 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung des GSH wurde zu 0,4 ml der Probe 590 µl Lysispuffer und 10 µl der 2 mM MCB-Lösung gegeben. Die Proben wurden mit der MCB-Lösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Auf einer schwarzen undurchsichtigen 96 Loch-Fluoreszenzmikrotiterplatte wurden jeweils zweimal 200 µl der Proben aufgetragen. Auf jeder Platte wurde als interner Standard eine Glutathionstandartreihe von 0 bis 0,1 mM mitaufgetragen. Die Platte wurde sofort an einem Fluoreszenzmikrotiterplattenreader vermessen. Die Messungen erfolgten bei Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm bei Raumtemperatur. Abbildung 2.4: Spektrum von MCB gekoppelt an GSH, und Struktur von MCB

Abbildung 2.4 Excitations- und Emissionsspektrum und Strukturformel von MCB



A) Excitation- und Emissionsspektrum von MCB gekoppelt an Glutathion (GSH) in pH 8,0 Puffer; Spektrum aus [47]. C) Struktur von MCB.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung der Apoptose und Nekrose

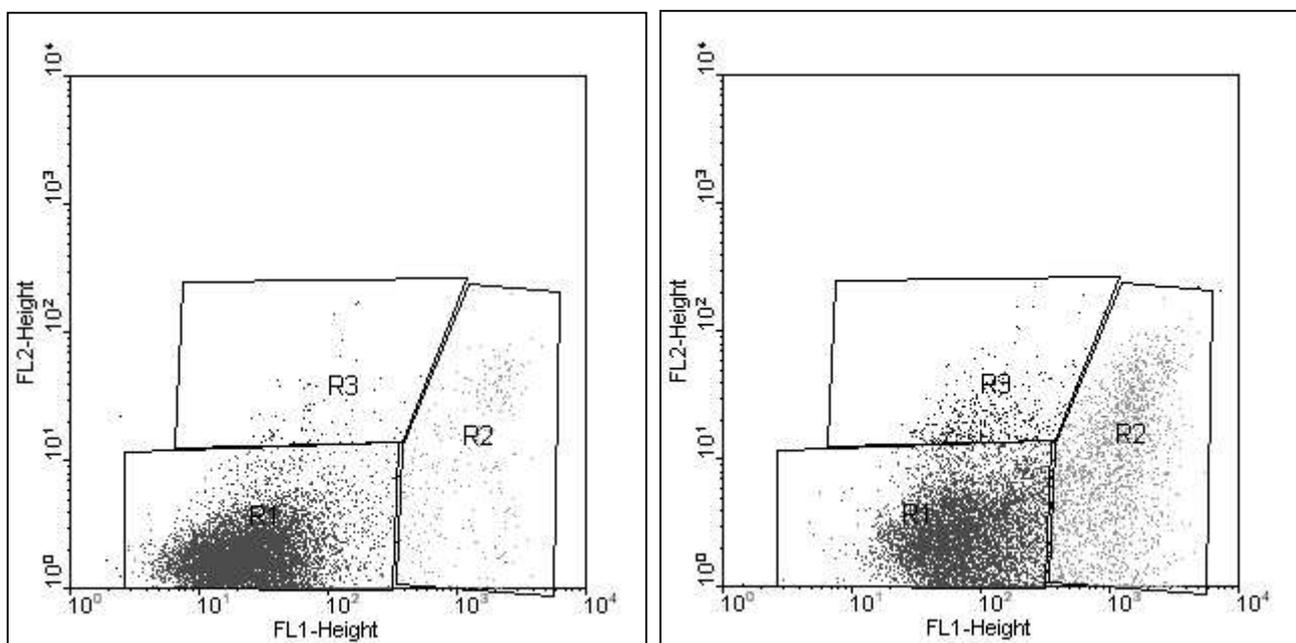
Da Apoptose und Nekrose zwei Endpunkte eines Vorganges darstellen und zum Teil ähnliche Merkmale aufzeigen wie z.B. Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  oder Fragmentierung des Zellkerns, ist es notwendig apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Annexin-V-FITC und Propidiumiodid können apoptotische von nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Zur gleichzeitigen Bestimmung der Nekrose und der Apoptose werden die Zellen mit zwei Farbstoffen gefärbt. Zur spezifischen Färbung der apoptotischen Zellen wird der Fluoreszenzfarbstoff Annexin-V-FITC verwendet. Annexin-V ist ein phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin. Das Annexin-V wird mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff FITC markiert, sodaß Annexin-V-FITC gefärbte Zellen grün fluoreszieren. Die nekrotischen Zellen werden spezifisch mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PI gefärbt. PI ist ein DNA-Farbstoff, der durch die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen eindringt und in der DNA eingelagert zu einer roten Fluoreszenz der Zellen führt. Da durch die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen auch Annexin-V-FITC eindringen kann, bindet Annexin-V-FITC im Verlauf der Nekrose auch an den innen liegenden PS und färbt die Zellen zusätzlich grün. Ähnliches kann in vitro auch bei der Apoptose eintreten, wenn es zum Zerreißen der Zellmembran der apoptotischen Körperchen kommt (sekundär Nekrose) [25]. Deswegen kommt es auch in einer späteren Phase der Apoptose zu doppelt gefärbten Zellen. Daher ist vor allem der Verlauf der Zellfärbung zur Interpretation der Daten wichtig.

Da von der Induktion der Apoptose bis zur Exposition des Phosphatidylserins auf der äußeren Membranseite in der Regel drei bis vier Stunden vergehen, wurden erst nach diesem Zeitraum Messungen durchgeführt.

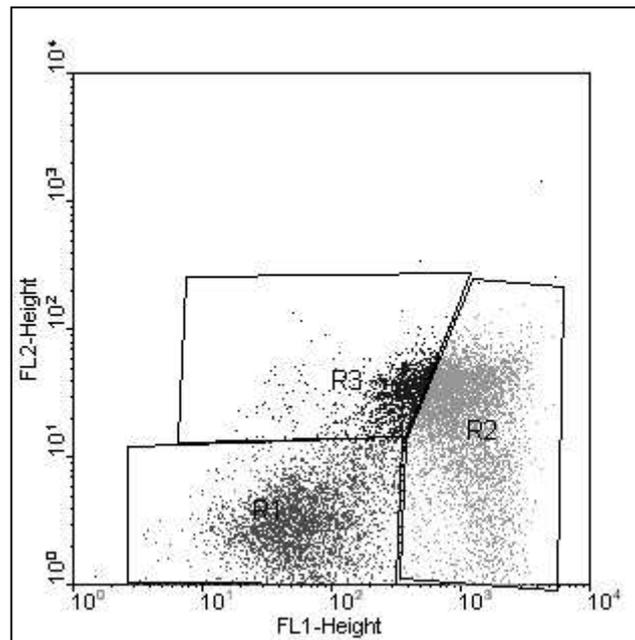
Zur Auswertung der Messergebnisse wurde das Punktediagramm der roten und grünen relativen Fluoreszenz benutzt. In Abbildung 3.1 ist ein Punktediagramm einer Kontrollprobe und zweier mit t-BHP inkubierten Probe wiedergegeben. Im Punktediagramm (A) der Kontrollprobe liegt nur eine Zellpopulation vor, die eine niedrige grüne und rote relative Fluoreszenz besitzt; Fast alle Zellen befinden sich in der Region R1. Im Gegensatz dazu ist im Punktediagramm (B) der Probe, die vier Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert wurde, eine zusätzliche Zellpopulation mit hoher grüner relativer Fluoreszenz zu erkennen, die in Region R2 die apoptotischen mit Annexin-V-FITC markierten Zellen darstellt. Im Punktediagramm (C) einer Probe, die für acht Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert wurde, bildete sich eine weitere Zellpopulation die erhöhte rote relative Fluoreszenz aufweist. Diese in der Region R3 vorliegende Zellepopulation sind nekrotische mit PI gefärbten Zellen.

Abbildung 3.1: Punktediagramm der roten und grünen relativen Fluoreszenz bei Inkubation mit den Fluoreszenzfarbstoffen PI und Annexin-V-FITC



(A) Kontrollprobe

(B) 50  $\mu\text{M}$  t-BHP 4 h



(C) 100 µM t-BHP 8 h

Im Punktediagramm (A) wird die grüne relative Fluoreszenz (FL1-Height) und die rote relative Fluoreszenz (FL2-Height) einer Kontrollprobe gezeigt. Ca. 90 % der Zellen liegen im Bereich der Region R1 (vitalen Zellen). Das Punktediagramm (B) zeigt Zellen, die vier Stunden mit 50 µM t-BHP inkubiert wurden. Es lagen ca. 20 % der Zellen in der Region R2 der apoptotischen Zellen vor. Das Punktediagramm (C) zeigt Zellen die acht Stunden mit 100 µM t-BHP inkubiert wurden. Hierbei lagen ca. 50 % der Zellen in der Region R2 (apoptotische Zellen) und ca. 20 % der Zellen in der Region R3 (nekrotischen Zellen).

### 3.1.1 In welchen Maße induziert t-BHP Apoptose und Nekrose?

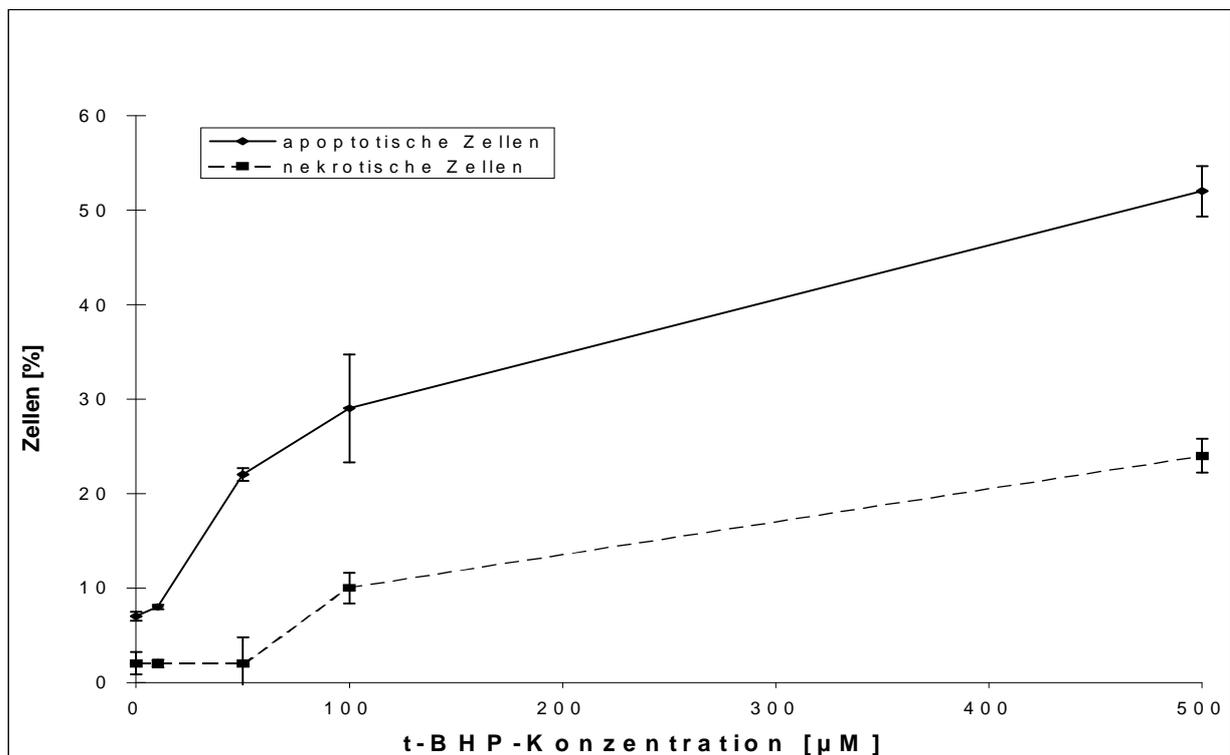
#### Bestimmung der Konzentrationsbereiche der Apoptose und Nekrose:

Um festzustellen, in welchen Konzentrationsbereichen Apoptose und Nekrose induziert wird, wurden PAEC mit t-BHP-Konzentrationen von 10, 50, 100 und 500 µM für vier Stunden inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer vermessen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Bei allen t-BHP-Inkubationen dieser Arbeit mit einer Inkubationszeit von vier, sechs und acht Stunden wurden die Zellen nur eine Stunde mit t-BHP inkubiert, anschließend wurde das t-BHP haltige FCS freie Medium M2 gewechselt, die Zellen gewaschen und für weitere drei, fünf und sieben Stunden mit Medium M1 inkubiert.

Bei einer Inkubationszeit von 15 min, 30 min und einer Stunde wurden die Zellen die ganze Inkubationszeit über mit t-BHP haltige FCS freie Medium M2 inkubiert.

Im Diagramm der Abbildung 3.2 wird die Zunahme der Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an t-BHP nach einer vier stündigen Inkubation wiedergegeben. Während die niedrigste t-BHP-Konzentration keinen Einfluß auf die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe hatte, wurde bei höheren Konzentrationen eine dosisabhängige Zunahme bis auf 52 % beobachtet. Die Anzahl der nekrotischen Zellen nahm nur bei t-BHP-Konzentrationen  $> 100 \mu\text{M}$  zu. ( $10 \% \pm 1,6$  und  $24 \% \pm 1,8$  100 und  $500 \mu\text{M}$  t-BHP). Aufgrund des hohen Anteils an nekrotischen Zellen bei Inkubationen mit  $500 \mu\text{M}$  t-BHP wurden derartige hohe Konzentrationen in der Folge nicht mehr eingesetzt.

Abbildung 3.2: Zunahme der Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP für vier Stunden.



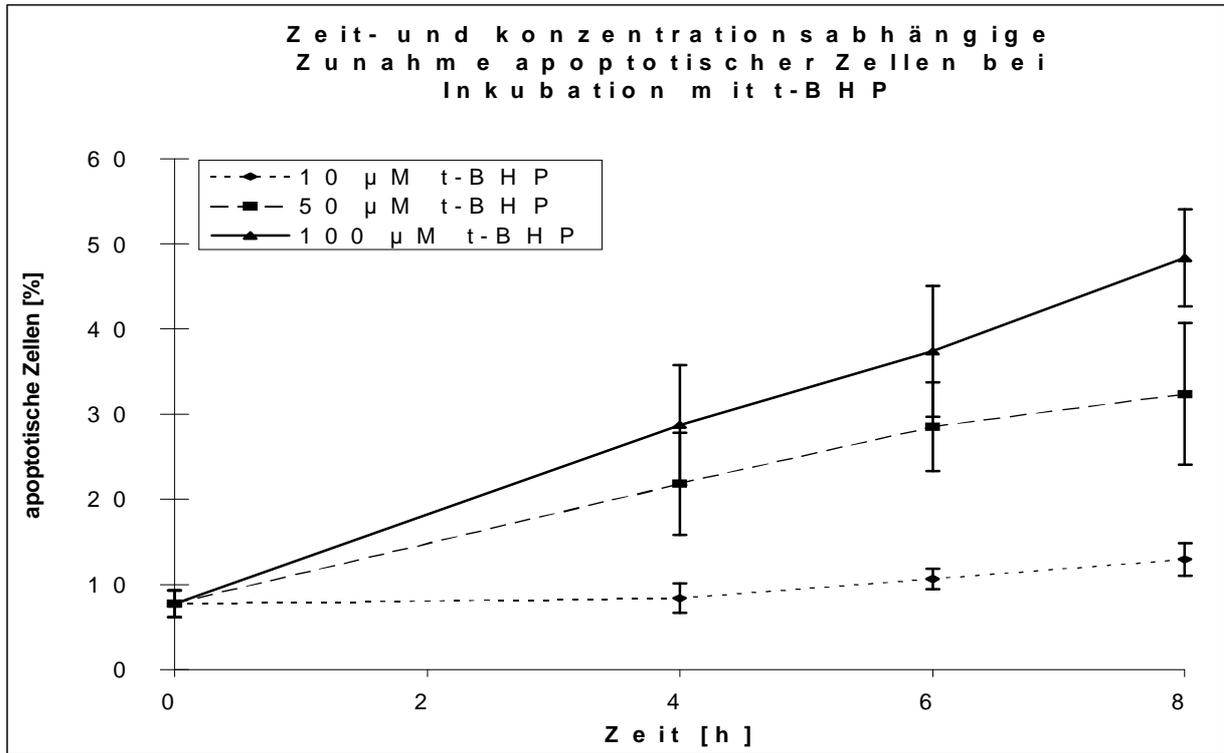
Die in dem Diagrammen dargestellten Werte wurden bei der Inkubation von PAEC mit 10, 50, 100 und  $500 \mu\text{M}$  t-BHP für vier Stunden erhalten und zeigen die konzentrationsabhängige Zunahme der Anzahl der apoptotischen und der nekrotischen Zellen. Daten siehe Anhang Tabelle 3.1.

### Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit:

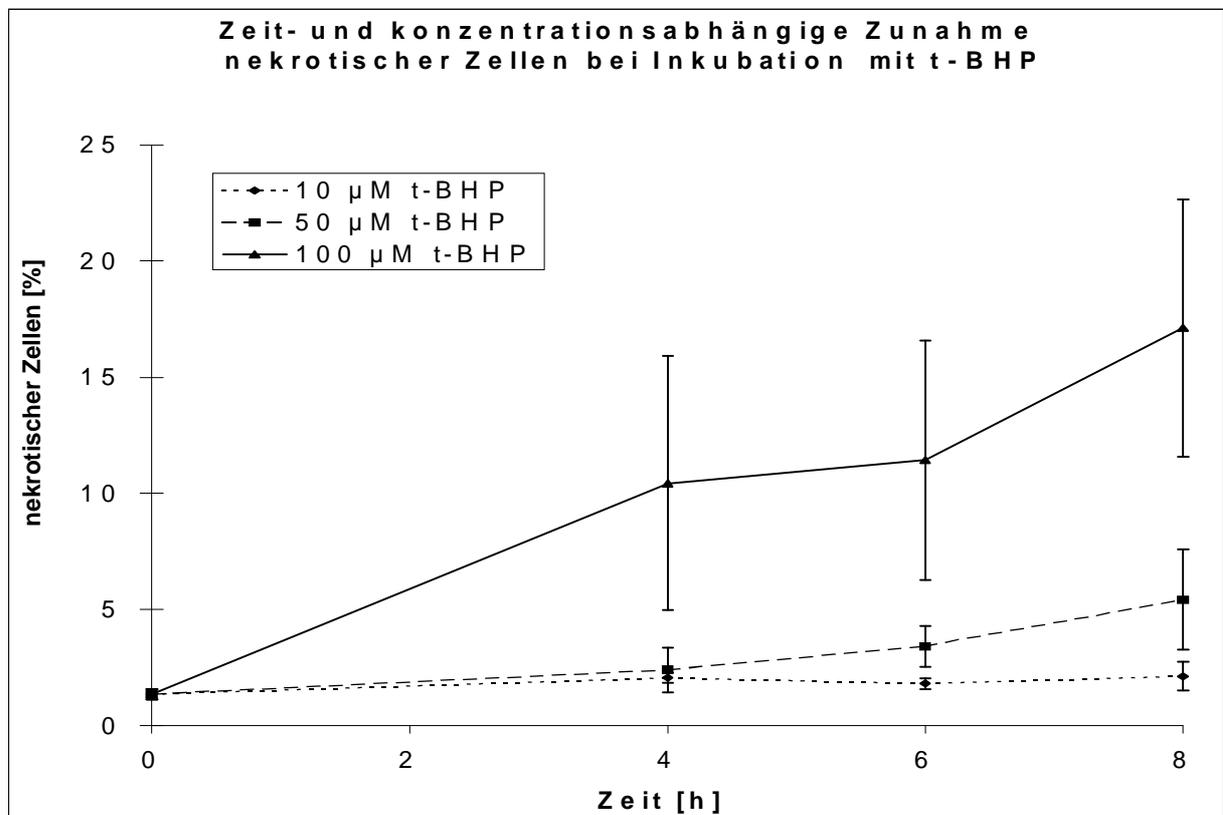
Ziel dieser Untersuchungen war es, die zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen durch oxidativen Streß zu bestimmen, dazu wurden PAEC mit t-BHP-Konzentrationen von 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP für vier, sechs und acht Stunden inkubiert.

In Abbildung 3.3 wird die zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen bei Inkubation mit 10, 50, und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP gezeigt. Im Diagramm (A) wird die Zunahme der Anzahl an apoptotischen Zellen dargestellt. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  wurde nach acht Stunden nur eine leichte Zunahme verzeichnet. Hingegen wurden bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP nach acht Stunden schon  $32\% \pm 8,3$  bzw  $48\% \pm 5,7$  der Zellen apoptotisch. Das Diagramm (B) zeigt die Veränderung der Anzahl nekrotischer Zellen. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP tratt keine Veränderung ein. Wurden die Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert nahm die Anzahl der nekrotischen Zellen innerhalb von acht Stunden von  $1\% \pm 0,2$  auf  $5\% \pm 2,2$  leicht zu. Bei Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP nahm die Anzahl nekrotischen Zellen auf  $17\% \pm 5,5$  zu. Diagramm (C) zeigt den Einfluß der t-BHP-Konzentration und der Inkubationszeit auf die Induktion der Apoptose. Berechnet wurden die Effekte mit Hilfe der Multiplen-Linearen-Regression (MLR). Dabei hat die Zeit mit einem B-Koeffizienten von 3,3 einen um den Faktor zehn stärkeren Einfluß auf die Induktion der Apoptose als die Konzentration mit einem B-Koeffizienten von 0,3.

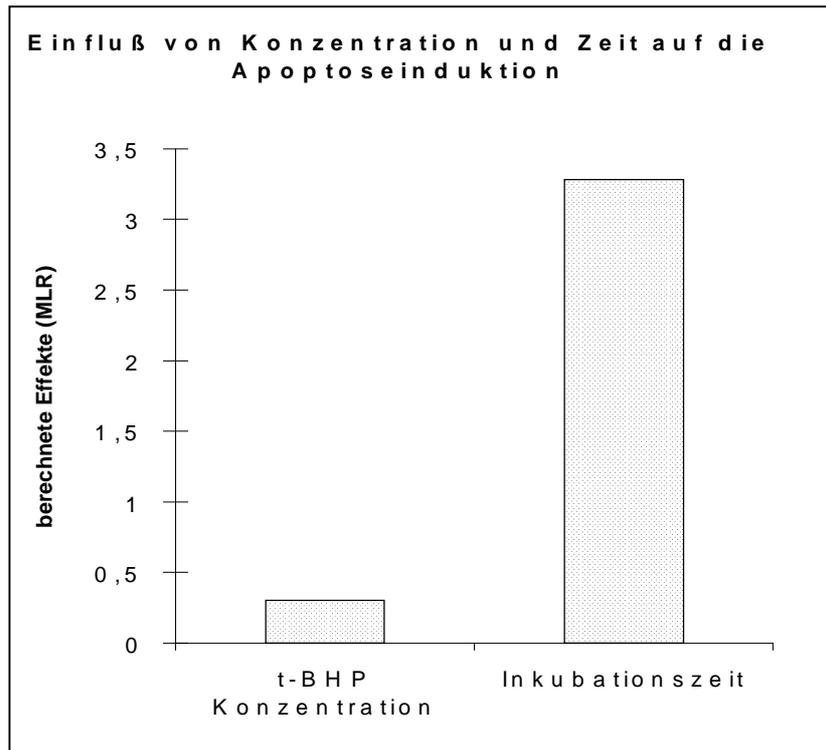
Abbildung 3.3: Zunahme der Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP



(A)



(B)



(C)

Die in den Diagrammen (A), (B) und (C) dargestellten Werte wurden nach Inkubation von PAEC mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP für vier, sechs und acht Stunden erhalten. Die im Diagramm (A) gezeigte Anzahl der apoptotischen Zellen nahm zeit- und konzentrationsabhängig zu. Diagramm (B) zeigt die Anzahl der nekrotischen Zellen. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP veränderte sich die Anzahl der Zellen nicht, bei 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP wurde eine leichte Zunahme beobachtet. Das Diagramm (C) zeigt den Einfluß nach MLR, welche die Inkubationszeit und die t-BHP-Konzentration auf die Induktion der Apoptose ausüben. Der Einfluß der Zeit ist um den Faktor zehn größer als der Einfluß der Konzentration.

Daten siehe Anhang Tabelle 3.2-3.4.

### 3.1.2 Hyperglykämie und Apoptose

Um den Einfluß von Hyperglykämie auf die Induktion der Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen über den Zeitraum von zwei, drei oder sieben Tagen mit 30 mM Glucose inkubiert. Dabei konnte weder eine Zunahme der Anzahl an apoptotischen noch an nekrotischen Zellen beobachtet werden.

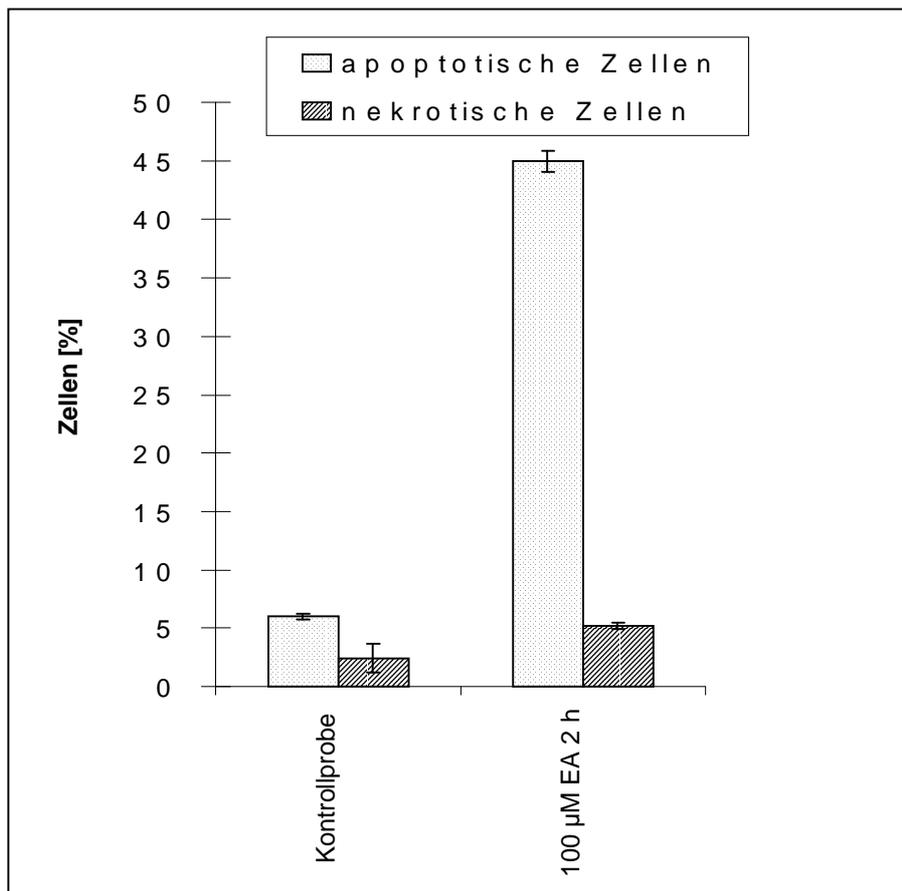
Daten siehe Anhang Tabelle 3.5.

3.1.3 Induziert die Oxidation des GSH-Pools Apoptose?

Um die Hypothese zu stärken, daß die Oxidation des GSH-Pools zur Induktion der Apoptose führt, wurden Endothelzellen für zwei Stunden mit 100 µM EA inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen mit dem Durchflußzytometer bestimmt. EA wird enzymatisch von der Glutathion-S-transferase an GSH gekoppelt und entleert sowohl den mitochondrialen als auch den zytoplasmatischen GSH-Pool [48].

Die Anzahl der apoptotischen Zellen erhöhte sich von 6 % ± 0,2 auf 45 % ± 0,6. Die Anzahl der nekrotischen Zellen veränderte sich hingegen kaum. In der Abbildung 3.4 sind die Daten der apoptotischen und nekrotischen Zellen wiedergegeben.

Abbildung 3.4: Zunahme der Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen bei Inkubation mit 100 µM EA

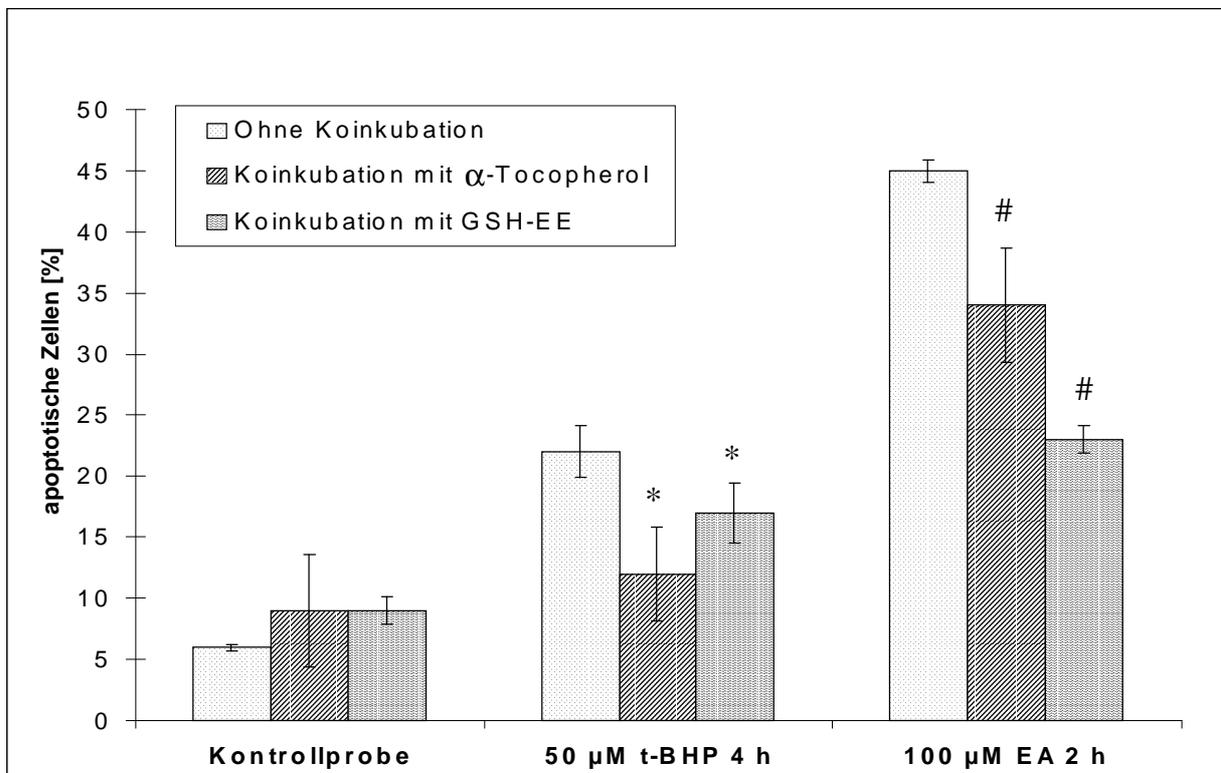


Die im Balkendiagramm wiedergegebenen Werte wurden bei Inkubation von PAEC mit 100 µM EA für zwei Stunden erhalten. Es wurde eine starke Zunahme der apoptotischen Zellen beobachtet, wohingegen die Anzahl der nekrotischen Zellen sich nicht wesentlich veränderte. Daten siehe Anhang Tabelle 3.6.

3.1.4 Die protektive Wirkung von Radikalfänger

Um zu überprüfen, ob ein Schutz vor oxidativem Streß durch die Radikalfänger  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE auch zu einer verringerten Induktion der Apoptose führt, wurden die PAEC für 48 Stunden mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol und für 24 Stunden mit 1 mM GSH-EE vorinkubiert. Anschließend wurden sie für vier Stunden mit 50  $\mu$ M t-BHP oder für zwei Stunden mit 100  $\mu$ M EA inkubiert. Die Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE verringerte die Anzahl der apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP um 10 %  $\pm$  3,1 bzw 6 %  $\pm$  2,6. Bei der Stimulation der Apoptose durch EA war die Anzahl der apoptotischen Zellen nach Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE um 11 %  $\pm$  5,7 bzw 22 %  $\pm$  1,1 geringer. Auf die Änderung der nekrotischen Zellen hatten die Vorinkubationen kaum Einfluß. Wurden Zellen zur Kontrolle nur mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE inkubiert, war keine große Veränderung der Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen zu beobachten.

Abbildung 3.5: Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei Inkubation mit t-BHP und EA



Um die in den Balkendiagramm dargestellten Werte zu erhalten, wurden PAEC für 48 Stunden mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol und für 24 Stunden mit 1 mM GSH-EE vorinkubiert. Anschließend wurden sie für vier Stunden mit 50  $\mu$ M t-BHP oder zwei Stunden mit 100  $\mu$ M EA inkubiert. Dabei zeigte sich, daß bei Inkubation mit t-BHP oder EA durch Vorinkubation

mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH eine geringere Anzahl an Zellen apoptotisch wurden. Die Inkubation der Kontrollzellen nur mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE verursachte keine großen Veränderungen. \* = Unterschied ( $p < 0,05$ ) 50  $\mu$ M t-BHP 4 h vs. 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol 48 h, 50  $\mu$ M t-BHP 4 h; # = Unterschied ( $p < 0,05$ ) 100  $\mu$ M EA 2 h vs. 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol 48 h, 100  $\mu$ M EA 2 h, bzw. 1 mM GSH-EE 24 h, 100  $\mu$ M EA 2 h  
Daten siehe Anhang Tabelle 3.7.

### 3.2 Untersuchung der ROS-Bildung in Endothelzellen

Die Veränderungen der intrazellulären ROS-Konzentration ist sowohl bei der Induktion als auch während der Apoptose ein wichtiger Faktor. Daher sollte durch diese Untersuchungen festgestellt werden, welche Veränderungen der intrazellulären ROS-Konzentration durch oxidativen Streß verursacht wird und welche Veränderungen der ROS-Konzentration während der Apoptose auftreten. Dazu wurden PAEC mit t-BHP, Glucose und EA inkubiert und anschließend wurde die intrazelluläre ROS-Konzentration bestimmt. Weiterhin wurde der Zellschutz durch die antioxidative Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE untersucht.

Zur Detektion der intrazellulären ROS wird der Fluoreszenzfarbstoff H<sub>2</sub>DCF-DA benutzt. Dieser nichtionische und unpolare Farbstoff kann die Zellmembran queren und wird in der Zelle enzymatisch von intrazellulären Esterasen zu HDCF hydrolysiert [91-93], sodaß er nicht mehr aus der Zelle austritt und in den Zellen mit Radikalen zum fluoreszierenden DCF reagieren kann. Somit kann über den Anstieg der Fluoreszenz die Bildung von intrazellulärem ROS qualitativ bestimmt werden [91]. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde der geometrische Mittelwert der relativen Fluoreszenz verwendet. Darüberhinaus wurden die Bildung einer weiteren Zellpopulation bei Inkubation mit t-BHP, durch Betrachtung der Histogramme näher charakterisiert.

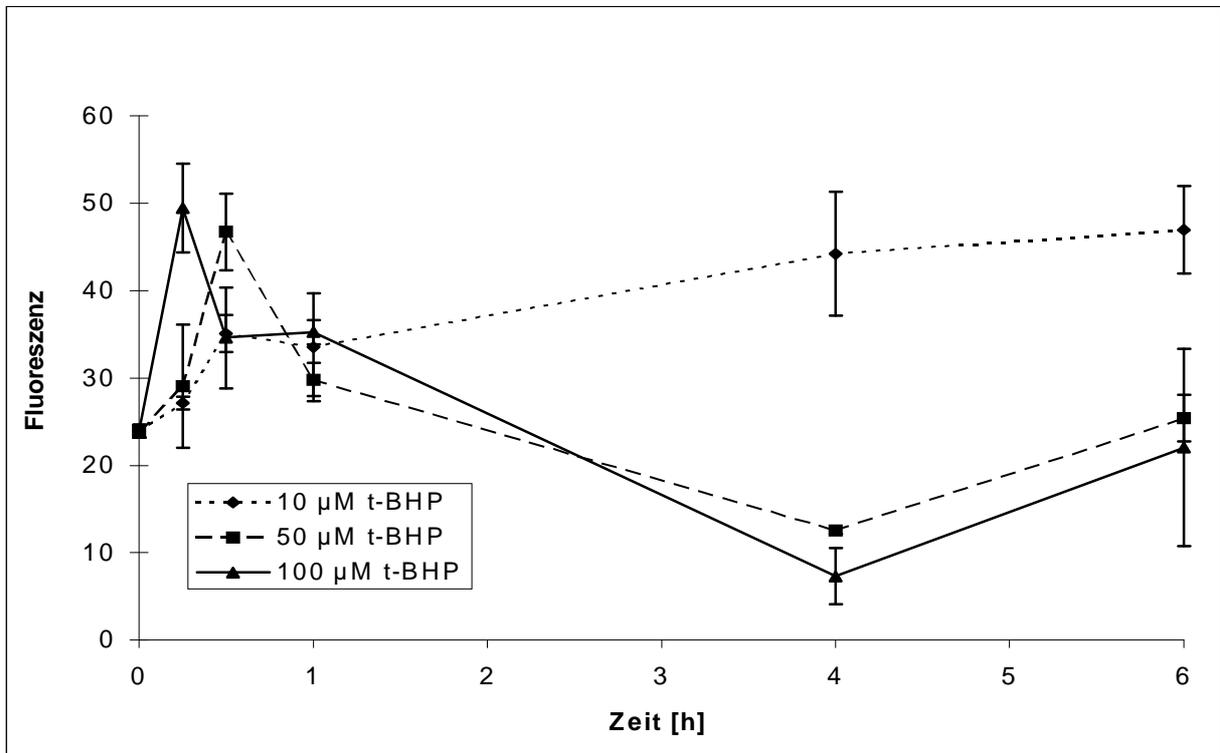
### 3.2.1 Bildung von ROS bei Inkubation mit t-BHP

Durch diese Untersuchungen sollten die Veränderungen der intrazellulären ROS-Konzentration während der durch oxidativen Streß induzierten Apoptose bestimmt werden. Dazu wurden PAEC wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben mit t-BHP Konzentrationen von 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  für jeweils 15 min, 30 min, eine, vier und sechs Stunden inkubiert und anschließend die ROS-Konzentration am Durchflußzytometer bestimmt.

Abbildung 3.6 zeigt den Zeitverlauf der Fluoreszenzveränderung bei Inkubation mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP stieg der Mittelwert der relativen Fluoreszenz in der ersten Stunde stark an und nahm dann nach vier und sechs Stunden auf hohem Niveau noch etwas zu, sodaß das Maximum ( $46,9 \pm 4,99$ ) erst nach sechs Stunden erreicht wurde.

Werden Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert stieg der Mittelwert der relativen Fluoreszenz steil an und erreichte nach 30 min das Maximum ( $46,7 \text{ AU} \pm 4,42$ ) anschließend sankt er auf das Minimum ( $12,5 \text{ AU} \pm 0,38$ ) nach 4 Stunden um nach sechs Stunden wieder auf fast den Anfangswert zu steigen. Die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP ließ den Mittelwert der relativen Fluoreszenz steil ansteigen und erreichte schon nach 15 min das Maximum ( $49,4 \text{ AU} \pm 5,07$ ), anschließend sankt er auf das Minimum ( $7,4 \text{ AU} \pm 3,24$ ) nach 4 Stunden. Danach stieg er an, bleibt aber unter dem vergleichbaren Wert bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP.

Abbildung 3.6: Zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung der Fluoreszenz bei Inkubation von PAEC mit t-BHP.



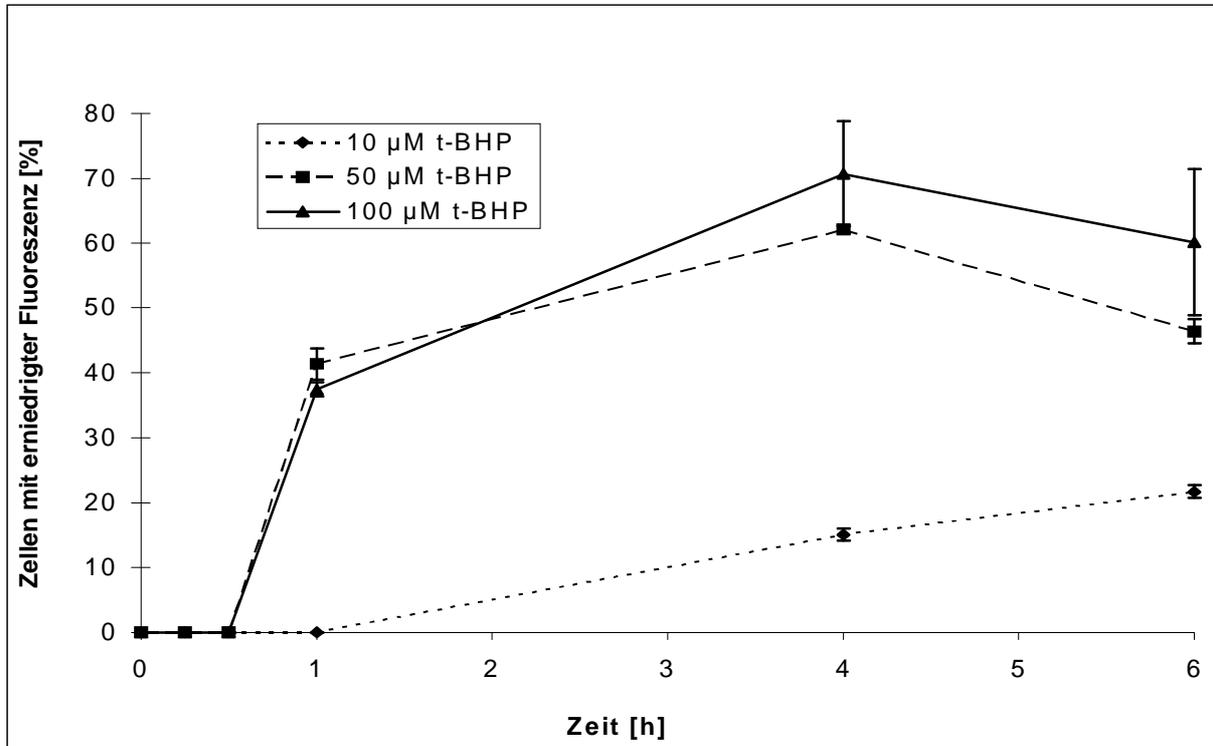
Die im Diagramme dargestellten Werte wurden bei Inkubation von PAEC mit 10, 50 und 100 µM t-BHP für 15 min ,30 min, einer, vier, und sechs Stunden erhalten. Es wurde der Mittelwert der relativen Fluoreszenz gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Inkubation mit 10 µM t-BHP führte zu einer stetigen Zunahme der Fluoreszenz, die nach sechs Stunden mit 46,9 ihr Maximum erreichte. Bei Inkubation mit 50 µM t-BHP wurde das Maximum mit 46,7 nach 30 min erreicht, anschließend nahm der Mittelwert der relativen Fluoreszenz ab, stieg aber nach sechs Stunden nochmals an. Die Inkubation mit 100 µM zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die der 50 µM Inkubation, wies aber schon nach 15 min das Maximum mit 49,5 auf.

Daten siehe Anhang, Tabelle 3.8.

Der Grund für die starke Abnahme der Fluoreszenz bei Inkubation der Zellen mit 50 und 100 µM t-BHP war, daß sich nach einer Stunde eine zweite Zellpopulation mit stark erniedrigter Fluoreszenz bildete, die den Mittelwert der Fluoreszenz stark absinken ließ. In Abbildung 3.7 wird die Zunahme der Anzahl an Zellen mit niedriger Fluoreszenzintensität in Prozent gezeigt. Wurden PAEC mit 50 und 100 µM t-BHP inkubiert, bildet sich die zweite Zellpopulation nach einer Stunde und erreichte ein Maximum nach vier Stunden von 62 % ± 0,7 50 µM und 71 % ± 8,1 100 µM t-BHP, anschließend fiel sie nach sechsständiger Inkubation auf 46 % ± 1,9 bzw 60 % ± 11,3 der Zellen ab. Bei Inkubation mit 10 µM wurde eine leichte Zunahme der Anzahl an Zellen mit erniedrigter Fluoreszenz erst nach vier Stunden beobachtet, die auch

nach sechs Stunden mit  $22\% \pm 1,0$  nicht das Ausmaß erlangte wie bei Inkubation von Zellen mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP.

Abbildung 3.7: Zunahme der Anzahl an Zellen mit erniedrigter Fluoreszenz.



Im Diagramm wird die Zunahme der Anzahl an Zellen mit erniedrigter Fluoreszenz dargestellt. Bei Inkubation von PAEC mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP bildete sich nach einer Stunde eine zweite Zellpopulation mit stark erniedrigter Fluoreszenz, die nach vier Stunden ein Maximum von 62 % bzw 71 % der Anzahl an Zellen hatte. Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP führte erst nach vier Stunden zu einer leichten Zunahme der Zellen mit erniedrigter Fluoreszenz.

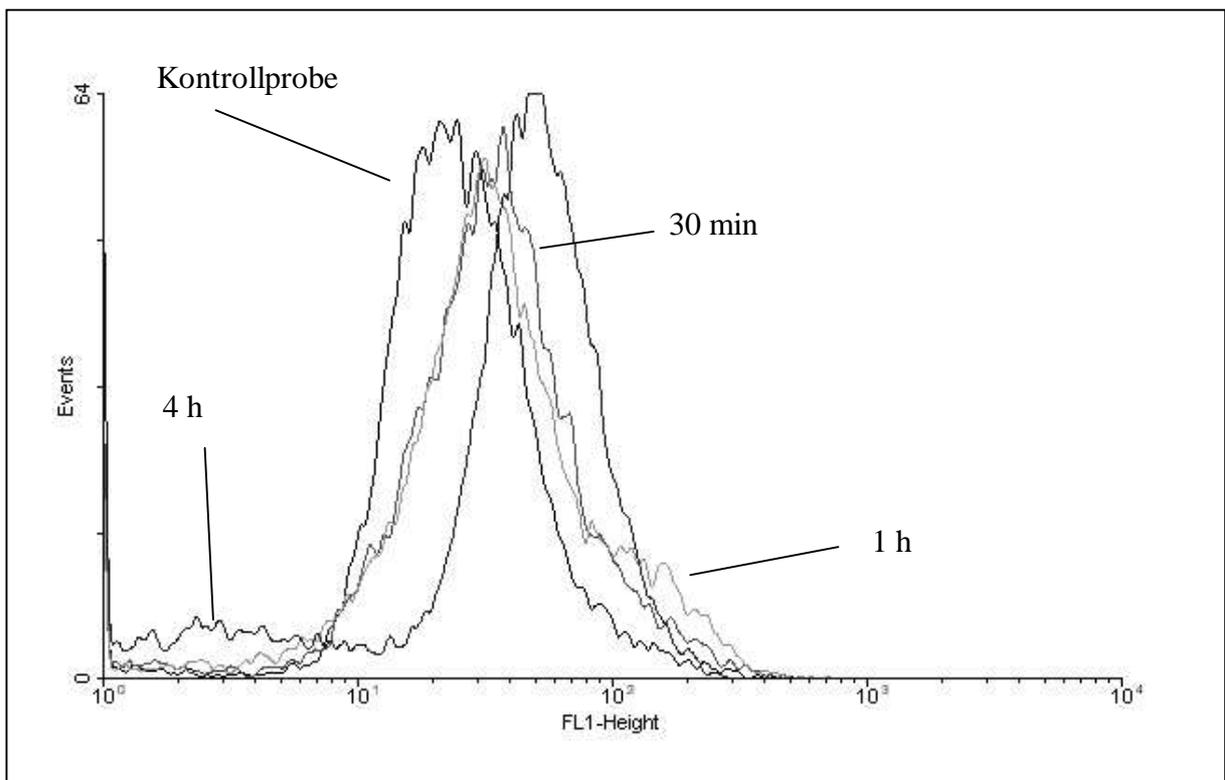
Daten siehe Anhang, Tabelle 3.9.

Um die einzelnen Stadien der Fluoreszenzveränderungen besser zu veranschaulichen sind in Abbildung 3.8 (A), (B) und (C) Histogramme der unterschiedlichen Inkubationskonzentrationen bei drei verschiedenen Zeiten (30 min [rot], eine [grün] und vier Stunden [blau]) mit der Kontrollprobe [schwarz] wiedergegeben.

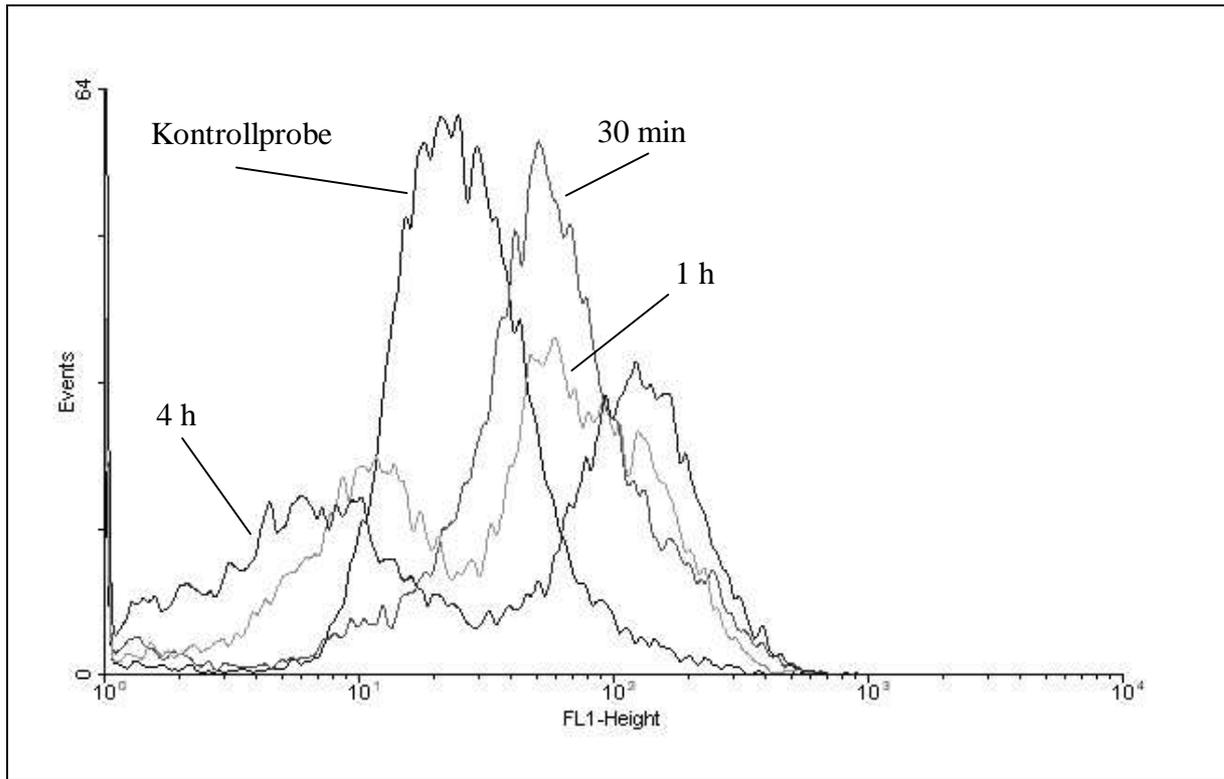
Die erste Abbildung 3.8 (A) zeigt, daß bei Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP nach 30 min eine leichte Zunahme der relativen Fluoreszenz zu beobachten war. Nach einer Stunde veränderte sich die Fluoreszenz kaum. Im Gegensatz zu den beiden anderen

Inkubationskonzentrationen konnte die Bildung einer weiteren Zellpopulation mit erniedrigter Fluoreszenz erst nach vier Stunden und in deutlich geringerem Maße beobachtet werden. Auch Zellen mit erhöhter Fluoreszenz erreichten nach vier Stunden nicht das Niveau der Zellen, die mit 50 oder 100  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert wurden. In den Abbildungen 3.8 (B) und (C), sind die Histogramme der 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP Inkubationen dargestellt. Beide Inkubationsverläufe sind einander sehr ähnlich. Nach 30 min hatten die Zellen ein Fluoreszenzniveau erreicht, das bei Inkubation mit 10 $\mu\text{M}$  t-BHP erst nach vier Stunden erreicht wurde. Nach einer Stunde bildete sich eine Zellpopulation mit erniedrigter Fluoreszenz aus. Zusätzlich erreichten einige Zellen nach einer Stunde ein Stadium mit noch höherer Fluoreszenz. Im weiteren Inkubationsverlauf lagen die Zellen entweder in der Zellpopulation mit erniedrigter Fluoreszenz oder in der Zellpopulation mit stark erhöhter Fluoreszenz vor.

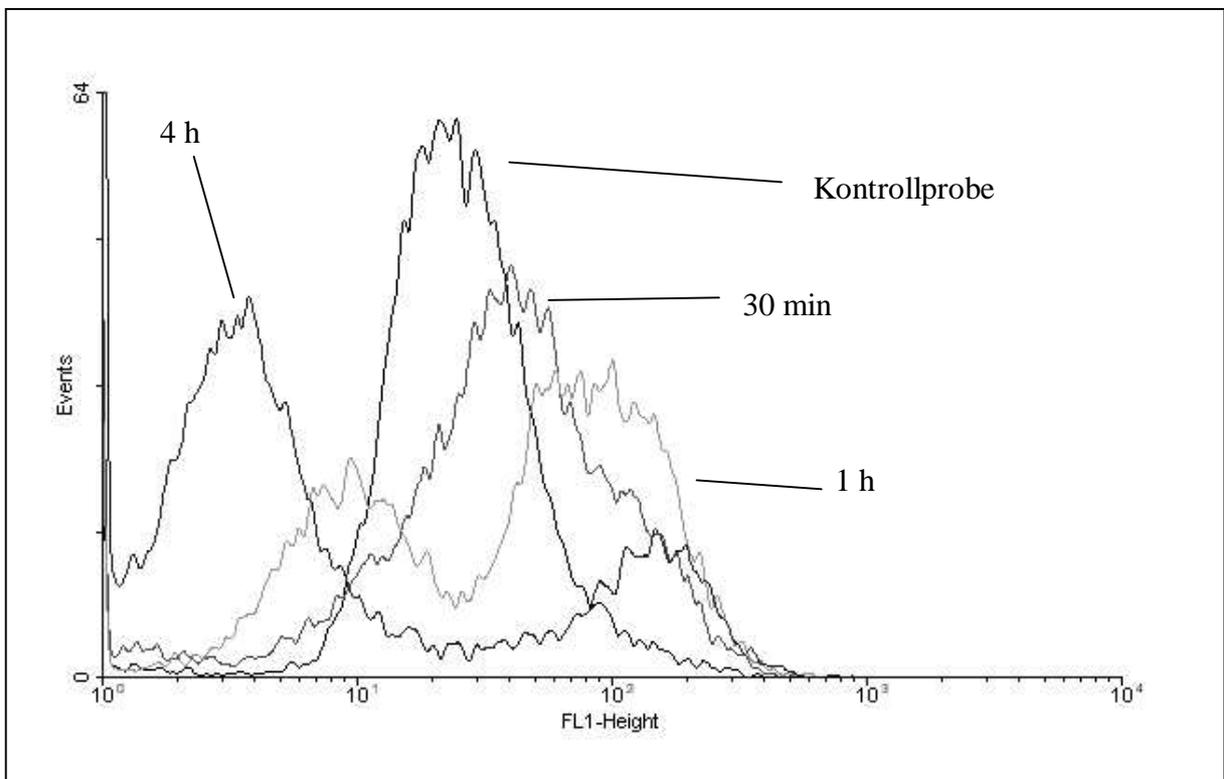
Abbildung 3.8: Überinandergelagerte Histogramme von t-BHP Inkubationen



(A) Kontrollprobe, 10  $\mu\text{M}$  t-BHP 30 min, eine und vier Stunden.



(B) Kontrollprobe, 50  $\mu\text{M}$  t-BHP 30 min, eine und vier Stunden.



(C) Kontrollprobe, 100  $\mu\text{M}$  t-BHP 30 min, eine und vier Stunden.

Um die Fluoreszenzveränderungen durch Inkubation mit t-BHP zu veranschaulichen, wurden verschiedene Histogramme der grünen relativen Fluoreszenz (FL1-Height) übereinandergelegt. Für die übereinandergelegten Histogramme (A), (B) und (C) wurde ein Histogramm einer Kontrollprobe (schwarz) und jeweils drei Histogramme aus der Inkubation von PAEC mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP nach 30 min (rot), eine Stunde (grün) und vier Stunden (blau) verwendet. In den Histogrammen (A) wurde nach 30 min eine leichte Zunahme der relativen Fluoreszenz beobachtet, die sich nach einer Stunde kaum veränderte. Nach vier Stunden war die Zellpopulation mit erniedrigter relativer Fluoreszenz nur wenig ausgebildet. In den Histogramme (B) und (C) werden die Ergebnisse der 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP-Inkubationen gezeigt. Die Zellen erreichten nach 30 min Inkubation ein Fluoreszenzniveau, das bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP erst nach vier Stunden erreicht wurde. Nach einstündiger Inkubation war eine Zellpopulation mit erniedrigter relativer Fluoreszenz zu erkennen. Zusätzlich wiesen einige Zellen eine deutlich erhöhte relative Fluoreszenz auf. Nach vier Stunden lagen die Zellen entweder in der Zellpopulation mit erniedrigter Fluoreszenz oder in der mit stark erhöhter Fluoreszenz.

### 3.2.2 Auswirkung von Hyperglykämie auf die ROS-Konzentration

Um die Auswirkung von Hyperglykämie auf die intrazelluläre ROS-Konzentration zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit 30 mM Glucose inkubiert. Die Veränderung der ROS-Konzentration wurde nach 15, 30 min einer, zwei, vier, sechs und 14 Stunden bestimmt. Dabei konnte lediglich eine nicht signifikant Zunahme der relativen Fluoreszenz festgestellt werden.

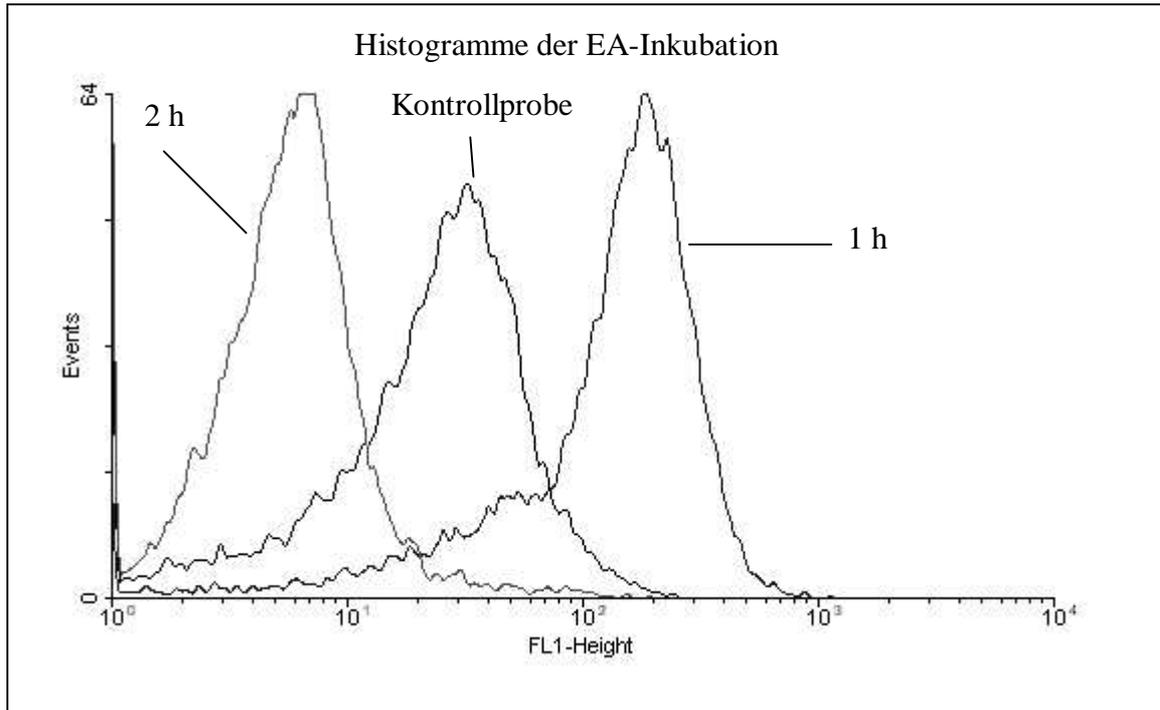
Daten siehe Anhang Tabelle 3.10.

### 3.2.3 Veränderung der ROS-Konzentration bei Inkubation mit EA

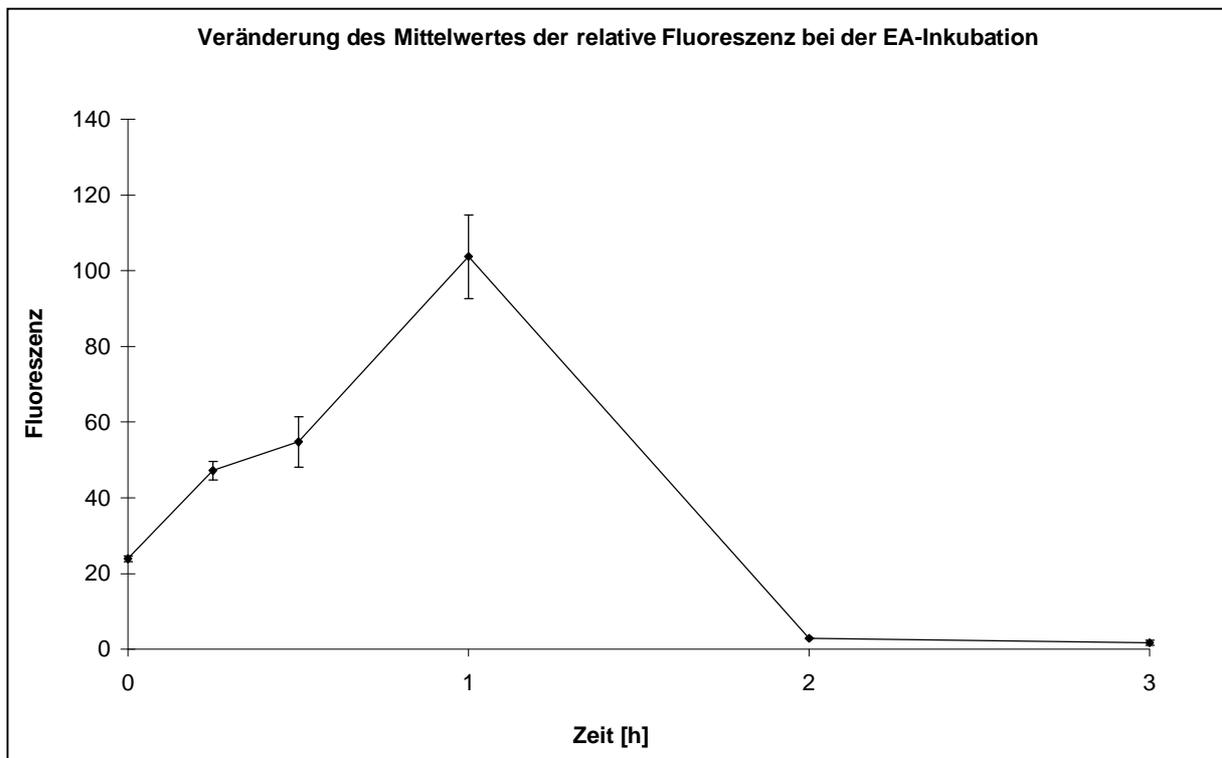
Durch diese Messungen sollte festgestellt werden, welchen zeitlichen Ablauf die Veränderungen der ROS-Konzentration bei der Induktion der Apoptose durch EA hat. Dazu wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  EA für 15 min, 30 min, einer, zwei und drei Stunden inkubiert und anschließend die intrazelluläre ROS-Konzentration bestimmt.

In der Abbildung 3.9 (A) sind einmal die Histogramme nach ein- (blau) und zweistündiger (rot) Inkubation mit EA und das Histogramm einer Kontrollprobe (schwarz) abgebildet. Es kam zu einer homogenen Veränderung der intrazellulären ROS-Konzentration ohne Bildung einer zweiten Zellpopulation. Im Diagramm (B) sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zeit wiedergegeben. Der Mittelwert der relativen Fluoreszenz erreichte nach einer Stunden ein Maximum von  $104 \pm 11,1$  und nahm daraufhin auf einen Wert ab, der weit unter dem Ausgangsniveau lag.

Abbildung 3.9: Veränderung der relativen Fluoreszenz bei Inkubation mit EA



(A) Kontrollprobe, 100  $\mu$ M EA eine Stunde, zwei Stunden.



(B)

In der Abbildung 3.9 (A) sind zum Vergleich Histogramme der grünen relativen Fluoreszenz (FL1-Height) der Kontrollprobe (schwarz) und die zweier Probe, die für eine (blau) und zwei (rot) Stunden mit 100  $\mu$ M EA inkubiert wurden, wiedergegeben. Es kam zu einer homogenen Veränderung der relativen Fluoreszenz, die nach einer Stunde stark zunahm, aber schon nach zwei Stunde ebenso stark abnahm. Das Diagramm (B) zeigt die Veränderung des Mittelwertes

der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zeit. Die relative Fluoreszenz erreichte nach einer Stunden ein Maximum, nahm anschließend stark ab und lag am Ende der Inkubationszeit weit unter dem Ausgangsniveau.

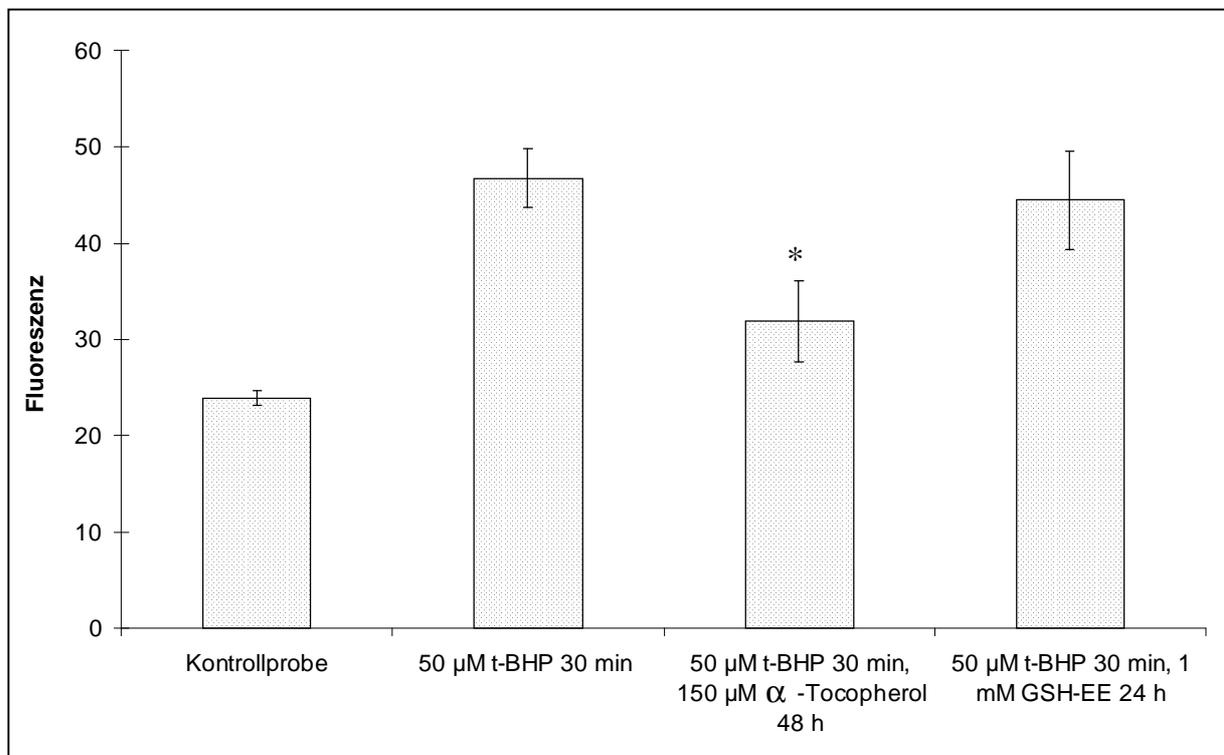
Daten siehe Anhang Tabelle 3.11.

### 3.2.4 Senken Radikalfänger die intrazelluläre ROS-Konzentration?

Zur Überprüfung ob die Radikalfänger  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE eine schützende Wirkung auf die Veränderung der intrazellulären ROS-Konzentration zeigen, wurden die Zellen mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol für 48 Stunden und mit 1 mM GSH-EE für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden sie für vier Stunden mit 10  $\mu$ M t-BHP inkubiert.

In Abbildung 3.10 sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenz als Balkendiagramm dargestellt. Bei der Inkubation mit t-BHP wurde durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol eine Erniedrigung des Mittelwertes von  $47 \pm 3,1$  auf  $38 \pm 4,2$  beobachtet. Hingegen veränderte sich die ROS-Konzentration durch Vorinkubation mit GSH-EE  $44 \pm 5,1$  kaum.

Abbildung 3.10: Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei Inkubation mit t-BHP



Um die in den Balkendiagramm dargestellten Werte zu erhalten, wurden PAEC für 48 Stunden mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol und für 24 Stunden mit 1 mM GSH-EE vorinkubiert.

Anschließend wurden sie für vier Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert. Dabei zeigte sich, daß durch  $\alpha$ -Tocopherol der t-BHP induzierte Anstieg der relativen Fluoreszenz partiell verhindert wurde. \* = Unterschied ( $p < 0,05$ ) 50  $\mu\text{M}$  t-BHP 30 min vs. 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol 48 h, 50  $\mu\text{M}$  t-BHP 30.

Daten siehe Anhang Tabelle 3.12.

### 3.3 Auswirkung von oxidativem Streß auf den GSH-Gehalt

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten die Auswirkungen von oxidativem Streß auf den Oxidationsschutz der Zelle bestimmt werden. Darüberhinaus sollten die zeitlichen Veränderungen des GSH-Gehaltes während der Apoptose festgestellt werden. Dazu wurden die Zellen mit t-BHP, Glucose und EA inkubiert und der GSH-Gehalt bestimmt.

In den Zellen nimmt GSH an der enzymatischen und nichtenzymatischen Entgiftung verschiedener ROS teil [34]. Jede dieser Reaktionen führt direkt oder indirekt zur Bildung von (GSSG) [34, 60-67]. Das entstehende GSSG wird unter physiologischen Bedingungen durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert, sodaß das Verhältnis ( $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}] > 100$ ) gleich bleibt [34, 68, 69]. Das  $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$  Verhältnis bestimmt den Redoxstatus der Zelle. Wird die Zelle oxidativem Streß ausgesetzt, häuft sich das GSSG in der Zelle an und der Redoxstatus der Zelle verschiebt sich. Um den Glutathiongehalt der Zelle zu überprüfen wurde der Fluoreszenzfarbstoff MCB eingesetzt. Dieser nicht fluoreszierender Farbstoff reagiert spezifisch mit der Thiolgruppe des GSH zu einem fluoreszierenden Farbstoff.

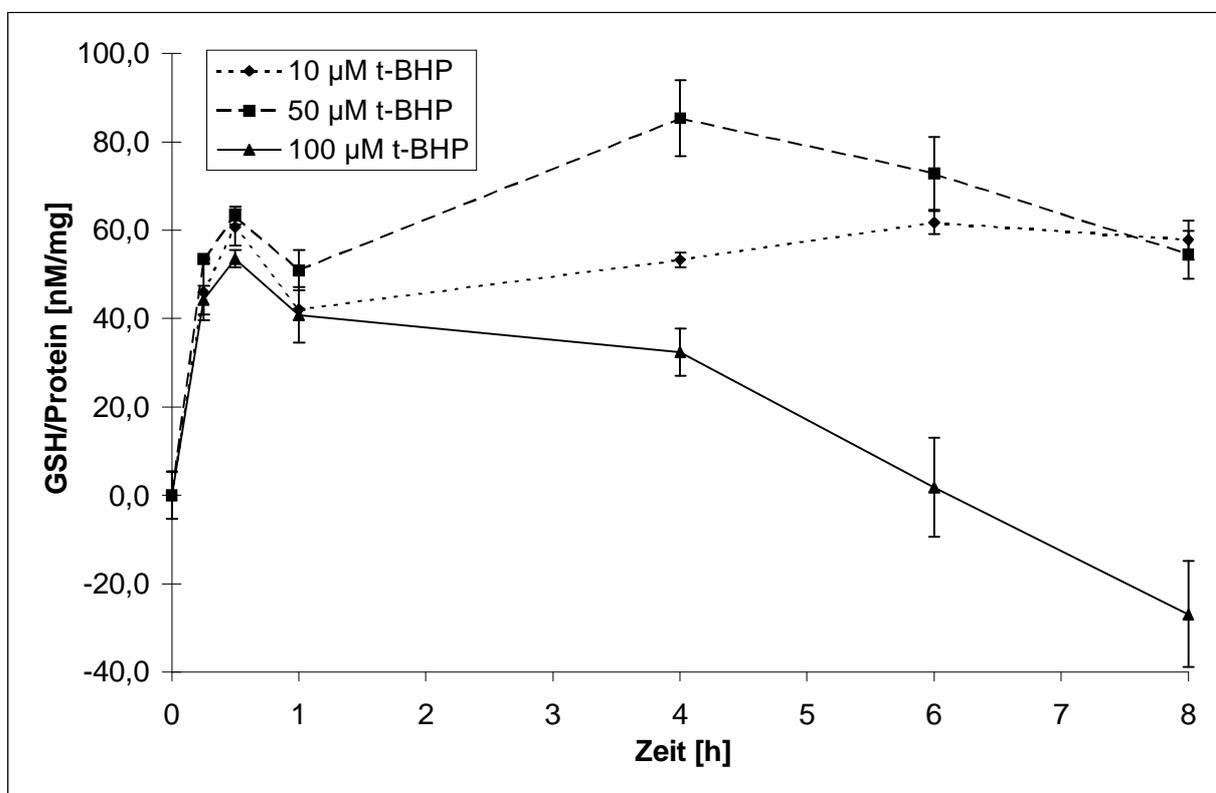
#### 3.3.1 Veränderung des GSH-Gehaltes durch t-BHP

PAEC wurden mit t-BHP-Konzentrationen von 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  für jeweils 15 min, 30 min, eine, vier, sechs und acht Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie im Abschnitt 2.5 beschrieben, aufgearbeitet und der GSH-Gehalt mit dem Fluoreszenzfarbstoff MCB bestimmt.

In der Abbildung 3.11 wird die zeitabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes bei Inkubation von Zellen mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP gezeigt. Der GSH-Gehalt der Kontrollprobe betrug  $81 \pm 2,2$  nM GSH/mg Protein. Bei Inkubation von PAEC mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP der stieg GSH-Gehalt innerhalb von 30 min um  $60 \pm 4,1 \Delta$  nM GSH/mg Protein auf ein Maximum und blieb

auch nach acht Stunden auf diesem hohen Niveau. Bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP stieg der GSH-Gehalt innerhalb von 30 min um  $63 \pm 2,0 \Delta \text{ nM GSH/mg Protein}$  auf ein erstes Maximum. Nach vier Stunden erreichte der GSH-Gehalt mit  $85 \pm 8,6 \Delta \text{ nM GSH/mg Protein}$  ein weiteres Maximum und nahm anschließend ab. Wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert, stieg der GSH-Gehalt innerhalb 30 min um  $54 \pm 2,0 \Delta \text{ nM GSH/mg Protein}$  auf ein Maximum. Danach sank er stetig ab, bis er nach acht Stunden unter dem Ausgangsniveau lag.

Abbildung 3.11: Zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes bei Inkubation von PAEC mit t-BHP



Die in den Diagrammen dargestellten Werte wurden bei der Inkubation von PAEC mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP für 15 min, 30 min, eine, vier, sechs und acht Stunden erhalten. Im Diagramm wird die zeitabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes der Zelle als  $\Delta \text{ nM GSH/mg Protein}$  gezeigt. Bei Inkubation von PAEC mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP stieg der GSH-Gehalt innerhalb von 30 min auf ein Maximum und blieb auch nach acht Stunden auf diesem hohen Niveau. Bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP stieg der GSH-Gehalt innerhalb von 30 min auf ein erstes Maximum und nahm nach Erreichen eines weiteren Maximums nach vier Stunden anschließend ab. Wurden Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert stieg der GSH-Gehalt innerhalb 30 min auf ein Maximum und sank danach stetig ab bis er nach acht Stunden unter dem Ausgangsniveau lag.

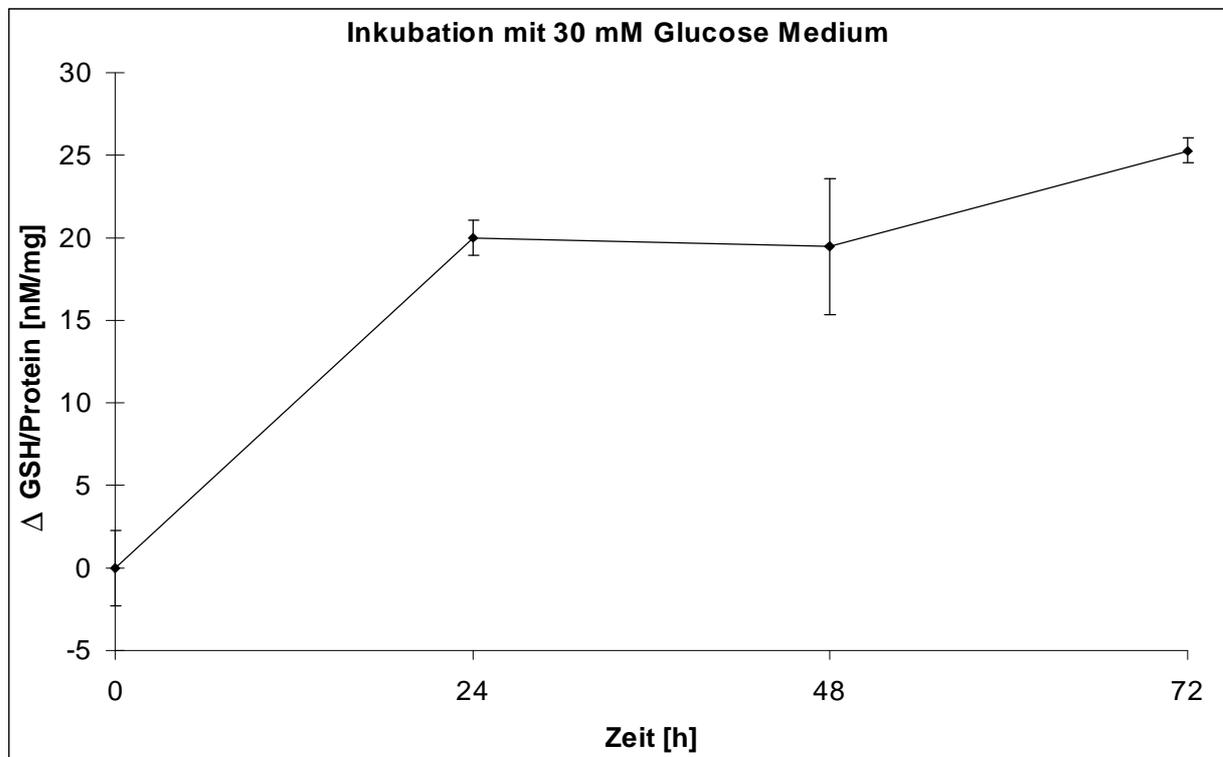
Daten siehe Anhang Tabelle 3.13.

### 3.3.2 Vergrößerung des GSH-Pools bei Inkubation mit 30 mM Glucose

Durch diese Messungen sollte herausgefunden werden, welchen Einfluß die Inkubation von Zellen mit 30 mM Glucose auf den GSH-Gehalt hat. Dazu wurden PAEC aufgearbeitet und der Glutathiongehalte nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.

Die Abbildung 3.12 zeigt den Zeitverlauf der Veränderung des GSH-Gehaltes bei Inkubation von Zellen mit 30 mM Glucose. Es zeigte sich, daß der GSH-Gehalt stetig zunahm und sich nach drei Tagen um  $25 \pm 0,8$  nM GSH/mg Protein erhöht hatte.

Abbildung 3.12: Zunahme des GSH-Gehaltes bei der Inkubation mit 30 mM Glucose



Die in dem Diagramm dargestellten Werte wurden bei der Inkubation von PAEC mit 30 mM Glucose für 24, 48 und 72 Stunden erhalten. Im Diagramm wird die zeitabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes der Zelle als  $\Delta$  nM GSH/mg Protein gezeigt. Der GSH-Gehalt nahm stetig zu und hatte sich nach drei Tagen um  $25 \pm 0,8$   $\Delta$  nM GSH/mg Protein im Vergleich zur Kontrollprobe erhöht.

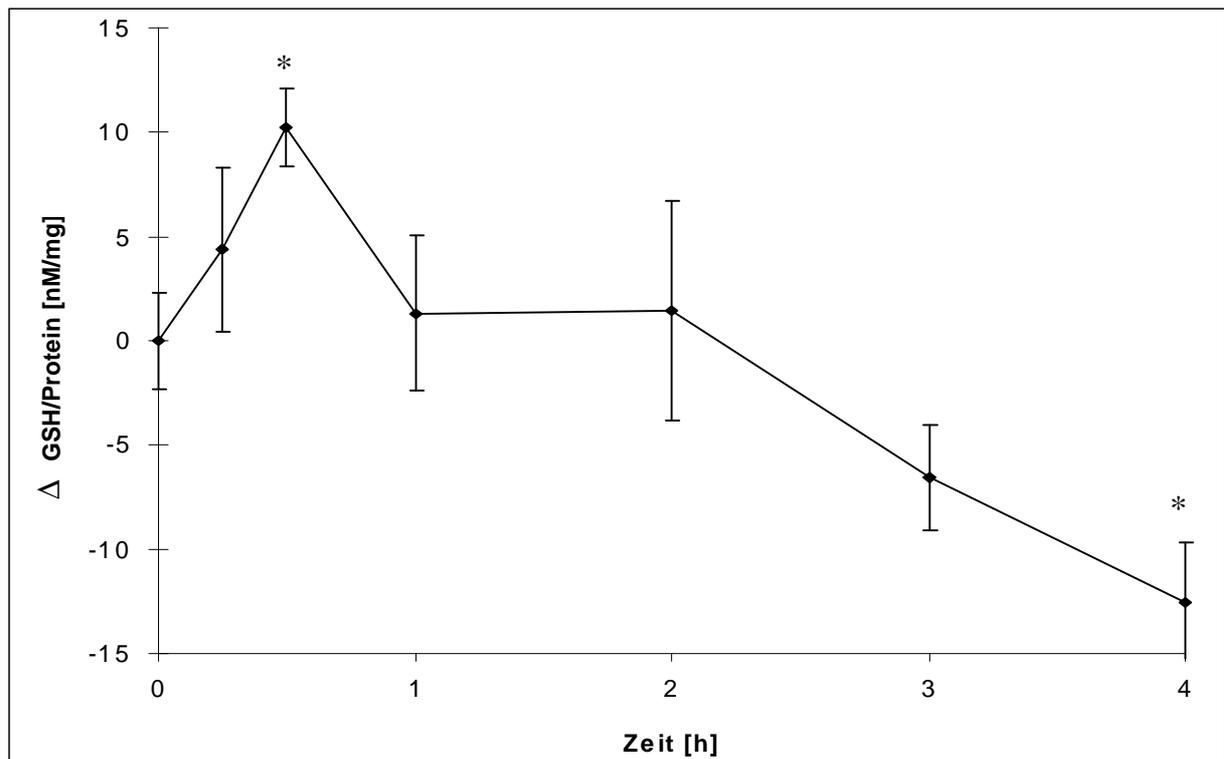
Daten siehe Anhang Tabelle 3.14.

### 3.3.3 Veränderung des GSH-Gehaltes durch EA

Mit dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, welche Auswirkung EA auf den GSH-Gehalt der Zellen hat und in welchem zeitlichen Ablauf mögliche Veränderungen geschehen. Dazu wurden Endothelzellen mit 100  $\mu\text{M}$  EA für 15 min, 30 min, eine, zwei, drei und vier Stunden inkubiert und anschließend aufgearbeitet und vermessen.

Die Abbildung 3.13 zeigt die Veränderung des GSH-Gehaltes bei der Inkubation mit EA. Der GSH-Gehalt erreichte nach 30 min mit einer Steigerung um  $10 \pm 1,9$  nM GSH/mg Protein ein Maximum, nahm anschließend ab und lag nach drei Stunden unter dem Ausgangsniveau.

Abbildung 3.13: Veränderung des GSH-Gehaltes bei der Inkubation von PEAC mit 100  $\mu\text{M}$  EA



Die in dem Diagramm dargestellten Werte wurden bei Inkubation von PAEC mit 100  $\mu\text{M}$  EA für 15 min, 30 min, eine, zwei, drei und vier Stunden erhalten. Im Diagramm wird die zeitabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes der Zelle als  $\Delta$  nM GSH/mg Protein gezeigt. Der GSH-Gehalt nahm anfänglich zu und erreichte nach 30 min sein Maximum. Anschließend nahm er stetig ab und lag nach drei Stunden unter dem Ausgangsniveau. \* = Unterschied ( $p < 0,05$ ) Kontrollprobe ( $t=0$ ) vs. 100  $\mu\text{M}$  EA 30 min bzw. 100  $\mu\text{M}$  EA 4 h Daten siehe Anhang Tabelle 3.14.

### 3.4 Veränderung des $\Delta\Psi_M$ bei oxidativem Streß

Bei diesen Messungen wurde der Einfluß von oxidativem Streß auf das  $\Delta\Psi_M$  bestimmt. Dazu wurden Endothelzellen mit t-BHP oder 30 mM Glucose inkubiert. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE eine protektive Wirkung auf das  $\Delta\Psi_M$  ausüben.

Die Öffnung der Permeabilitätstransitionsporen (PT-Poren) in den Mitochondrien spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Die Bildung der PT-Poren führt zur Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$ , was zum Anschwellen der Mitochondrien und zum Reißen der äusseren Mitochondrienmembran führt.

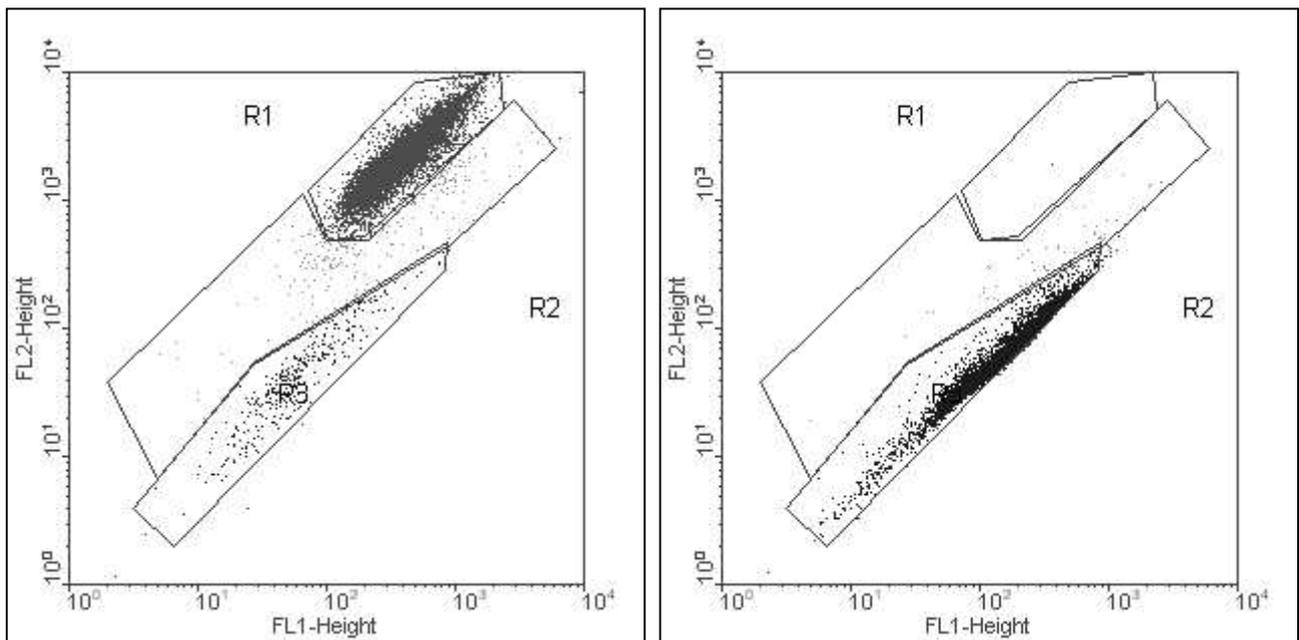
Zur Bestimmung des  $\Delta\Psi_M$  wird der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 eingesetzt, der bei niedriger Konzentration grün ist. Bei hohen Konzentrationen in wässriger Lösung bildet JC-1 rot fluoreszierende J-Aggregate. Bedingt durch das negative Membranpotential der Mitochondrien reichern sich dort die positiv geladenen Farbstoffmoleküle an und bilden rot fluoreszierende J-Aggregate. Wird eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch, wird das Membranpotential erniedrigt, die J-Aggregate lösen sich auf und die rote Fluoreszenz nimmt ab. Somit kann mit Hilfe von JC-1 die Veränderungen des  $\Delta\Psi_M$  bestimmt werden.

Um die sich bildende Zellpopulationen zu charakterisieren wurden die Zellpopulationen in verschiedene Regionen unterteilt und zur Auswertung das Punktediagramm der rot/grünen relativen Fluoreszenz verwendet. Zur Auswertung der Fluoreszenzveränderungen bei Inkubation mit 30 mM Glucose wurden hingegen Histogramme verwendet.

In Abbildung 3.14 ist ein Punktediagramm einer Kontrollprobe, einer mit Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP) inkubierten und einer mit t-BHP inkubierten Probe wiedergegeben. Im Punktediagramm (A) der Kontrollprobe liegt nur eine Zellpopulation vor, die eine hohe rote relative Fluoreszenz besitzt. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen befinden sich in der Region R1. CCCP ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, es lagert sich in der inneren Mitochondrienmembran ein und erniedrigt das  $\Delta\Psi_M$  dadurch, daß es Protonen durch die Membran nach außen transportiert. Wird das  $\Delta\Psi_M$  durch Inkubation mit CCCP vollkommen zerstört, liegen alle Zellen im Punktediagramme (B) in der Region R3 mit stark erniedrigter roter Fluoreszenz vor. Im Gegensatz dazu haben sich in der mit t-BHP behandelten Probe zwei Zellpopulationen mit niedriger roter relativer Fluoreszenz gebildet.

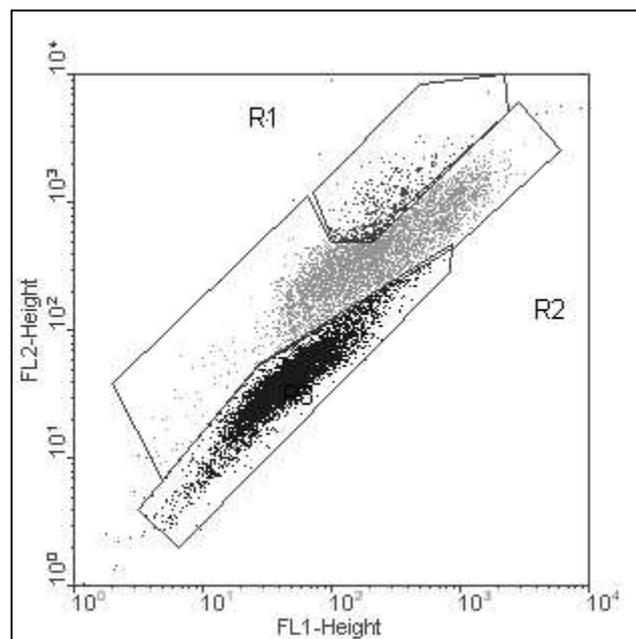
Es liegen sowohl Zellen in der Region R3 vor als auch in der Region R2 vor. Zellen in R2 weisen eine höhere rote relative Fluoreszenz auf, als die der Region R3, aber eine niedriger als die Region R1 auf. Die in Region R2 vorliegenden Zellen werden im weiteren als Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$ , die in der Region R3 als Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  bezeichnet.

Abbildung 3.14: Punktediagramm der roten und grünen relativen Fluoreszenz bei Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoffe JC-1



(A) Kontrollprobe

(B) 100  $\mu$ M CCCP 2 h



(C) 100  $\mu$ M t-BHP 8 h

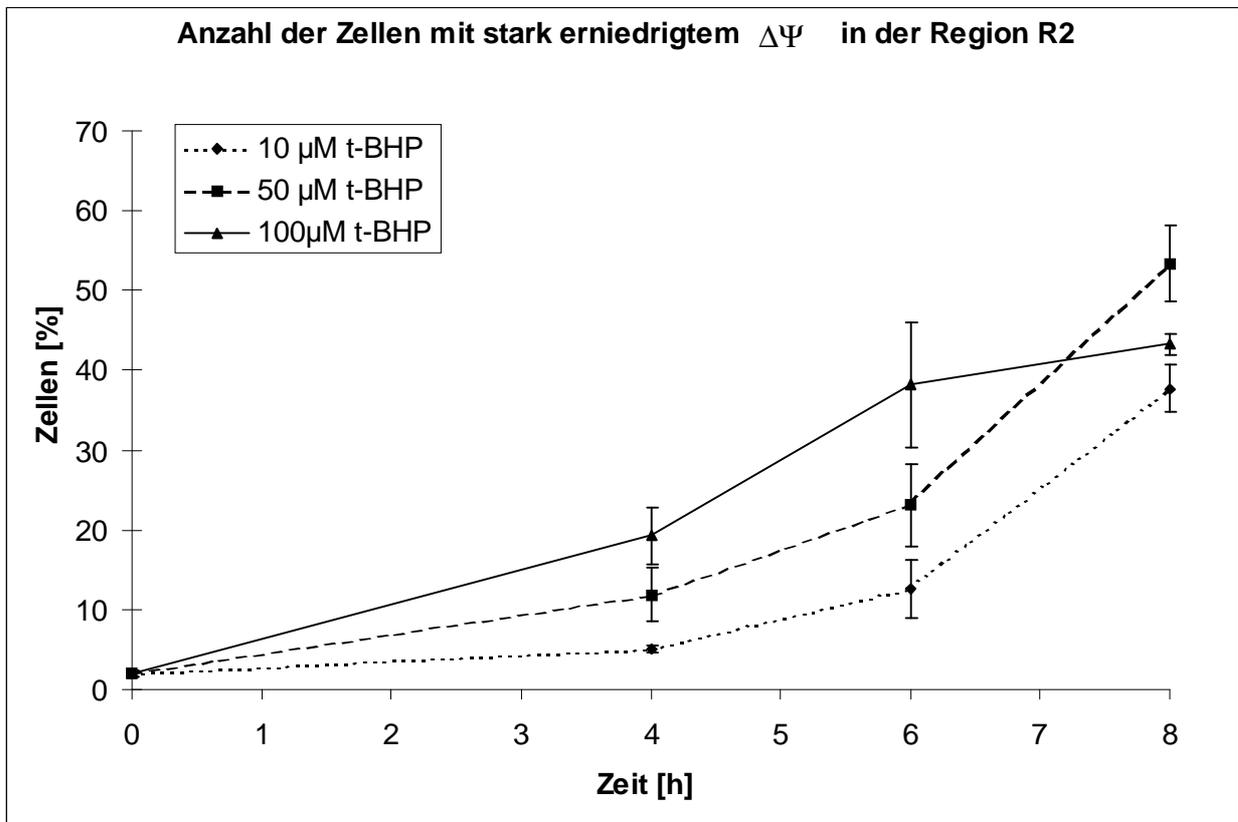
Im Punktediagramm (A) wird die grüne relative Fluoreszenz (FL1-Height) und die rote relative Fluoreszenz (FL2-Height) einer Kontrollprobe gezeigt. Über 90 % der Kontrollzellen liegen im Bereich der Region R1, in denen die Zellen mit physiologischem  $\Delta\Psi_M$  liegen. Das Punktediagramm (B) zeigt eine Probe die für zwei Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  CCCP inkubiert wurde. Die Zellen liegen in der Region R3 mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$ . Das Punktediagramm (C) zeigt eine Probe die acht Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen zeigt sich, daß die Mehrheit der Zellen im Bereich der Regionen R2 mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  und in der Region R3 mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  vorliegen.

### 3.4.1 Erniedrigung des $\Delta\Psi_M$ bei Inkubation mit t-BHP

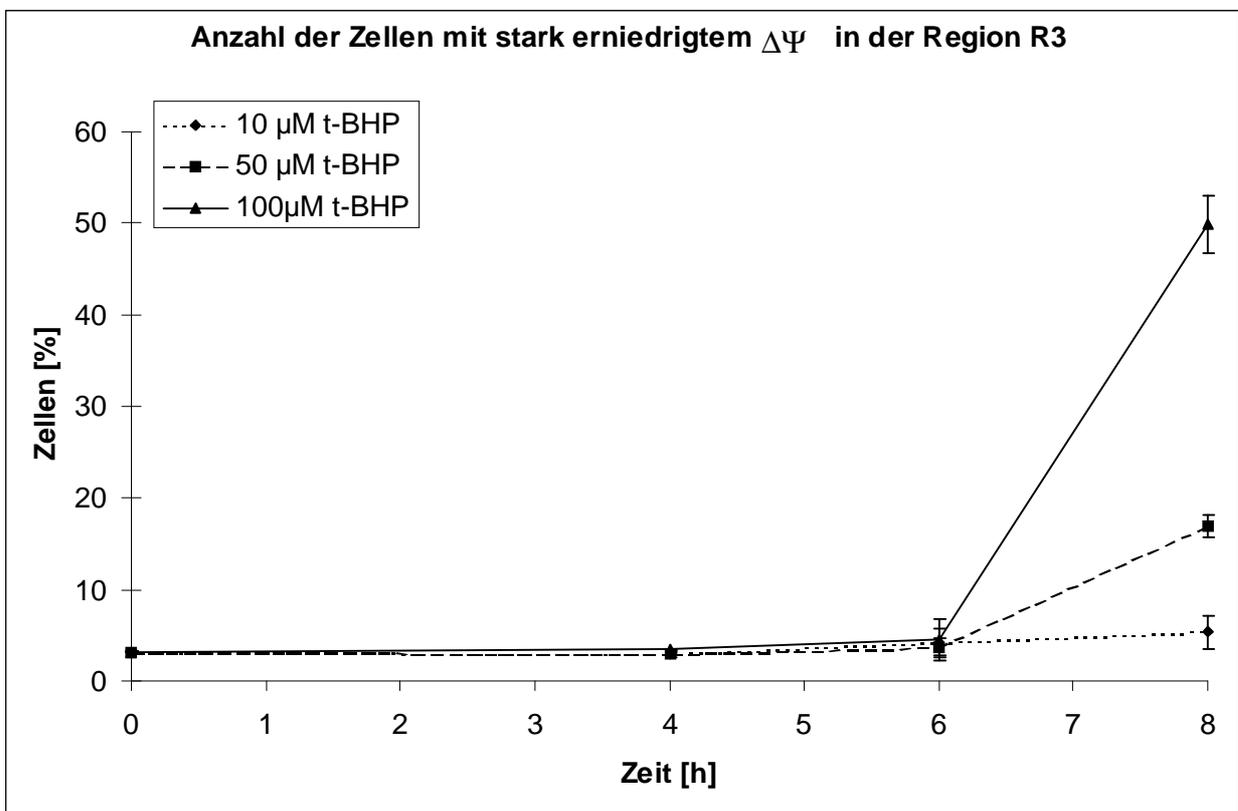
Im Rahmen dieser Messungen sollte untersucht werden, welche Auswirkungen der oxidative Streß auf das  $\Delta\Psi_M$  hat. Dazu wurden PAEC mit t-BHP-Konzentrationen von 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  für vier, sechs und acht Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben

In der Abbildung 3.15 wird in den Diagrammen (A) und (B) der Effekt gezeigt, den die Inkubation von Zellen mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP auf das  $\Delta\Psi_M$  der Zellen ausübte. Bei Inkubation mit 10 und 50  $\mu\text{M}$  kam es zu einer stetigen Zunahme der Anzahl an Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$ , deren Anteil nach acht Stunden auf  $38 \% \pm 2,9$  bzw auf  $53\% \pm 4,8$  der Zellen anwuchs. Bei Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP flachte die Zunahme der Anzahl an Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  nach acht Stunden etwas ab und lag mit  $43 \% \pm 1,3$  unter dem Wert der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$ . Eine Zunahme der Anzahl von Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  konnte bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  erst nach acht Stunden beobachtet werden und stieg dann auf  $17 \% \pm 1,8$  bzw  $50 \% \pm 1,2$  der Zellen an. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  veränderte sich die Anzahl der Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  nach acht Stunden nur leicht von  $3 \% \pm 0,1$  auf  $5 \% \pm 1,8$ .

Abbildung 3.15: Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  bei Inkubation mit t-BHP



(A)



(B)

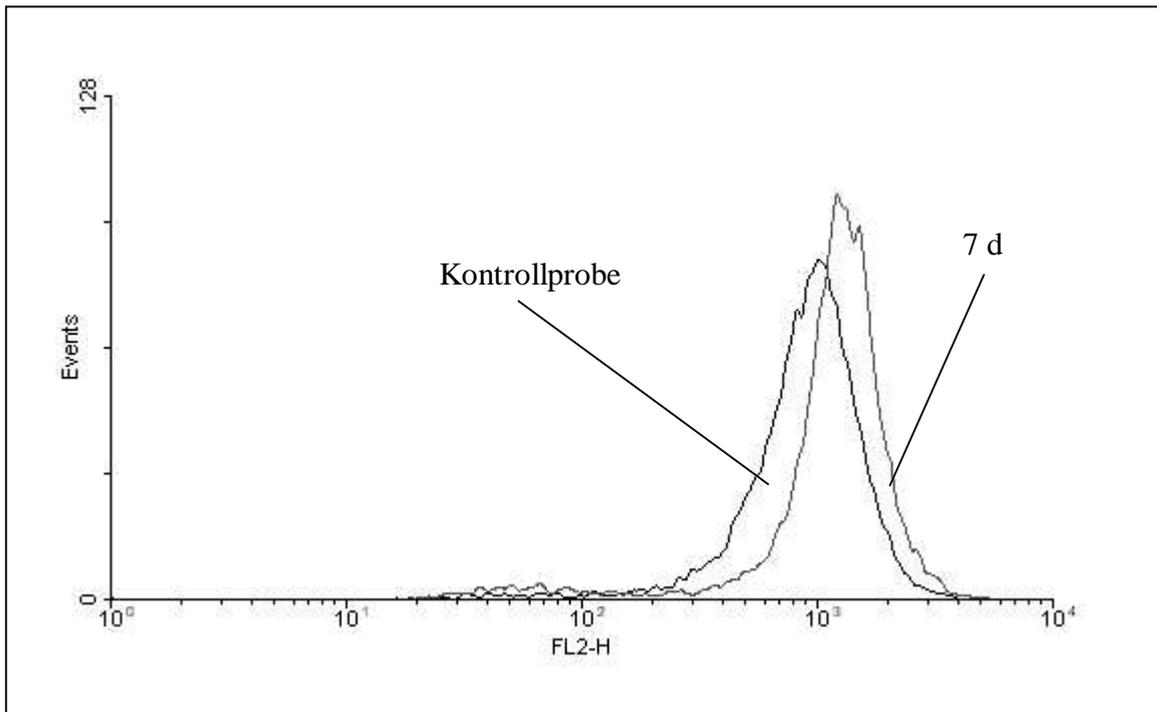
Die in den Diagrammen (A) und (B) dargestellten Werte wurden bei Inkubation von PAEC mit 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP für vier, sechs und acht Stunden erhalten. Es wird die zeitabhängige Veränderung der Zellanzahl mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  (A) und stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  (B) gezeigt. Das Diagramm (A) zeigt eine stetige Zunahme der Anzahl an Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_{\text{M}}$ , die bei Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP nach acht Stunden abflachte. Im Diagramm (B) nahm die Anzahl von Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  nach acht Stunden zu.

Daten siehe Anhang Tabelle 3.16, 3.17.

### 3.4.2 Erhöhung des $\Delta\Psi_{\text{M}}$ bei Inkubation mit 30 mM Glucose

Bei diesen Messungen sollte überprüft werden, ob durch Inkubation mit 30 mM Glucose eine Veränderung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  verursacht werden kann. Bei der Inkubation der Zellen mit 30 mM Glucose wurde keine Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  festgestellt. Weder bei Kurzzeitinkubationen von 30 min, einer und zwei Stunden, noch bei Inkubationen über den Zeitraum von zwei, drei oder sieben Tagen wurde eine Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  gemessen. Hingegen konnte bei der Inkubation mit 30 mM Glucose eine Erhöhung der roten relativen Fluoreszenz und damit auch des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  beobachtet werden. In der Abbildung 3.16 sind das Histogramm der Kontrollprobe (schwarz) und das Histogramm einer Probe (rot), die sieben Tage mit 30 mM Glucose inkubierten wurde, wiedergegeben. Der Mittelwert der relativen Fluoreszenz stieg von  $840 \pm 60$  nach sieben tägiger Inkubation auf  $1240 \pm 90$ .

Abbildung 3.16: Zunahme der roten relativen Fluoreszenz bei Inkubation mit 30 mM Glucose



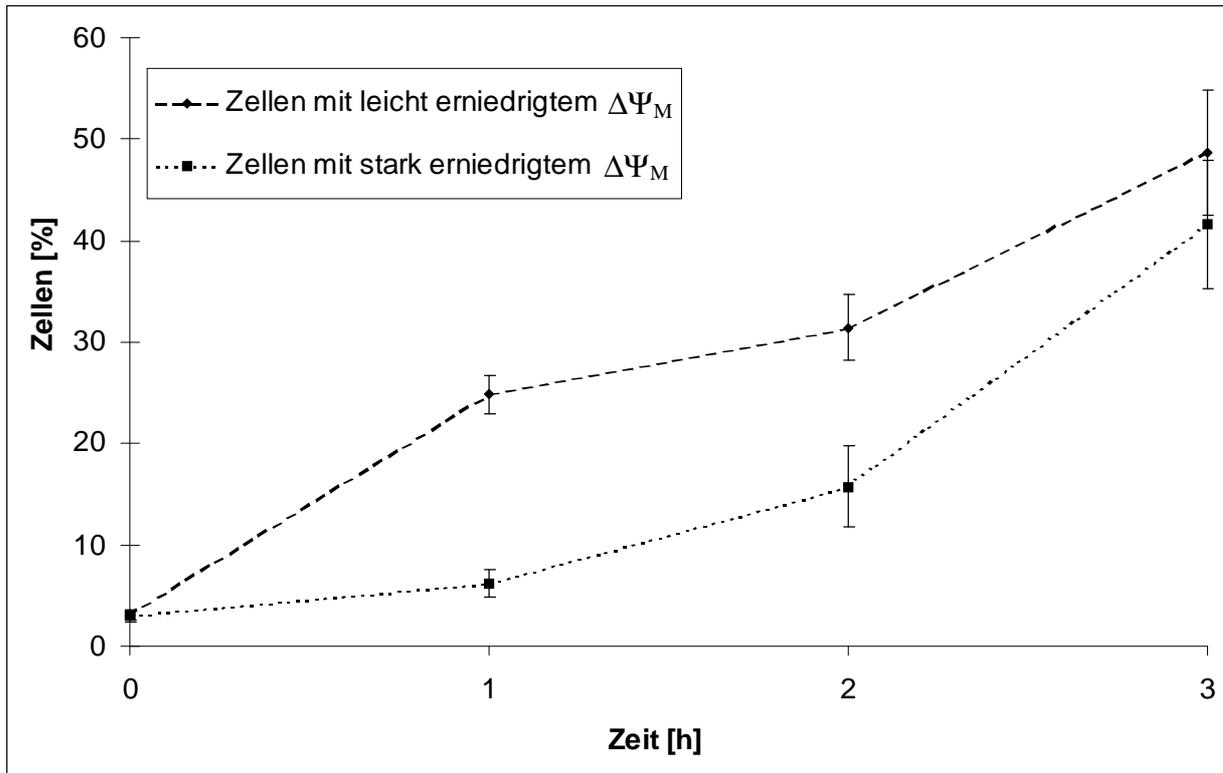
Hier sind zum Vergleich Histogramme der roten relativen Fluoreszenz (FL2-Height) der Kontrollprobe und einer Probe, die für sieben Tage mit 30 mM Glucose inkubiert wurde, wiedergegeben. Es ist deutlich eine Erhöhung der relativen Fluoreszenz zu sehen.

### 3.4.3 Zunahme der Zellen mit erniedrigtem $\Delta\Psi_M$ bei Inkubation mit EA

Durch diese Messungen sollte geprüft werden, ob es durch die Oxidation des GHS-Pools mit EA zu einer Veränderung des  $\Delta\Psi_M$  kommt und in welchem zeitlichen Ablauf dies geschieht.

Bei Inkubation von PAEC mit 100  $\mu$ M EA konnte eine Zunahme der Anzahl an Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  schon nach einer Stunden festgestellt werden. Im weiteren Verlauf stieg die Anzahl der Zellen mit leicht erniedrigem  $\Delta\Psi_M$  nach drei Stunden auf 49 %  $\pm$  6,1. Eine Zunahme der Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  konnte mit 16 %  $\pm$  4,0 nach zwei Stunden beobachtet werden. Nach drei Stunde stieg die Anzahl der Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  auf 42 %  $\pm$  6,4 an.

Abbildung 3.17: Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  bei Inkubation mit EA



Die in den Diagrammen dargestellten Werte wurden bei der Inkubation von PAEC mit 100  $\mu\text{M}$  EA für eine, zwei, drei und vier Stunden erhalten. Im Diagramm wird die zeitabhängige Veränderung der Anzahl an Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  (blau) und stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  (rosa) gezeigt. Eine Erhöhung der Anzahl von Zellen mit leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  wurde bereits nach einer Stunden gesehen. Eine Zunahme der Anzahl an Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  konnte nach zwei Stunden festgestellt werden.

Daten siehe Anhang Tabelle 3.18.

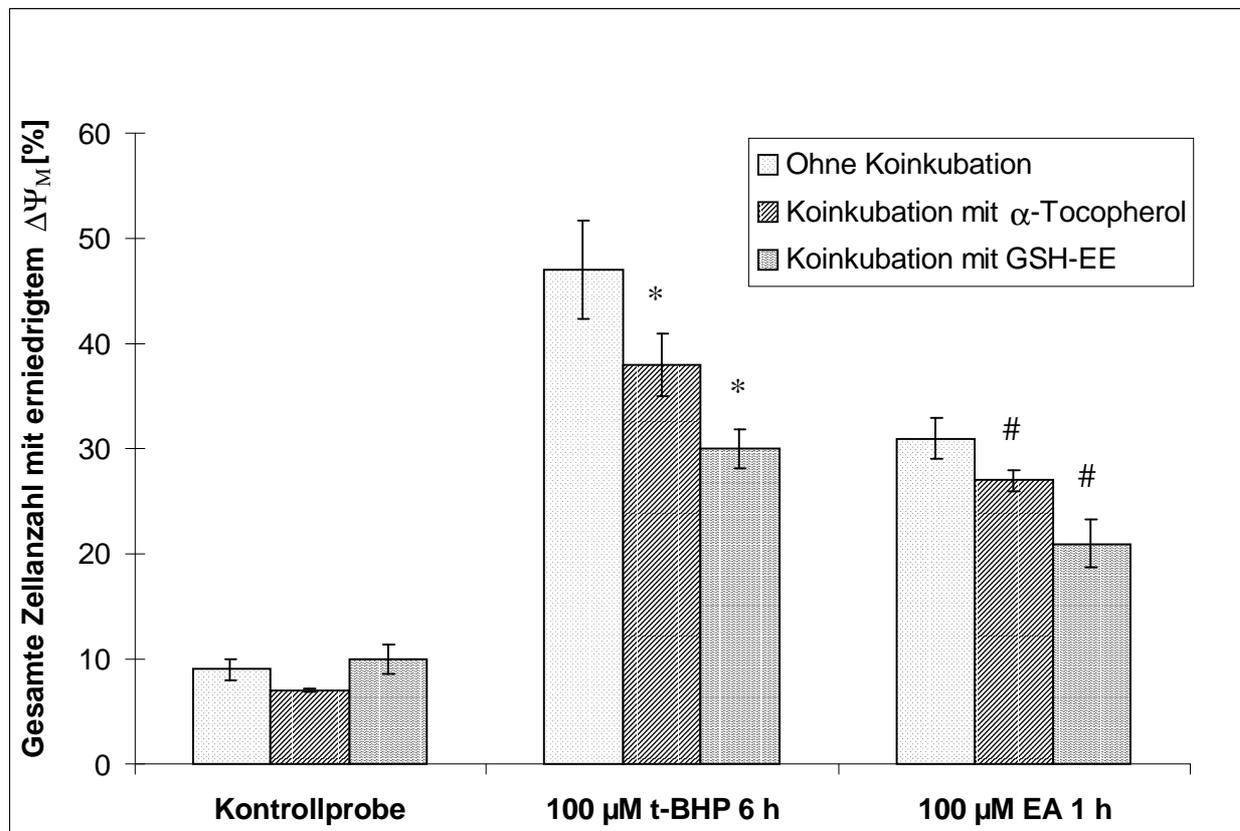
#### 3.4.4 Schutzwirkung von $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE

Um zu prüfen, ob  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE zur Aufrechterhaltung von  $\Delta\Psi_M$  beitragen können, wurden Endothelzellen für 48 Stunden mit 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol und für 24 Stunden mit 1 mM GSH-EE vorinkubiert. Anschließend wurden sie sechs Stunden lang mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP oder einer Stunde lang mit 100  $\mu\text{M}$  EA inkubiert.

Bei Inkubation von PAEC mit t-BHP war die Anzahl der Zellen mit stark und leicht erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol um 9 %  $\pm$  3,0 geringer. Bei Inkubation mit GSH-EE war die gesamte Anzahl der Zellen mit erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  um 17 %  $\pm$  1,8 geringer. Wurden Zellen mit EA inkubiert, konnte durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol

die Anzahl der Zellen mit erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  insgesamt um  $4\% \pm 1,0$  und durch Vorinkubation mit GSH-EE um  $10\% \pm 2,3$  verringert werden. Inkubation von PAEC nur mit  $\alpha$ -Tocopherol oder GSH-EE hatte keine signifikante Veränderung des Kontrollwertes zur Folge. In der Abbildung 3.18 sind die Daten graphisch dargestellt, wobei die Zellen mit stark und niedrigem  $\Delta\Psi_M$  zusammengefasst sind.

Abbildung 3.18 Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei Inkubation mit t-BHP und EA



Um die in den Balkendiagramm dargestellten Werte zu erhalten, wurden PAEC für 48 Stunden mit  $150\ \mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol und für 24 Stunden mit  $1\ \text{mM}$  GSH-EE vorinkubiert. Anschließend wurden sie für sechs Stunden mit  $100\ \mu\text{M}$  t-BHP und eine Stunde mit  $100\ \mu\text{M}$  EA inkubiert. Die angegebene Werte setzen sich aus den Zellen mit leicht und stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  zusammen. Dabei zeigte sich, daß bei Inkubation von PAEC mit t-BHP und EA durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE die Anzahl an Zellen mit erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  verringert wurde. \* = Unterschied ( $p < 0,05$ )  $100\ \mu\text{M}$  t-BHP 6 h vs.  $150\ \mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol 48 h,  $100\ \mu\text{M}$  t-BHP 6 h bzw  $1\ \text{mM}$  GSH-EE 24 h,  $100\ \mu\text{M}$  t-BHP 6 h; # = Unterschied ( $p < 0,05$ )  $100\ \mu\text{M}$  EA 1 h vs.  $150\ \mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol 48 h,  $100\ \mu\text{M}$  EA 1 h bzw  $1\ \text{mM}$  GSH-EE 24 h,  $100\ \mu\text{M}$  EA 1 h. Daten siehe Anhang, Tabelle 3.19.

### 3.5 Freisetzung von Cytochrom-c ins Zytosol

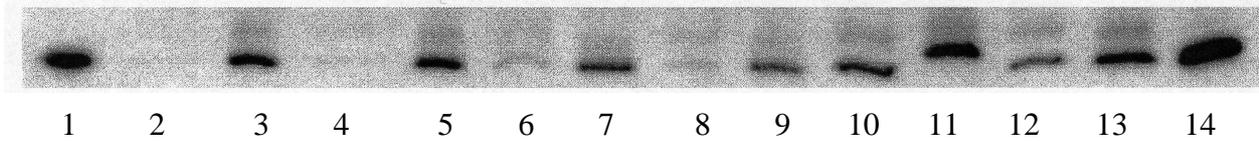
Durch diese Versuche sollte festgestellt werden, ob bei der Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  durch oxidativen Streß auch Apoptose induzierende Proteine wie AIF und Cytochrom-c ins Zytosol gelagen. Dazu wurde PAEC mit t-BHP, EA oder 30 mM Glucose inkubiert und Cytochrom-c immunochemisch nachgewiesen.

Im physiologischen Zustand der Mitochondrien liegt das Cytochrom-c im Intermembranraum vor. Dabei ist es durch das Membranpotential elektrostatisch an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran gebunden. Durch Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  löst sich die Bindung des Cytochrom-c und nach Anschwellen und Reißen der äußeren Mitochondrienmembran gelangt das Cytochrom-c ins Zytosol [23, 40]. Im Zytosol aktiviert es die Procaspase 9 und initiiert damit die Caspasekaskade die zur Kondensation des Zellkerns führt [32, 23].

Zur Überprüfung, ob bei der Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  durch oxidativen Streß Cytochrom-c ins Zytosol gelangt, wurden die Zellen für eine Stunde mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP, eine Stunde mit 100  $\mu\text{M}$  EA und zwei Stunden mit 30 mM Glucose inkubiert. Anschließend wurden sie, wie unter Punkt 2.4 beschrieben, aufgearbeitet und Cytochrom-c immunochemisch in den zytosolischen und mitochondrialen Zellfraktionen nachgewiesen.

In dem Westernblot der Abbildung 3.19 ist zu erkennen, daß weder bei der Kontrolle noch bei einer Inkubation der Zellen für zwei Stunden mit 30 mM Glucose Cytochrom-c in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen wurde. Bei der Inkubation von PAEC mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP für eine Stunde konnte Cytochrom-c in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden. Dies wurde durch Vorinkubation der Zellen mit 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol für 48 Stunden teilweise verhindert. Wurden Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  EA eine Stunde inkubiert, wurde eine Zunahme des Cytochrom-c in der zytosolischen Fraktion beobachtet, die durch eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit 1 mM GSH-EE ebenfalls teilweise verringert wurde.

Abbildung 3.19: Nachweis von Cytochrom-c in mitochondrialen und zytosolischen Zellfraktionen



Die Proben wurden wie unter Punkt 2.5 beschrieben aufgearbeitet. Es wurden jeweils 15 µg Protein aufgetragen und im SDS-Gel aufgetrennt. In den Spuren 1 und 14 wurden zur Kontrolle jeweils 0,3 µg Cytochrom-c aufgetragen. Die Spuren 2-13 sind sechs Paare, wobei die erste Spur jeweils die zytosolische und die zweite Linie die mitochondriale Fraktion darstellt.

Linie 1 0,5 µg Cytochrom-c

Linie 2,3 Kontrollprobe

Linie 4,5 30 mM Glucose 2 h

Linie 6,7 100 µM t-BHP 1 h, 150 µM α-Tocopherol 48 h

Linie 8,9 100 µM EA 1 h, 1 mM GSH-EE 24 h

Linie 10,11 100 µM t-BHP 1 h

Linie 12,13 100 µM EA 1 h

Linie 14 0,5 µg Cytochrom-c

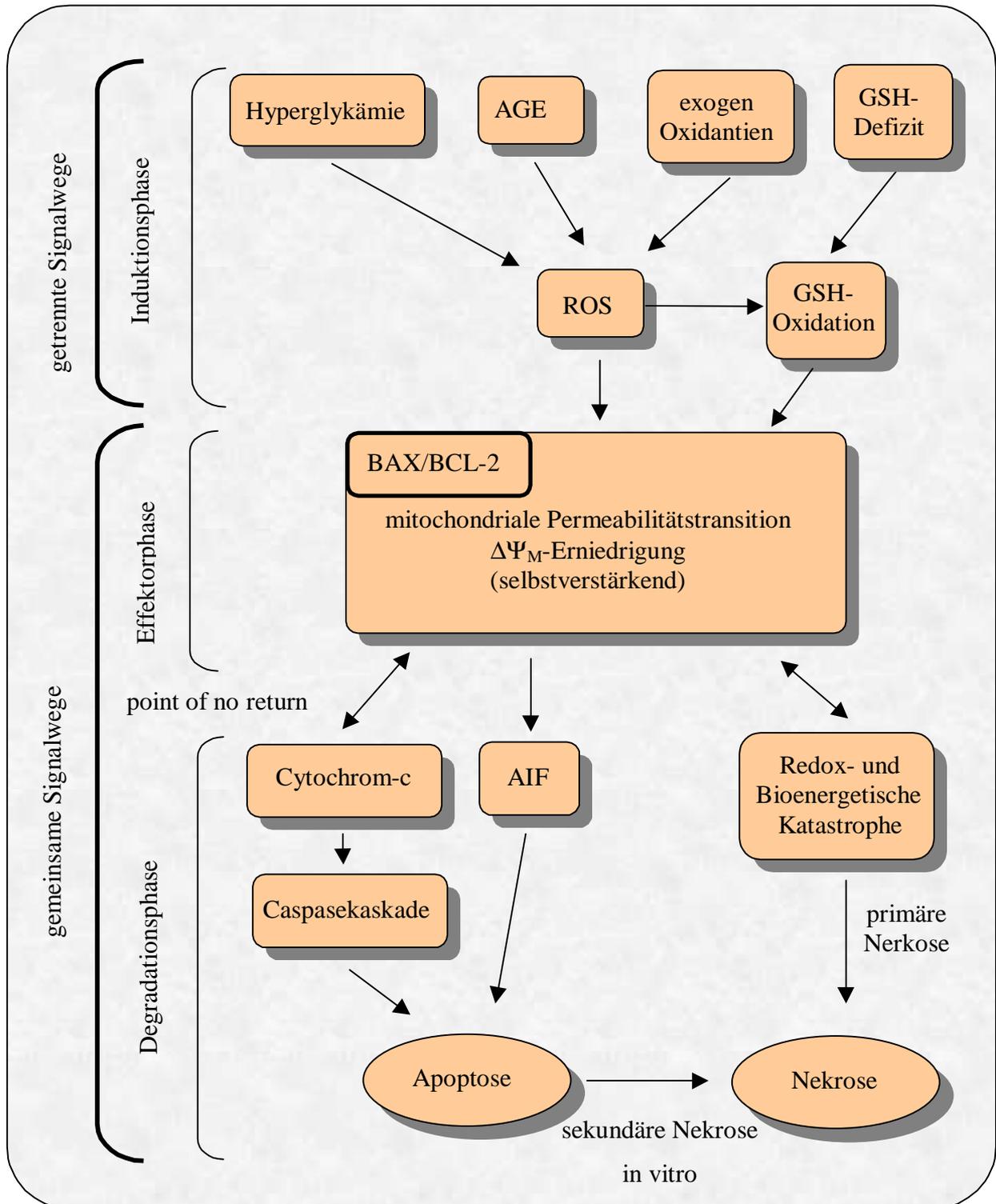
## 4 Diskussion

Akuter und chronischer oxidativer Streß auf das Endothel ist eine wichtige Ursache der endothelialen Dysfunktion und spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Gefäßkrankheiten. Dabei kann der oxidative Streß eine Vielzahl von Quellen haben, unter anderem können Hyperglykämie, AGE, ox LDL, oder Bluthochdruck zur erhöhten intra- oder auch extrazellulär Bildung von ROS führen. ROS üben verschiedenen Funktionen aus; Sie dienen intrazellulär als Signalmoleküle und stimulieren unter anderem die Cytokinsekretion und Zellproliferation. Andererseits verursachen sie bei höheren Konzentrationen Zellschädigungen und können den Zelltod einleiten [14].

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch oxidativen Streß näher untersucht werden. Während die Induktion der Apoptose durch verschiedene Reize über spezifische Signalwege ausgelöst werden kann, läuft in der Effektorphase ein gemeinsamer Signalweg ab, der nach Erreichen der Degradationsphase nicht mehr umkehrbar ist. Für den Signalweg, der durch oxidativen Streß induzierten Apoptose von Endothelzellen, wurde aufgrund der publizierten Daten der in Abbildung 4.1 postulierte Mechanismus angenommen und untersucht.

Entsprechend dieser Hypothese führt in der Induktionsphase exogener Streß zur intrazellulären Bildung von ROS. Die erhöhte ROS-Konzentration ist die Ursache für die Änderung des intrazellulären GSH/GSSG-Verhältnis, was eine Veränderung des Redoxstatus der Zellen zur Folge hat. Die Veränderung des Redoxstatus ist der Auslöser für die Öffnung von PT-Poren in der Mitochondrienmembran, wodurch die Effektorphase eingeleitet wird. Es ist offen, ob dieser Prozeß direkt abhängig ist vom zellulären Redoxstatus, oder ob ROS unter Vermittlung spezifischer Kinasen die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von BAX oder BCL-2 verursachen und damit indirekt ein Öffnen der PT-Poren veranlassen. Durch die offenen Poren equilibrieren Elektrolyte und Wasser, wodurch das  $\Delta\Psi_M$  erniedrigt wird und es zum Anschwellen und Reißen der Mitochondrienmembran kommt. Dadurch wird Cytochrom-c ins Zytosol freigesetzt was den Beginn der Degradationsphase markiert. Das Cytochrom-c aktiviert die Caspasekaskade, was letztlich zur Fragmentierung des Zellkerns und des Zytoskletts führt.

Abbildung 4.1: Hypothetischer Signalweg der Apoptoseinduktion durch oxidativen Streß.



In der Induktionsphase können verschiedene Reize über spezifische Signalwege zur Öffnung der mitochondrialen PT-Poren führen. Exogener Streß führt in Endothelzellen zur intrazellulären ROS-Bildung. Aufgrund der erhöhten ROS-Konzentration wird der GSH-Pool oxidiert und der Redoxstatus verändert sich. Durch das Öffnen der PT-Poren wird in der Effektorphase ein gemeinsamer Signalweg eingeleitet. Durch die offenen Poren equilibrieren Elektrolyte und Wasser, wodurch das  $\Delta\Psi_M$  erniedrigt wird und es zum Austreten von Cytochrom-c und AIF ins Zytosol kommt. Dies markiert den Beginn der Degradationsphase

und wird auch als „point of no return“ bezeichnet. Cytochrom-c aktiviert die Caspasekaskade, was zur Fragmentierung des Zellkerns und des Zytoskellets führt. Da apoptotische Zellen in vitro nicht phagozytiert werden, kommt es zur sekundären Nekrose. Kommt es allerdings im Anschluß der PT zu einem schnellen Verlust von ATP und NAD(P)H<sub>2</sub>, haben die Zellen nicht mehr genug Zeit oder Energie um die apoptotischen Vorgänge durchzuführen, sie reißen und werden nekrotisch (Bioenergetischen bzw Redoxkatastrophe). Modifiziert nach Krömer et al. [25].

Um die postulierten Zusammenhänge der Apoptoseinduktion durch oxidativen Streß zu untersuchen, wurden kultivierte PAEC mit dem lipophilen Radikalstarter t-BHP inkubiert. Als geeignete Schutzstoffe wurden einmal der lipidlösliche Radikalfänger  $\alpha$ -Tocopherol und das wasserlösliche GSH-EE verwendet. Um den Einfluß der Oxidation des GSH-Pool näher zu betrachten, wurden die Zellen zusätzlich mit EA inkubiert. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Auswirkung Hyperglykämie auf die postulierten Signalwege hat.

### **4.1 Welchen Einfluß hat t-BHP auf die Induktion von Apoptose und Nekrose ?**

Obwohl lange Zeit Apoptose und Nekrose für zwei unterschiedliche Mechanismen betrachtet wurden, wird heute angenommen, daß die beiden Formen des Zelltodes zwei Endpunkte eines Vorgangs darstellen. Da beide Formen des Zelltodes zum Teil die gleichen Merkmale aufweisen, war es in dieser Arbeit wichtig zwischen Apoptose und Nekrose zu differenzieren und Konzentrationsbereiche zu definieren, bei denen überwiegend Apoptose induziert wird. Es zeigte sich, daß mit 50  $\mu$ M t-BHP ein Anstieg der Anzahl der apoptotischen Zellen zu beobachten war. Eine Zunahme der Anzahl an nekrotischen Zellen wurde erst bei Inkubationen mit t-BHP-Konzentrationen größer als 100  $\mu$ M festgestellt. Bei einer t-BHP Konzentration von 500  $\mu$ M war die Anzahl an nekrotischen Zellen stark erhöht, sodaß diese Konzentration nicht weiter verwendet wurde.

#### Konzentrationsbereich der t-BHP induzierten Apoptose:

Daß oxidativer Streß die Induktion von Apoptose auslösen kann, wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben. So konnten verschiedene Gruppen zeigen, daß der, durch 7-Ketocholesterol [50], durch UV-Strahlung LIT [42], durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> LIT 30 und Hyperglycämie [17, 33, 52] ausgelöste Streß sauerstoffradikalabhängig Apoptose in verschiedenen

Zellsystemen, darunter auch Endothelzellen, induziert. Wichtig hierbei ist, daß derselbe Streß sowohl in der Lage ist Apoptose zu induzieren, aber auch zur Nekrose führen kann, abhängig von der Konzentration des Streßors [25-27]. Da auch typische apoptotische Merkmale wie die DNA-Leiter [25, 29, 31] sowohl bei der Apoptose als auch bei der Nekrose vorkommen können, wie auch die mitochondriale PT [25, 26] bei beiden eine wichtige Rolle spielt, war es wichtig zwischen Apoptose und Nekrose zu differenzieren. Die konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose verlief nicht linear, denn erst ab Erreichen eines Schwellenwertes, der zwischen 10 und 50  $\mu\text{M}$  t-BHP lag, wurde Apoptose induziert. Ebenso verhielt es sich mit der Induktion der Nekrose, die ab 100  $\mu\text{M}$  anstieg.

### Zeit und Konzentrationsabhängigkeit der Apoptose:

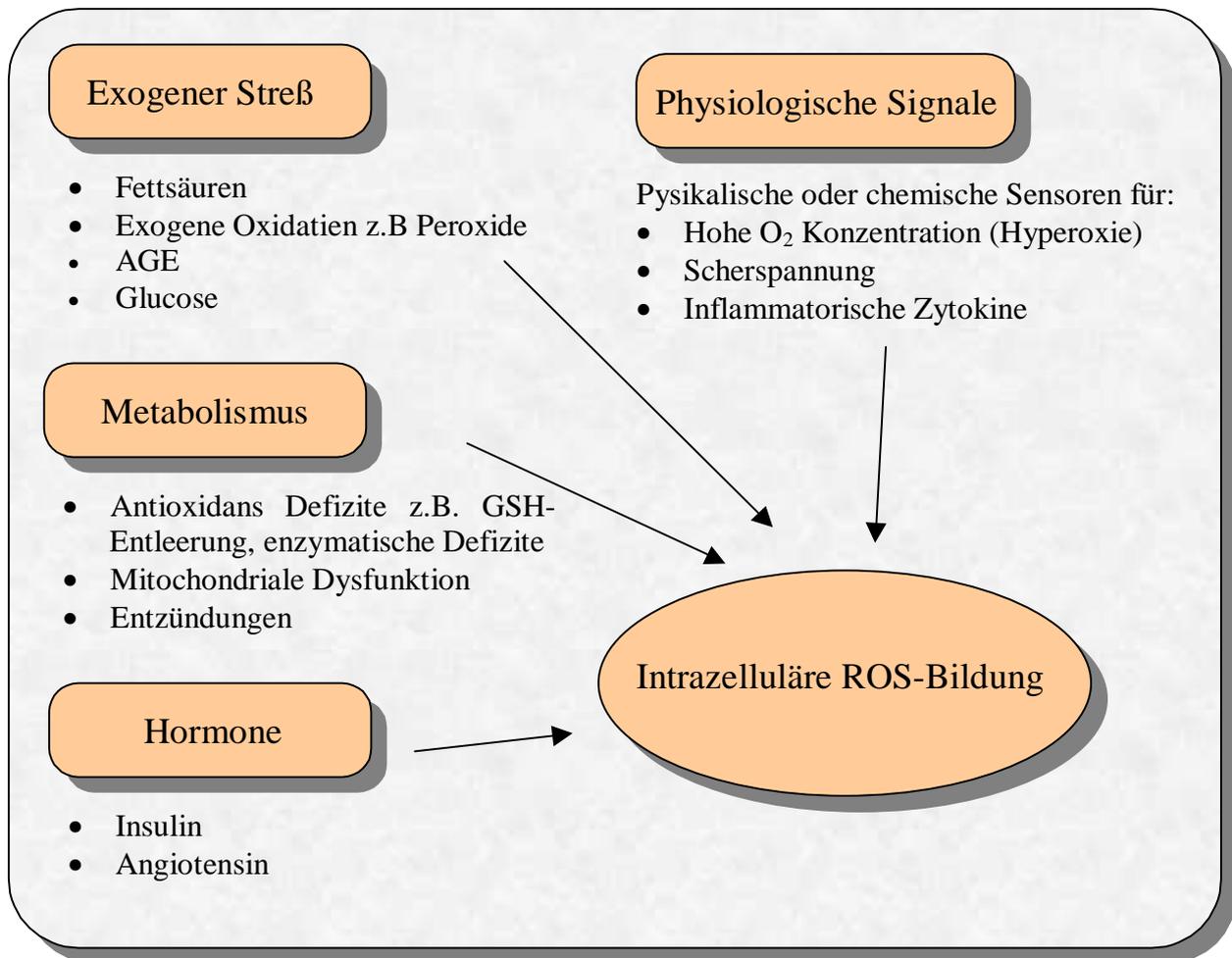
In weiteren Versuchen wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Anzahl der apoptotischen Zellen bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP im Laufe der acht Stunden kontinuierlich zunahm, wobei die Zeit offensichtlich für die Anzahl der apoptotischen Zellen wesentlich entscheidender als die Konzentration des Streßors ist. Dies unterstützt auch den angenommenen An/Aus Mechanismus der Apoptose [25] 20, ebenso wie die Tatsachen das einige Ereignisse in der Apoptose wie z.B. GSH-Pool Entleerung bzw. Oxidierung, Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$ , oder Ausstoß des Cytochrom-c ins Zytosol zu einer Selbstverstärkung des Signals führen. Sinn dieser sich selbstverstärkenden Vorgänge ist es, daß ab einem bestimmten Schädigungsgrad die Zellen unwiderruflich und schnell apoptotisch werden, sodaß keine Entzündung des umliegenden Gewebes auftritt. Die leichte Zunahme der Anzahl an apoptotischen Zellen bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP liegt vermutlich daran, daß vorgeschädigte oder schwache Zellen, die in nächster Zeit von alleine apoptotisch geworden wären, durch die zusätzliche Belastung sofort apoptotisch wurden.

### 4.1.1 Einfluß von t-BHP als exogener Streßor auf die intrazelluläre ROS-Bildung

Im zellulären Metabolismus entstehen ständig ROS; Hauptquelle ist die Atmungskette in den Mitochondrien, in der  $\text{O}_2$  reduziert wird. Dort entweichen ca. 1-5 % der Elektronen unkontrolliert aus den Enzymen und tragen zur Bildung von ROS bei LIT 1. Die Bildung von ROS kann wesentlich durch den Einfluß von Streßoren verstärkt werden, wobei ROS in unterschiedlichen Quellen generiert werden. Bedingungen die zur verstärkten Bildung von

ROS führen bezeichnet man als „oxidativen Streß“. In der Abbildung 4.2 sind verschiedene Ursachen dargestellt, die zu einer intrazellulären ROS-Generierung führen können.

Abbildung 4.2: Unterschiedliche Ursachen für intrazelluläre ROS-Bildung.



Unter anderem können exogenen Streßoren, metabolische Dyfunktionen, hormonelle Signale, aber auch physiologische Stimuli zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Generierung führen. Modifiziert nach Morel et al. [19]

Um die Auswirkung von t-BHP auf die intrazelluläre ROS-Konzentration zu untersuchen, wurden PAEC wie im Abschnitte 2.3.2 beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen an t-BHP inkubiert. Die intrazelluläre ROS-Konzentration stieg bei Inkubation der Zellen mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  in zwei Schüben an, wobei eine Zellpopulation mit leicht erhöhter ROS-Konzentration schon nach 15 min, eine weitere Zellpopulation mit stark erhöhter ROS-Konzentration nach ca. 30 min zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wurde bei 10  $\mu\text{M}$  nach 30 min lediglich eine leichte Erhöhung der ROS-Konzentration festgestellt, die zwar im

weiteren Verlauf der Inkubation zunahm, aber nicht das Niveau der stark erhöhten ROS-Konzentration nach dem zweiten Schub erreichte.

Literaturdaten und die hier beschriebenen Ergebnisse legen eine zweistufige Bildung von ROS durch PAEC nahe. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Sheng-Tanner et al. [42] an OCI/AML-Zellen, die durch  $\gamma$ -Bestrahlung oxidativen Streß ausgesetzt waren. Anhand simultaner multilaser Durchflußzytometrie konnten sie die ROS-Konzentration, das  $\Delta\Psi_M$  und den GSH-Gehalt der Zelle gleichzeitig erfassen. Dabei stellten sie fest, daß der anfängliche ROS-Anstieg von verstärkter GSH-Bildung begleitet wurde. In einer späteren Phase trat die Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  mit einem starken Anstieg der ROS-Konzentration und dem Verlust von GSH gleichzeitig auf. Eine zweistufige Zunahme der ROS-Konzentration konnten auch LIT 16 an HT22-Zellen feststellen, die durch Inkubation mit Glutamat oxidativen Streß ausgesetzt wurde. Die zweite starke Zunahme der ROS-Konzentration wurde durch Austreten des Cytochrom-c und der daraus resultierenden Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung an der Stelle des Komplexes III, verursacht [42, 95]. Die zweite Stufe des ROS-Anstiegs verstärkt in beiden Fällen in der Effektorphase die Apoptoseinduktion.

Über die Mechanismen, die in der ersten Stufe für die ROS-Bildung verantwortlich sind, können nur Vermutungen angestellt werden. Es liegt nahe, daß der erste leichte ROS-Anstieg in der Induktionsphase stattfindet und abhängig von der Art des oxidativen Streß ist. Dabei können ROS in unterschiedlichen Quellen generiert werden. Unter anderem können sie in den Mitochondrien, von der NADPH-Oxidase, der Monoamin-Oxygenase, der Xanthin-Oxidase, der Cytochrom P450 (CYP), der Mono-Oxygenase oder der iNOS erzeugt werden [17, 19, 33, 53]. Da einige Transkriptionsfaktoren ihre Eigenschaften in Abhängigkeit zum Redoxstatus der Zelle verändern und die ROS auch als „second messenger“ für viele Wachstums Faktoren oder Cytokine dienen, hat eine Überproduktion einen Einfluß auf die Expression verschiedener Gene [34, 35, 36, 19]. So können auch bei einem vermeintlich leichten ROS-Anstieg, wie bei Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M t-BHP, Zellveränderungen auftreten, die erst später zur Induktion der Apoptose führen.

Interessanterweise war bei Inkubation mit t-BHP zusätzlich die Bildung einer weiteren zytometrisch erfassbaren Zellpopulation mit stark erniedrigter ROS-Konzentration zu beobachten, die sich bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu$ M nach einer und bei 10  $\mu$ M erst nach sechs Stunden bildete. Der Grund für die Bildung dieser Zellpopulation mit stark erniedrigter Fluoreszenz ist nicht klar. Da sie frühestens nach einer Stunde auftrat, könnte es sich um Zellen handeln, die in der Degradationsphase der Apoptose sind und einen stark erniedrigten

Stoffwechsel aufweisen. Aber auch die Bildung von apoptotische Körperchen und die Zunahme der Anzahl an sekundär nekrotischen Zellen, bei denen die Zellmembran gerissen und und somit ein Austreten des Farbstoffes möglich ist, könnte von Bedeutung sein.

### 4.1.2 Wie verändert t-BHP den intrazelluläre Glutathiongehalt?

GSH in der Zelle reagiert mit Radikalen und Peroxiden und führt direkt oder indirekt zur Bildung von GSSG. Das Verhältnis von GSH zu GSSG kennzeichnet den Redoxstatus der Zelle. Ist der Redoxstatus stark in die oxidative Richtung verschoben, kann es zur Oxidation von Thiolen der PT-Poren und damit zur Öffnung der PT-Poren kommen [39, 79]. Die GSH-Konzentration wurde, wie im Abschnitt 2.5 beschrieben, biochemisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff MCB bestimmt, der spezifisch mit der Thiolgruppe des GSH reagiert.

Bei allen t-BHP-Konzentrationen, die untersucht wurden, war ein Anstieg des GSH-Gehaltes um ca. 75 % in den ersten 30 min zu beobachten. Wahrscheinlich ist dies auf die kompensatorische GSH-Neusynthese zurückzuführen, sodaß trotz erhöhter ROS-Konzentration der Redoxstatus konstant bleibt. Für diese Interpretation sprechen Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen [34-36]. Die Neusynthese von GSH wird mindestens von 3 Faktoren reguliert: 1. das  $\gamma$ -GCS Niveau in der Zelle, 2. die Verfügbarkeit von L-Cystein und 3. eine Feedback Inhibierung von  $\gamma$ -GCS durch GSH [34]. Aber auch eine Aktivierung durch Phosphorylierung oder Nitrosylierung der  $\gamma$ -GCS wird vermutet [34]. Das GSH/GSSG-Verhältnis von [100/1] wird bei oxidativen Streß schon durch eine leichte Erhöhung der GSSG-Konzentration stark beeinflusst. Da die GSSG-Konzentration durch enzymatische Regeneration nicht schnell genug zu GSH umgewandelt werden kann, wird die Sekretion von GSSG verstärkt, sodaß der Redoxstatus möglichst lange konstant bleibt [36]. Bei langanhaltendem oxidativen Streß geht GSSG in hohem Maße verloren, sodaß es zu einem Mangel an L-Cystein kommt, der eine weitere Synthese von GSH verhindert. Aufgrund der Beobachtung, daß bei Inkubation mit 10  $\mu$ M t-BHP die Zellen mit einem ähnlichen GSH-Anstieg reagierten wie bei den hohen Konzentrationen, wird der beschriebene Anstieg an GSH vermutlich das Maximum der gesteigerten GSH-Produktion darstellen. Eine höhere ROS-Generierung, wie sie bei t-BHP-Konzentrationen >10  $\mu$ M auftritt, könnte nicht mehr abgefangen werden, sodaß sich der Redoxstatus der Zelle verschiebt, was letztlich zur Induktion der Apoptose führt. Für diese Interpretation spricht auch, daß bei Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M t-BHP die GSH-Konzentration auf einem konstant hohem Niveau blieb,

während bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der GSH Gehalt nach vier Stunden, bei 100  $\mu\text{M}$  schon nach 30 min kontinuierlich zu sinken begann. Untersuchungen an OCI/AML-2 Zellen [42] legen nahe, daß nach anfänglichem Anstieg des GSH-Gehaltes durch oxidativen Streß die GSH-Konzentration während der Apoptose abnahm. Dies geschah erst, wenn die Zellen nach dem Verlust des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  sehr hohe ROS-Konzentration produzierten. Auch Macho et al. [39] konnten ein Anstieg der ROS-Konzentration erst nach Verlust des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  und nach Absinken des GSH-Gehaltes feststellen. Daher wird vermutet, daß bei der Apoptose nach dem Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  die verstärkt generierten ROS mit dem GSH abreagieren und es zu einem Verlust des intrazellulären GSH kommt [25, 42]. Dieser Effekt, aber auch der Mangel an L-Cystein waren vermutlich bei der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP größer als bei 50  $\mu\text{M}$  und daher auch der Grund für das frühere Absinken des GSH-Niveau.

Darüberhinaus nimmt durch die Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  die NAD(P) $\text{H}_2$  und ATP-Konzentration ab, was sowohl die Regeneration des GSSG als auch die Neusynthese von GSH beeinträchtigt, sodaß diese Effekte die Apoptoseinduktion verstärken [25]. Bei Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP kann die kompensatorische Erhöhung des GSH-Gehaltes eine Veränderung des Redoxstatus verhindern und schützt so die Zellen vor der Apoptoseinduktion.

### 4.1.3 Einfluß von t-BHP auf das Mitochondrienmembranpotentials

Die Mitochondrien spielen durch Öffnung der Permeabilitätstransitionsporen (PT-Poren) eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Um zu überprüfen in welchem Maße die Generierung von ROS und die Verminderung des GSH Pools einen Einfluß auf das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  haben, wurden der Einfluß von t-BHP auf das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  in PAEC untersucht.

Bei der Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  t-BHP hatten nach acht Stunden zwar 38 % der Zellen ein erniedrigtes  $\Delta\Psi_{\text{M}}$ , aber nur 15 % der Zellen waren nach dieser Zeit apoptotisch oder nekrotisch. Diese Beobachtungen zeigen, daß einer leichte Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  nicht zwangsläufig zur Apoptose führen muß. In ähnlicher Weise beobachteten Minamikawa et al. [54] an Humaneosteosarcomazellen, die für sechs Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  CCCP inkubiert wurden, daß die PT und das Anschwellen der Mitochondrien auch reversibel induziert werden kann, ohne Apoptose oder Nekrose auszulösen.

Bei Inkubation der Zellen mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP wiesen 70 % (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 93 % (100  $\mu\text{M}$ ) der Zellen nach acht Stunden eine Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  auf, 38 % (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 65 % (100  $\mu\text{M}$ ) der Zellen waren nach dieser Zeit apoptotisch oder nekrotisch. Auch Sheng-Tanner et al. [42] konnten an den OCI/AML-2 Zellen während der durch oxidativen Streß induzierte Apoptose eine PT feststellen. Ebenso konnten Yang et al. [40] an isolierten Mitochondrien eine t-BHP induzierte Erniedrigung der  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  beobachten.

Die Messung einer leichten Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  in Zellen kann daher rühren, daß einzelne Mitochondrien in der Zelle oder Teile der Mitochondrien ganz das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  verlieren, sodaß an diesen Stellen die Mitochondrien reißen und Cytochrom-c und AIF austreten können, obwohl das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  der Mehrzahl der Mitochondrien nicht beeinträchtigt ist. Eine leicht Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  in den Zellen kann aber auch dadurch hervorgerufen werden, daß viele Mitochondrien eine leichte Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  aufweisen, ohne Cytochrom-c zu verlieren und aufzureißen. Daher scheint vor allem die Länge und Intensität der PT entscheidend zu sein, ob ein bestimmtes Außmass überschritten wird, um den irreversibel Übergang in die Apoptose bzw. Nekrose einzuleiten [25].

Die anfängliche leichte Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  bei Inkubation mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP ist Voraussetzung für die Induktion der Apoptose, denn durch eine massive Induktion der PT und direkter Zerstörung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  mit gleichzeitigem schnellem Verlust von ATP, NAD(P) $\text{H}_2$  und GSH würde zur es bioenergetischen Katastrophe kommen, die zur Nekrose führt [39]. Erst in der Endphase der Apoptose, nachdem die Zellen fragmentiert als „apoptotic bodys“ vorliegen, ist das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  vollkommen zerstört [39].

#### 4.1.4 Auslösen der Degradations Phase durch Cytochrom-c

In Mitochondrien ist das Cytochrom-c elektrostatisch an der Aussenseit der inneren Mitochondrienmembran gebunden. Durch Freisetzen des Cytochrom-c und AIF ins Zytosol während der Effektorphase wird die Degradationsphase ausgelöst. Es erfolgt die Initiierung der Caspasekaskade, die unter anderem zur Fragmentierung der DNA und des Zytoskletts führt [32, 23, 82-86].

Mit Hilfe eines immunochemischen Nachweises, der im Abschnitt 2.5 beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, daß bei Inkubation von Endothelzellen mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP schon nach einer Stunde eine Translokation von Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Zytosol erfolgte.

Daß Cytochrom-c bereits zu diesem Zeitpunkt austrat, lässt vermuten, daß sich einige Zellen schon nach einer Stunde in der Degradationsphase befanden. Der genaue Mechanismus durch den Cytochrom-c während der Effektorphase freigesetzt wird, ist noch unklar.

Nach [23, 40] sind das Anschwellen und Reißen der Mitochondrien nach der Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  ausreichend, um Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Zytosol freizusetzen. Allerdings konnten Krohn et al.[55] zeigen, daß in Rattenhippocampusneuronen, die mit 300 nM Staurosporin inkubiert wurden, eine Freilassung von Cytochrom-c ohne Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  festzustellen war. Da Cytochrom-c nur die äußere mitochondriale Membran queren muss, kann es vielleicht durch eine noch unbekannte Pore oder durch eine bekannte Pore mit einem noch unbekanntem Mechanismus austreten [32]. Ebenso wird diskutiert ob die VDAC Poren dazu dienen können, zumal eine Interaktion von Cytochrom-c mit VDAC von Narita et al. [56, 96] beobachtet wurde. Da auch BAX und BAK einen Einfluß auf die Bildung der PT-Poren haben, könnten auch sie eine Rolle bei der Translokation von Cytochrom-c spielen [32]. Das Cytochrom-c auch in der Lage ist im Zytosol die Caspasekaskade zu aktivieren, wurde (Rösen et al. pers. Mitteilung) an PAEC, die mit t-BHP inkubiert wurden, durch eine Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-9 festgestellt.

### 4.1.5 Einfluß von Radikalfänger auf die Induktion der Apoptose

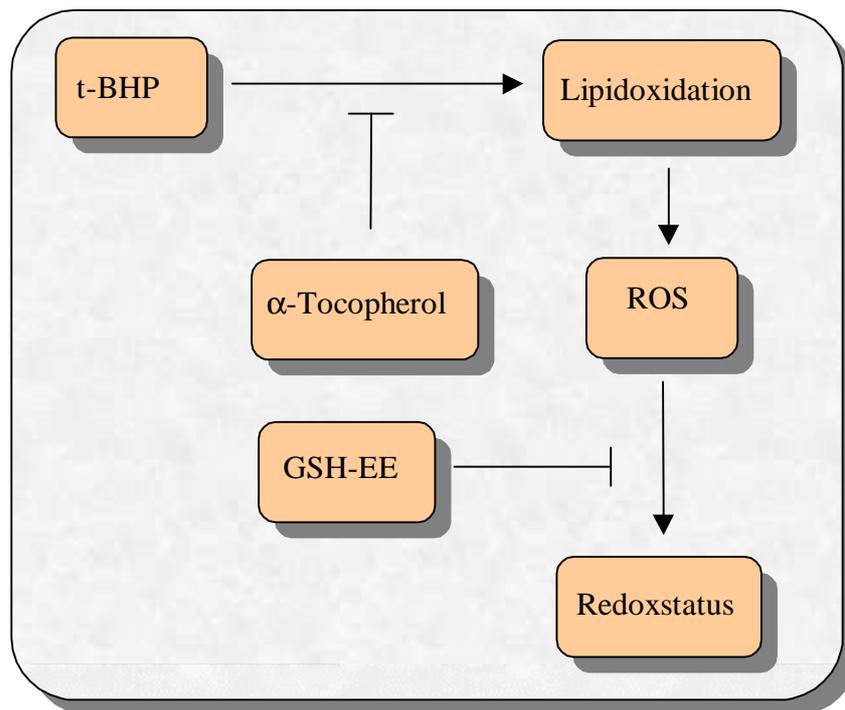
Ziel dieser Experimente war es zu untersuchen, ob und in welchem Maße die Antioxidationsmittel  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE geeignet sind, den oxidativen Streß zu vermindern und festzustellen, welche Auswirkung das auf die Induktion der Apoptose hat.  $\alpha$ -Tocopherol ist ein lipophiles Antioxidans, das freie Radikale abfängt und dadurch die Lipidperoxidation zu verhindern vermag. Es schützt mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Proteinthiole vor Oxidation und trägt zur Erhaltung der Integrität und Funktion der Membranen bei LIT 23 (28). GSH-EE ist ein wasserlöslicher Radikalfänger, der Zellmembranen durchdringen kann und in der Zelle zu GSH und Ethanol gespalten wird LIT 36 (18). Dadurch wird der GSH-Pool vergrößert, das Potential der Zelle zur Inaktivierung von ROS vergrößert und Proteine vor S-Thiolation geschützt.

PAEC wurden, wie in den Abschnitten 2.3 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE vorinkubiert und anschließend durch Inkubation mit t-BHP oxidativem Streß ausgesetzt. Es zeigte sich, daß die Stärke des oxidativen Stresses und die Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  verringert

werden konnten. Ebenso konnte das Austreten von Cytochrom-c ins Zytosol reduziert werden und eine Erniedrigung der Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet werden.

Dies geht einher mit Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen. So konnten Du et al. [17] zeigen, daß der Hyperglykämie bedingte Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration in HUVEC durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol verhindert wird. Weiterhin wurde beschrieben, daß  $\alpha$ -Tocopherol die durch Lipopolysaccharide induzierte Apoptose in HUVEC reduziert [57, 97]. Ebenso wurden U973 Zellen durch  $\alpha$ -Tocopherol und GSH vor oxidativem Streß geschützt, der durch Inkubation mit 7-Ketocholesterol verursacht wurde [50]. Morias et al. [57] stellten bei Synaptosomen, die durch Inkubation mit Ascorbat/Eisen oxidativem Streß ausgesetzt waren, eine Verringerung der oxidativen Schäden fest, wenn die Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE vorinkubiert wurden.

Abbildung 4.3: Protektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE.



Das lipophile  $\alpha$ -Tocopherol schützt vor Lipidoxidation in den Zellmembranen und verringert so die Entstehung von ROS. Das GSH-EE vergrößert den intrazellulären GSH-Pool und kann so länger den Redoxstatus im Gleichgewicht halten.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die protektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol größer ist als die von GSH-EE. Diese bessere Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber GSH-EE könnte darin liegen, daß das lipophile  $\alpha$ -Tocopherol Zellmembranen besser vor dem ebenfalls lipophilen t-BHP schützen kann. Dadurch wurden ROS frühzeitig in der Zellmembran abgefangen, sodaß zum einen der oxidative Streß, der zu intrazellulären ROS-Generierung führt und zum anderen die Induktion der Apoptose verringert wird.

Die protektive Wirkung von GSH-EE beruht vermutlich auf der Vergrößerung des GSH-Pools, sodaß der intrazelluläre Redoxschutz verstärkt wird und somit der Redoxstatus länger stabil bleibt [57](30). Der verstärkte Schutz gegen intrazelluläre ROS geht mit einer verringerten Induktion der Apoptose einher.

### **4.2 Auswirkungen von Hyperglykämie auf Endothelzellen**

Charakteristisch für den Diabetes mellitus ist die Hyperglykämie, wodurch oxidativer Streß auf das Endothel ausgeübt wird. Es wurde in vorausgehenden Untersuchungen gezeigt, daß Hyperglykämie auch in der Lage ist, Apoptose in Humanbauchnabelvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cell [HUVEC]) [17, 52], Humanaorten-Endothelzellen (human aortic endothelial cell [HAEC]) [58] und Rinderaorten-Endothelzellen (bovine aortic endothelial cell [BAEC]) [33] zu induzieren. Der Mechanismus der Hyperglykämie induzierten Apoptose ist allerdings noch nicht geklärt. Es wurde gezeigt, daß es in Endothelzellen durch erhöhte Glucosekonzentration direkt zu einem Anstieg der ROS kam [17, 52]. Aber auch indirekt durch Folgeprodukte der Hyperglykämie, wie z.B. glykosilierte Proteine und AGE Produkte, kommt es zu einem Anstieg der ROS-Bildung [33, 59]. Verstärkt werden könnte dieser, durch den Diabetes mellitus bedingte oxidative Streß, durch die Verminderung des oxidativen Schutzes, wie es im Blut diabetischer Patienten und in Aorten diabetischer Tieren beobachtet wurde [36, 98, 99]. Auch epidemiologische Untersuchungen, die zeigen, daß Antioxidantien das Risiko an Gefäßkrankheiten zu erkranken verringern, weisen darauf hin, daß der oxidative Streß beim Diabetes mellitus von physiologischer Bedeutung sein könnte [18, 52, 101-102].

Um die Bedeutung von Hyperglykämie als eine Quelle von oxidativen Streß zu untersuchen, sollte in diesem Teil der Arbeit geklärt werden, welche Auswirkungen die Hyperglykämie auf

PAEC hat. Daher wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen, die intrazelluläre ROS-Konzentration, der GSH-Gehalt der Zellen, das Membranpotential der Mitochondrien und die Translokation von Cytochrom-c in das Zytsol bestimmt.

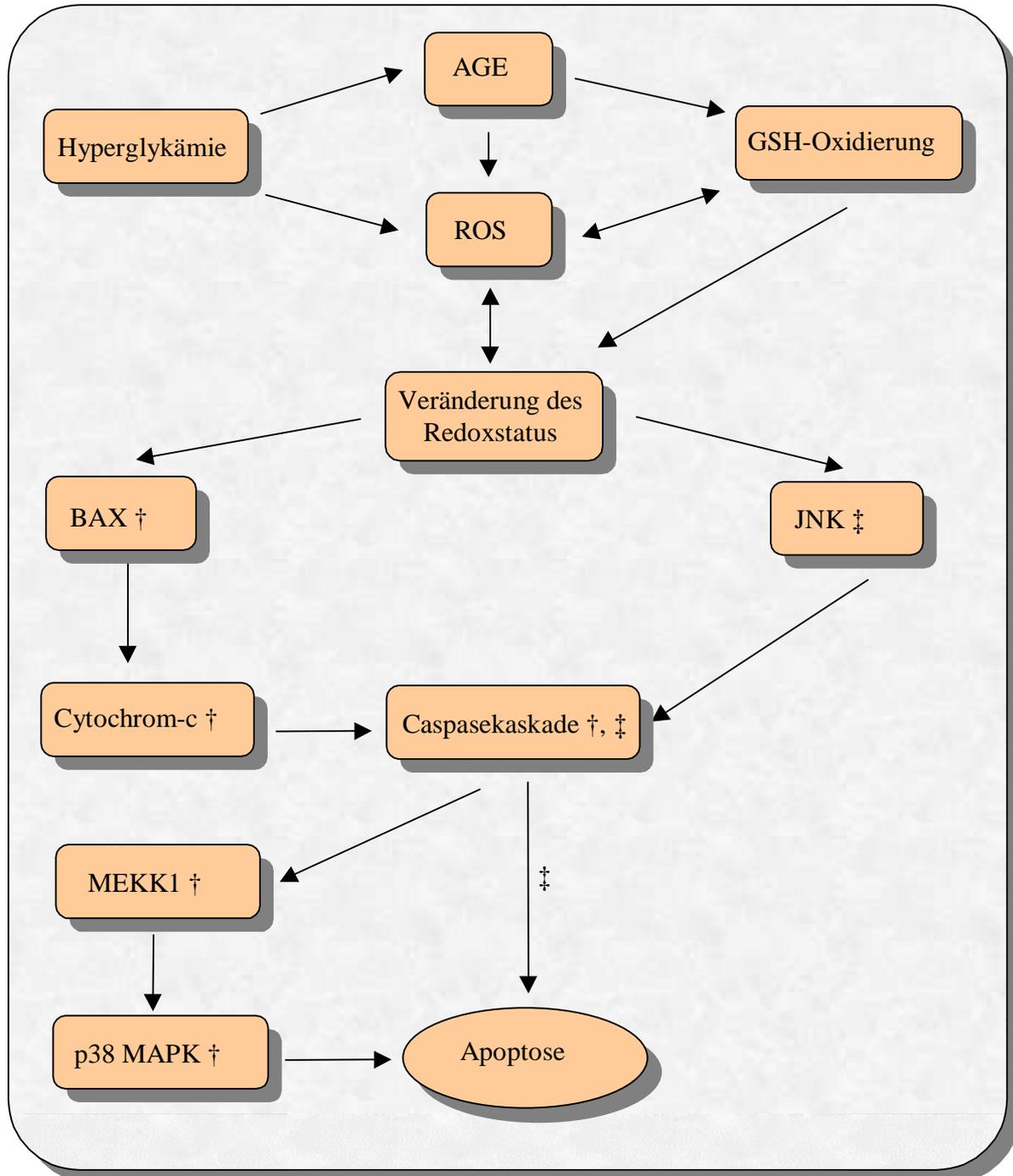
Bei Inkubation von PAEC mit 30 mmol/l Glucose konnte im Gegensatz zu HUVEC [17, 52] und BAEC [33] keine signifikanten Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration festgestellt werden. Der Grund für diese unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Endothelzellen ist bisher nicht bekannt. Speziesunterschiede sind eine mögliche Ursache für das differente Verhalten der verschiedenen Endothelzellen. Nishikawa et. al [33] vermuten, daß aufgrund eines höheren Stoffwechsels ein verstärktes  $\Delta\Psi_M$  zu einer verstärkten Generierung von ROS führt. Diese Hypothese würde durch die Beobachtung gestützt, daß Hyperglykämie bei PAEC zu einem verstärkten  $\Delta\Psi_M$  führt. Eine weitere Quelle der ROS-Bildung kann die Aktivierung der iNOS darstellen, wie bei HUVEC festgestellt wurde [17].

Die Tatsache, daß es aber auch bei PAEC zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes um 40% innerhalb von sieben Tagen bei Inkubation mit hyperglykämischen Glucosekonzentrationen kommt, deutet daraufhin, daß Hyperglykämie auch auf PAEC einen gewissen oxidativen Streß ausübt, der aber durch eine verstärkte GSH Neusynthese kompensiert werden kann. Ähnlich wurde auch in HUVEC nach Inkubation mit hohen Glucosekonzentrationen eine Verstärkung des Redoxschutzes beobachtet [21]. Allerdings sind HUVEC nicht in der Lage bei Hyperglykämie den GSH-Pool zu vergrößern [21, 102], stattdessen wird eine Erhöhung der CuZnSOD (Kupfer-Zink-Superoxidismutase), der Catalase und der GPX (Glutathionperoxidase) beobachtet [21]. Da diese Erhöhung antioxidativer Enzyme erst nach einigen Tagen einsetzt, sind HUVEC zu Beginn einer stärkeren oxidativen Belastung ausgesetzt als PAEC, die innerhalb von Minuten den GSH-Gehalt vergrößern können. Ich vermute daher, daß PAEC den Hyperglykämie bedingten oxidativen Streß durch GSH-Neusynthese kompensieren können, sodaß es zu keiner Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration kommen kann.

Chronische Hyperglykämie führt allerdings zu einer Verringerung des GSH-Gehalt, wie aus der Beobachtung folgt, daß diabetische Patienten einen erniedrigten GSH-Gehalt im Blut aufweisen und daß Aortenendothelzellen diabetischer Tiere einen verkleinerten GSH-Pool besitzen [36, 98, 99]. Als Grund wird die Glykosilierung und Inaktivierung der  $\gamma$ -GCS durch Hyperglykämie vermutet [36]. Dieser Schluß wird durch die Beobachtung bestärkt, daß auch an anderen zytoplasmatischen Enzymen der Erythrozyten eine Glykosilierung festgestellt

werden konnte wie z.B. an der Carboanhydrase [36, 103] und an der CuZnSOD [36, 104]. Auch die Beobachtung, daß Aminoguanidin, das die Glycosilierung in Proteinen verhindert [36, 106, 107], in K562-Zellen eine Verminderung des GSH-Spiegels durch Hyperglykämie verhindern konnte, scheint diese Schlußfolgerung zu bestätigen [36].

Abbildung 4.4: Hypothetische Signalwege der Hyperglykämie induzierten Apoptose.



Durch Hyperglykämie kommt es zur Bildung von AGE; diese AGEs, die Autooxidation der Glucose und der gesteigerte Stoffwechsel führen zur verstärkten Generierung von ROS. Dies und die Glycosylierung von GSH-synthetisierenden Proteinen beeinträchtigen den GSH-Gehalt

und den Redoxstatus der Zelle. Dadurch kommt es zur Veränderung des BAX/BCI-2 Gleichgewichtes, was zum Austritt von Cytochrom-c führt. Das führt zur Initiierung der Caspasekaskade und damit zur Aktivierung der MEKK 1, die über die p38 MAPK zum Zelltod durch Apoptose führt. Es wurde aber auch eine Aktivierung der JNK Kinase gezeigt, die ebenfalls über Aktivierung der Caspasekaskade zu Apoptose führt. Modifiziert nach Ho et al. ‡ [52] und Nakagami et al. † [58].

Du et al. [17] und Ho et al. [52] konnten bei Hyperglykämie eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen bei HUVEC feststellen. Ebenso wurde eine Erhöhung der Anzahl an apoptotischer HAEC nach Inkubation mit 25 mM Glucose festgestellt [58]. Nakagami et al. [58] vermuteten, daß die Hyperglykämie eine Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration zur Folge hat, die über eine Aktivierung der SAPK/JNK zur Induktion der Caspasekaskade durch die Caspase-3 und zur Induktion der Apoptose führt.

Ho et al. postulierten aufgrund der Beobachtung der Translokation von BAX, daß hierdurch eine Schädigung der Mitochondrien und damit eine Freisetzung von Cytochrom-c erfolgt. Sie postulierten weiter, daß die Freisetzung von Cytochrom-c die Caspasekaskade aktiviert, die über die Phosphorylierung und Aktivierung von p38 MAK verursacht und damit die Induktion der Apoptose einleitet [52].

Die eigenen Untersuchungen an PAEC zeigen im Gegensatz zu den oben dargestellten Befunden, daß auch nach siebentägiger Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen weder eine Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$ , noch eine Translokation von Cytochrom-c in das Zytosol erfolgt. Auch eine Zunahme der Anzahl an apoptotischen Zellen konnte folglich nicht beobachtet werden. In PAEC vermochte der durch Hyperglykämie verursachte oxidative Streß weder eine starke Oxidation des GSH-Pools, noch eine Verminderung des  $\Delta\Psi_M$ , noch die Induktion von Apoptose bewirken.

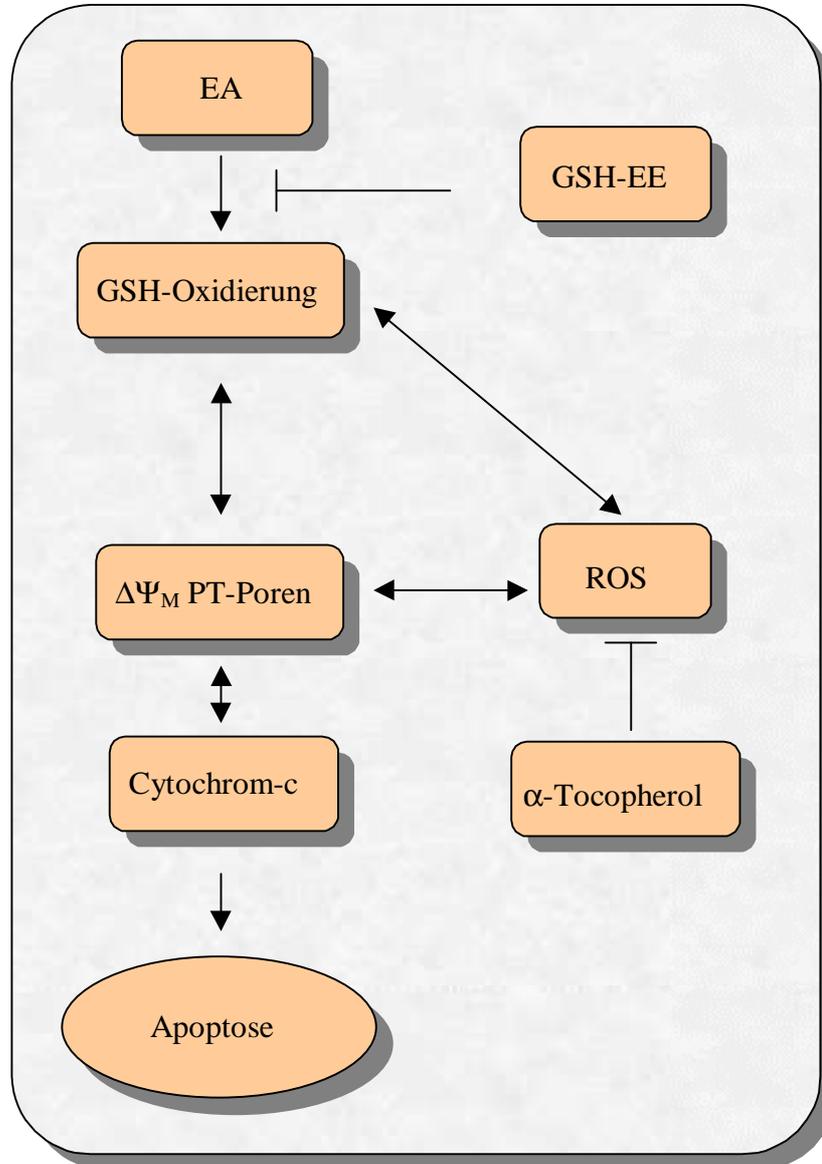
### 4.3 Die Oxidation des GSH-Pools führt zur Apoptose

Zur Verifizierung der Hypothese, daß die Oxidation des GSH-Pools in PAEC zu einer Induktion von Apoptose führt, wurden die Zellen mit EA inkubiert. Dieser Stoff wird, katalysiert von der Glutathion-S-transferase, an GSH konjugiert und führt zu einer schnellen Entleerung des mitochondrialen und zytoplasmatischen GSH-Pools [48].

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Inkubation von PAEC mit 100  $\mu$ M EA auf die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen, die ROS-Konzentration, die Oxidierung des GSH-Pools, das  $\Delta\Psi_M$ , und die Lokalisation von Cytochrom-c ausübt. Weiterhin sollte

untersucht werden, ob die Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE zytoprotektiv wirken. In Abbildung 4.5 ist der vermutete Signalweg dargestellt.

Abbildung 4.5: Signalmechanismus der EA induzierten Apoptose.



In dieser Abbildung wird der Vermutete Signalmechanismus der EA induzierten Apoptose bei PAEC gezeigt. Durch Inkubation mit EA kommt es zu einer Entleerung und Oxidierung des GSH-Pools der Zelle, die eine Veränderung des Redoxstatus zur Folge hat. Dadurch kommt es einmal, zu einem verringerten oxidativen Schutz, sodaß weniger ROS deaktiviert werden können und es öffnen sich die redoxsensitiven PT Poren, sodaß es zu einer Verringerung des  $\Delta\Psi_M$  kommt. Aufgrund des erniedrigten Potentials tritt Cytochrom-c ins Zytosol aus und generiert dort zum einen ROS und zum anderen aktiviert es die Caspasekaskade die zur Induktion der Apoptose führt. Durch Vergrößerung des GSH-Gehaltes der Zelle durch Inkubation mit GSH-EE wird die Induktionphase der Apoptose verlängert. Daher ist es wirksamer als  $\alpha$ -Tocopherol, welches die verstärkte ROS-Bildung als lipophiles Antioxidans schlechter verzögern kann.

Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde beobachtet, daß durch die Oxidation des GSH-Pools mit EA schnell und in starkem Ausmaß Apoptose induziert wurde. Die toxische Wirkung einer Inkubation der Zellen mit EA war stärker als mit t-BHP. Trotzdem wurde keine Erhöhung der Anzahl an nekrotischen Zellen festgestellt.

Weiterhin wurde bei Inkubation der Zellen mit EA nach einer Stunde eine starke Zunahme und ein anschließendes starkes Absinken der ROS-Konzentration beobachtet. Im Gegensatz zu der Inkubation mit t-BHP, bei der sich Zellpopulationen verschiedener Intensitätsstufen bildeten, verhielten sich die Zellen bei Inkubation mit EA homogener und bildeten nur eine Zellpopulation. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß EA einen stärkeren toxischen Reiz auf die PAEC ausübt als t-BHP, sodaß die Zellen gleichzeitig apoptotisch wurden.

Wüllner et.al [48] konnten bei Inkubation von Neuronalzellen mit 100  $\mu\text{M}$  EA ebenfalls einen Anstieg der ROS-Konzentration feststellen, der durch Hemmung des Komplexes I mit Rotenon unterdrückt wurde. Daher vermuteten sie, daß die Mitochondrien eine Quelle der durch EA induzierten ROS-Generierung sind. Dies wird durch die Beobachtung bestärkt, daß ca. 30 % der Zellen bereits nach einer Stunde ein erniedrigtes  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  aufwiesen. Die intensive ROS-Bildung wurde nach zwei Stunden von einer Reduktion an ROS abgelöst, deren Gründe unter 4.1.2 bereits diskutiert wurde.

Die Oxidation des GSH-Pools durch EA führte in den ersten 30 min zu einem gestiegenem GSH-Gehalt. Auch hier wurde der GSH-Pool vermutlich durch die kompensatorische Reaktion auf den oxidativen Streß vergrößert [34, 74]. Nach einer Stunde wurde eine Verringerung des GSH-Gehaltes festgestellt. Wüllner et al. [48] konnten an Neuronalzellen bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  EA ebenfalls ein kompensatorisches Steigen des GSH-Gehaltes ohne Beeinträchtigung der Vitalität beobachten.

Die Anzahl an Zellen mit erniedrigtem  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  nahm innerhalb der ersten drei Stunden stark zu und stieg schneller an, als bei Inkubation der Zellen mit t-BHP. Die Erniedrigung des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  bei Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  EA war bei den Neuronalzellen deutlich schneller und stärker als bei PAEC. Das deutet darauf hin, daß durch den schnellen Verlust des  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  die bioenergetische Katastrophe [25] zur Nekrose führte. Im Gegensatz dazu fiel das  $\Delta\Psi_{\text{M}}$  der PAEC bei Inkubation mit EA langsam genug ab, um ausreichend Energie für die apoptotischen Vorgänge zu erzeugen.

Durch Vorinkubation der Zellen mit GSH-EE und  $\alpha$ -Tocopherol konnte die Anzahl an apoptotischen Zellen verringert werden, wobei GSH-EE die Induktion der Apoptose stärker hemmte als  $\alpha$ -Tocopherol. Auch Wüllner et al. [48] konnten an Neuronalzellen nach Entleerung des GSH-Pools durch Vorinkubation mit GSH-EE eine verbesserte Vitalität feststellen. Im Gegensatz zur t-BHP induzierten Apoptose, bei der  $\alpha$ -Tocopherol eine bessere Wirkung als GSH-EE aufwies, zeigte sich bei der EA induzierten Apoptose ein besserer Schutz durch Vorinkubation mit GSH-EE.

Die Wirkung von GSH-EE beruht vermutlich auf der Vergrößerung des GSH-Pools, sodaß eine Induktion der Apoptose durch Oxidierung des Pools verlangsamt bzw hinausgeschoben wird. Der schützende Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol ist nicht so stark ausgeprägt, da es vor allem die Zellmembranen vor exogenen oxidativen Streß schützt, wie z.B. bei der t-BHP-Inkubation.

Zusammen genommen zeigen diese Versuch, daß eine schnelle Oxidation des GSH-Pools zu einer gezielten Induktion der Apoptose führt. Damit wird die Hypothese untermauert, daß eine Veränderung des Redoxstatus durch oxidativen Streß zur Induktion der Apoptose führen kann.

## 4.4 Zusammenfassung

Oxidativer Streß auf das Endothel ist eine Ursache der endothelialen Dysfunktion, die zu verschiedenen Gefäßkrankheiten führt. In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch oxidativen Streß näher untersucht werden. Dazu wurden kultivierte Schweineaorten-Endothelzellen (pork aortic endothelial cell [PAEC]) mit tert-Butylhydroperoxid (t-BHP) inkubiert.

Folgender Ablauf von zellulären Ereignissen wurde dabei beobachtet: eine Veränderung der intrazellulären Konzentration an Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, [ROS]) und Glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycin, [GSH]), eine Erniedrigung des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ), eine Translokation von Cytochrom-c in das Zytosol, eine Aktivierung der Caspasekaskade und das Auftreten von apoptotischen Zellen, die langfristig in sekundär nekrotische Zellen übergehen. In Übereinstimmung mit der Hypothese, daß intrazellulärer oxidativer Streß Ursache der Apoptoseinduktion ist, konnten die intrazelluläre ROS-Konzentration, die Verringerung des  $\Delta\Psi_M$  und die Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit den antioxidativ wirkenden Stoffe  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathionethylester (GSH-EE) partiell inhibiert werden.

Um die Rolle des zellulären Redoxschutzes bei der Induktion der Apoptose näher zu charakterisieren wurden PAEC mit den Streßoren t-BHP und Ethacrylsäure (EA) oxidativ belastet und die Veränderungen des intrazellulären ROS- und GSH-Gehaltes bestimmt. Dabei interpretiere ich die anfängliche Erhöhung des zellulären GSH-Gehaltes bei oxidativem Streß, als eine kompensatorische Reaktion, um die erhöhte oxidative Belastung der Zelle auszugleichen. Die sich anschließende Verringerung des zellulären GSH-Gehaltes und Erniedrigung der ROS-Konzentration findet gleichzeitig mit dem Abbau der zellulären Strukturen während der Degradationsphase der Apoptose statt.

Durch Inkubation von PAEC mit hohen Glucosekonzentrationen, als Modell der Hyperglykämie, sollte überprüft werden, ob Hyperglykämie eine oxidative Belastung auf die Endothelzellen ausübt. Auch unter hyperglykämischer Belastung vergrößerten die Zellen ihren GSH-Pool, es konnte aber weder eine erhöhte Konzentration an ROS, eine Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$ , eine Translokation von Cytochrom-c, noch die Induktion der Apoptose beobachtet werden. Ich schließe daraus, daß Hyperglykämie zwar eine oxidative Belastung der Zellen verursacht, diese aber durch Erhöhung des GSH-Gehaltes kompensiert werden kann.

Zusammenfassend wurde in der Arbeit gezeigt, daß es durch oxidative Belastung der Endothelzellen mit t-BHP zu einer Überschreitung der Kapazität des zellulären Redoxpuffers GSH kommt, die zur Induktion der Apoptose führt. Diese Beobachtungen könnten bei der Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion und der verschiedenen Gefäßkrankheiten mit von Bedeutung sein.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis:

AGE	Advanced glycosylated endproducts
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	Adenin nucleotid translocator
AP-1	Activator protein-1
APAF-1	Apoptosis protease activating factor-1
ATP	Adenosin triphosphat
BAEC	Rinderaorten-Endothelzellen (bovine aortic endothelial cell)
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydraz
DCF	Dichlorfluorescein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethacrylsäure
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycin)
GSH-EE	Glutathionethylester
GSSG	Glutathiondisulfid
HAEC	Humanaorten-Endothelzellen (human aortic endothelial cell)
H <sub>2</sub> DCFDA	Dihydrodichlorfluoresceindiacetat
H <sub>2</sub> DCF	Dihydrodichlorfluorescein
HUVEC	Humanbauchnabelvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cell)
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3',-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid
P38 MAK	p 38 mitogen activated protein kinase
MCB	Monochlorbiman
MEKK-1	MAPK kinase-1
MLR	Multiple lineare regression

$\Delta\Psi_M$	mitochondriales Membranpotential
NADPH	Nicotinamid adenin dinucleotid phosphorsäure
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
ox LDL	Oxidised low density lipoproteins
PAEC	Schweineaort-Endothelzellen (porcine aortic endothelial cells)
PBS	Phosphat bufferd saline
PIP	Propidium Iodid (3,8-Diamino-6-phenyl-5-(3-diethylaminopropyl)-phenanthridinumjodid-methiodi]
PT	Permeabilitätstransition
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	Reactive oxygen spezies
SAPK/JNK	Stress activated protein kinases/c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
t-BHP	tert-Butylhydroperoxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris Tween bufferd saline
VDAC	Voltage dependet anion channel

## 5.2 Lösungen und Material

### Lösungen und Puffer:

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Millipore Wasser angesetzt.

Medium M1:	500 ml M 199 Medium (Sigma Deisenhofen, D) 50 ml fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom Berlin, D) 22 ml Supplement 250 mg L-Glutamin (Sigma Deisenhofen, D)
FCS freies Medium M2:	500 ml M 199 Medium 20 ml Supplement 250 mg L-Glutamin

## Oxidativer Streß induzierte Apoptose in Endothelzellen

---

30 mM Glucose Medium M3:	20,4 µl 1,25 M Glucose in PBS pH 7,4/ml Medium M1
Supplement:	0,34 M HEPES (Roth Karlsruhe, D) 100 mg/l Streptomycin Sulfat (Sigma Deisenhofen, D) 100 mg/l Penicillin G Sulfat (Sigma Deisenhofen, D) in PBS pH 7,4
Waschpuffer:	80 mg/l Streptomycin Sulfat 80 mg/l Penicillin G Sulfat in PBS pH 7,4
Aufbewahrungsmedium:	50 % v/v Medium 50 % v/v PBS pH 7,4 80 mg/l Streptomycin Sulfat 80 mg/l Penicillin G Sulfat
Dispaselösung:	400 ml FCS freies Medium 400 mg Dispase (Roche Mannheim, D)
Fertigpulver (Sigma Deisenhofen, D)	
PBS:	1,45 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 2,68 mM KCl 0,13 M NaCl
Trypsinlösung:	500 mg/l Trypsin (Sigma Deisenhofen, D) 200 mg/l EDTA (Sigma Deisenhofen, D) in PBS pH 7,4
Gelatinelösung:	0,2 % w/v Gelatine (Sigma Deisenhofen, D)

t-BHP Lösung (Sigma Deisenhofen, D)

Endkonzentration im Medium 10, 20, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$

15 mM  $\alpha$ -Tocopherol (Sigma Deisenhofen, D) in Ethanol

Endkonzentration im Medium 150  $\mu\text{M}$

100 mM Glutathionethyllester (GSH-EE) (Sigma Deisenhofen, D) in PBS

Endkonzentration im Medium 1 mM

10 mM Ethacrylsäure (EA) (Sigma Deisenhofen, D) in Ethanol

Endkonzentration im Medium 100  $\mu\text{M}$

1 mM  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (Roche Mannheim, D) in DMSO

Endkonzentration im Medium 10  $\mu\text{M}$  (Roche Mannheim, D)

1 mM JC-1 (Molekular Probes Leiden, NE) in DMSO

Endkonzentration im Medium 10  $\mu\text{M}$

Annexin V-FLUOS Staining Kit: (Roche Mannheim, D)

- Fluoreszenzfarbstofflösung

- HEPES-Bindungspuffer

SDS-Proben Puffer:

2,5 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8 (Merck Darmstadt D)

2,0 ml Glycerol (Sigma Deisenhofen, D)

4,0 ml 10% w/v SDS (Merck Darmstadt D)

0,5 ml 0,1% w/v Bromphenolblau (Merck Darmstadt D)

1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  Millipore

DTT-Lösung:

2 M DTT (Sigma Deisenhofen, D)

Anodenpuffer I:

300 mM Tris

20% v/v Methanol (Merck Darmstadt D)

## Oxidativer Streß induzierte Apoptose in Endothelzellen

---

Anodenpuffer II:	25 mM Tris 20% v/v Methanol
Kathodenpuffer:	40 mM 6-Aminohexansäure (Sigma Deisenhofen, D) 0,01 % w/v SDS 20% v/v Methanol
Waschpuffer (TTBS) pH 7,5:	500 mM NaCl (Merck Darmstadt D) 20 mM Tris 0,1 % v/v Tween 20 (Merck Darmstadt D)
Blockierlösung:	5 % w/v Magermilchpulver in TTBS
Lysispuffer:	1 % w/v Triton (Roth Karlsruhe, D) in PBS pH 7,4
MCB Lösung:	2 mM MCB (Molekular Probes Leiden, NE) in PBS pH 7,4; Endkonzentration 20 µM
Ersten Antikörper: Anti Cytochrom c Kaninchen polyclonal Santa Cruz, USA)	(Santa Cruz Biotechnology)
Zweite Antikörper: Anti Kanichen IgG-Peroxidase	(Roche Mannheim, D)
Lumi-Light Western Blotting Kit: -Peroxidlösung -Entwicklungslösung	(Roche Mannheim, D)

### Geräte:

Begasungsbrutschrank: Serie 6000	(Heraeus Hanau, D)
Werkbank: Lamin-Air HB 2448	(Heraeus Hanau, D)
Zentrifuge: Megafuge 2.0 R	(Heraeus Hanau, D)
Mikroskop: Leica DM-IRB	(Leitz Köln, D)
Durchflußzytometer FACS	(Becton Dickinson Heidelberg, D)
Fluoreszenzmikrotiterplattereader: Fluostar-P	(SLT Salzburg, A)
Stromgeber: EPS 3500 XL	(Pharmacia Uppsala, S)
Elektrophorese-Apparatur: Multiphor II	(Pharmacia Uppsala, S)
Dryblot-Apparatur: Nova Blot	(Pharmacia Uppsala, S)
Lmiimager	(Roche Mannheim, D)

### Verbrauchsmaterial:

Durchflußzytometerröhrchen	(Falcon, Heidelberg, D)
Falcons	(Falcon, Heidelberg, D)
96 Loch-Fluoreszenzmikrotiterplatte USA)	(Dynex Technologies Chanlilly, USA)
24 Loch Platten	(Corning New York, USA)
Zellkulturflasche 12,5, 25 cm <sup>2</sup>	(Falcon, Heidelberg, D)
ExelGel SDS, gradient 8-18%	(Pharmacia Uppsala, S)
Gelpufferstreifen	(Pharmacia Uppsala, S)
PVDF Membran	(Schleicher & Schüller Dassel, D)
Filterpapier	(Pharmacia Uppsala, S)
Papierstücke	(Pharmacia Uppsala, S)
Reaktionsgefäße	(Eppendorf Hamburg, D)
1 ml Insulispitze Gauge 29	(Becton Dickinson Heidelberg, D)
Zellschaber USA)	(Dynex Technologies Chanlilly, USA)

### Programme:

Microsoft Word 97	(Microsoft Seattle, USA)
Microsoft Exel 97	(Microsoft Seattle, USA)
Lumianlayst Programm	(Roche Mannheim, D)
WinMDI 2.8	(Joseph Trotte, USA)

### 5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 zur Abbildung 3.2: Zunahme der Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP für vier Stunden.

Konzentration	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen
t-BHP [ $\mu$ M]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem
0	7	2	0,5	1,2
10	8	2	0,3	0,4
50	22	2	0,6	2,8
100	29	10	5,7	1,6
500	52	24	2,7	1,8

Tabelle 3.2 zur Abbildung 3.3: Zunahme der nekrotischen und apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP, Abbildung 3.3 (A) (Zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme apoptotischer Zellen bei Inkubation mit t-BHP).

	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP
Zeit [h]	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
0	8	8	8	1,6	1,6	1,6
4	8	22	29	1,7	6,0	7,0
6	11	29	37	1,2	5,2	7,7
8	13	32	48	1,9	8,3	5,7

Tabelle 3.3 zur Abbildung 3.3: Zunahme der nekrotischen und apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP, Abbildung 3.3 (B) (Zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme nekrotischer Zellen bei Inkubation mit t-BHP).

	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP
Zeit [h]	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
0	1	1	1	0,2	0,2	0,2
4	2	2	10	0,2	1,0	5,5
6	2	3	11	0,2	0,9	5,2
8	2	5	17	0,6	2,2	5,5

Tabelle 3.4 zur Abbildung 3.3: Zunahme der nekrotischen und apoptotischen Zellen bei Inkubation mit t-BHP, Abbildung 3.3 (C) (Einfluß von Konzentration und Zeit auf die Apoptoseinduktion).

Einflussfaktoren	B-Koeffizient
t-BHP Konzentration	0,302
Inkubationszeit	3,282

Tabelle 3.5 zum Abschnitt 3.1.2 Hyperglykämie und Apoptose.

	vitale Zellen	nekrotische Zellen	apoptotische Zellen	vitale Zellen	nekrotische Zellen	apoptotische Zellen
Zeit [h] (d)	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
5 mM Glucose	91	4	6	2,7	0,3	2,9
30 mM Glucose 1 h	93	2	5	1,5	0,3	2,0
30 mM Glucose 48 h (2 d)	91	4	5	1,0	0,1	1,2
30 mM Glucose 72 h (3 d)	91	4	4	4,7	1,6	3,2
30 mM Glucose 168 h (7 d)	94	1	5	2,9	0,7	3,5

Tabbelle 3.6 zur Abbildung 3.4: Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellen bei Inkubation mit EA.

	vitale Zellen	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen	vitale Zellen	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen
	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
Kontrollprobe	91	6	2	1,4	0,2	1,2
100 µM EA 2 h	50	45	5	7,7	0,9	0,3

## Oxidativer Streß induzierte Apoptose in Endothelzellen

Tabelle 3.7 zur Abbildung 3.5: Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei Inkubation mit t-BHP und EA

	vitale Zellen	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen	vitale Zellen	apoptotische Zellen	nekrotische Zellen
	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
Kontrollprobe	91	6	2	0,6	0,2	0,0
150 $\mu$ M $\alpha$ -Tocopherol 48 h	88	9	3	6,2	4,6	0,1
1 mM GSH-EE 24 h	89	9	2	1,4	1,1	0,2
50 $\mu$ M t-BHP 4 h	75	22	2	2,4	2,1	1,5
50 $\mu$ M t-BHP 4 h, 150 $\mu$ M $\alpha$ -Tocopherol 48 h	85	12	3	3,1	3,8	5,0
50 $\mu$ M t-BHP 4 h, 1 mM GSH-EE 24 h	81	17	2	2,7	2,5	0,0
100 $\mu$ M EA 2 h	50	45	5	2,7	0,9	0,3
100 $\mu$ M EA 2 h, 150 $\mu$ M $\alpha$ -Tocopherol 48 h	62	34	4	2,1	4,6	5,0
100 $\mu$ M EA 2 h, 1 mM GSH-EE 24 h	73	23	4	2,7	1,1	0,0

Tabelle 3.8 zur Abbildung 3.6: Zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung der Fluoreszenz bei Inkubation von PAEC mit t-BHP.

	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP
Zeit [h]	relative Fluoreszenz	relative Fluoreszenz	relative Fluoreszenz	sem	sem	sem
0	23,9	23,9	23,9	0,72	0,72	0,72
0,25	27,2	29,1	49,5	0,74	7,05	5,07
0,5	35,1	46,7	34,6	2,13	4,42	5,78
1	33,6	29,9	35,3	6,19	1,88	1,39
4	44,2	12,5	7,4	7,12	0,38	3,24
6	47,0	25,4	22,1	4,99	2,64	11,29

Tabelle 3.9 zur Abbildung 3.7: Zunahme der Anzahl von Zellen mit erniedrigter Fluoreszenz.

	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP
Zeit [h]	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
0	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
1	0	41	37	0	2,5	1,0
4	15	62	71	0,9	0,7	8,1
6	22	46	60	1,0	1,9	11,3

Tabelle 3.10 zum Abschnitt 3.2.2 Auswirkung von Hyperglykämie auf die ROS-Konzentration.

Zeit [h]	$\Delta$ relative Fluoreszenz	sem
0	0,0	1,65
0,25	1,3	0,71
0,5	1,3	2,69
1	1,9	2,87
2	2,4	2,54
4	4,4	1,83
6	3,7	3,54
14	2,7	2,60

Tabell 3.11 zur Abbildung 3.9: Veränderungen der relativen Fluoreszenz bei Inkubation mit EA, (B) (Inkubation mit 100  $\mu$ M EA).

Zeit [h]	relative Fluoreszenz	sem
0	23,9	0,72
0,25	47,2	2,43
0,5	54,8	6,69
1	103,7	11,06
2	3,0	0,03
3	1,7	0,67

Tabelle 3.12 zur Abbildung 3.10: Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei Inkubation mit t-BHP.

	relative Fluoreszenz	sem
Kontrollprobe	23,9	0,72
50 $\mu$ M t-BHP 30 min	46,7	3,05
50 $\mu$ M t-BHP 30 min, 150 $\mu$ M $\alpha$ -Tocopherol 48 h	31,9	4,21
50 $\mu$ M t-BHP 30 min, 1 mM GSH-EE 24 h	44,4	5,12

Tabell 3.13 zur Abbildung 3.11: Zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung des GSH-Gehaltes bei Inkubation mit t-BHP.

	Differenz zur kontroll Probe	Differenz zur kontroll Probe	Differenz zur kontroll Probe			
	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP	10 µM t-BHP	50 µM t-BHP	100 µM t-BHP
Zeit [h]	nM GSH / mg Protein	nM GSH / mg Protein	nM GSH / mg Protein	sem	sem	sem
0	0,0	0,0	0,0	2,2	2,2	2,2
0,25	46,1	53,6	44,2	6,43	0,16	3,29
0,5	60,7	63,3	53,6	4,08	2,04	2,04
1	42,1	50,9	40,8	0,16	4,55	6,27
4	53,3	85,3	32,3	1,73	8,63	5,33
6	61,7	72,9	1,9	2,60	8,26	11,19
8	57,8	54,5	-26,9	4,34	5,39	11,97

Tabell 3.14 zur Abbildung 3.12: Zunahme des GSH-Gehaltes bei der Inkubation mit 30 mM Glucose.

	Differenz zur kontroll Probe	
Zeit [h]	nM GSH / mg Protein	sem
0	0,0	2,2
24	20,0	1,04
48	19,5	4,15
72	25,3	0,78

Tabelle 3.15 zur Abbildung 3.13: Veränderung des GSH-Gehaltes bei der Inkubation mit EA.

Zeit [h]	Differenz zur kontroll Probe	
	nM GSH / mg Protein	sem
0	0,0	2,2
0,25	4,4	3,92
0,5	10,3	1,88
1	1,3	3,71
2	1,4	5,27
3	-6,6	2,51
4	-12,6	2,88

Tabelle 3.16 zur Abbildung 3.15: Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  bei Inkubation mit t-BHP, (A) (Anzahl der Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  in der Region R2).

Zeit [h]	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP
	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
0	2	2	2	0,5	0,5	0,5
4	5	12	19	0,5	3,3	3,6
6	13	23	38	3,7	5,2	7,9
8	38	53	43	2,9	4,8	1,3

Tabelle 3.17 zur Abbildung 3.15: Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  bei Inkubation mit t-BHP, (B)  
(Anzahl der Zellen mit stark erniedrigtem  $\Delta\Psi_M$  in der Region R3).

	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP	10 $\mu$ M t-BHP	50 $\mu$ M t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP
Zeit [h]	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
0	3	3	3	0,1	0,1	0,1
4	3	3	3	0,4	0,1	0,1
6	4	4	5	1,5	1,0	2,3
8	5	17	50	1,8	1,2	3,1

Tabelle 3.18 zur Abbildung 3.17: Erniedrigung des  $\Delta\Psi_M$  bei Inkubation mit EA.

	Zellen in Region R2	Zellen in Region R3	Zellen in Region R2	Zellen in Region R3
Zeit [h]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem
0	3	3	0,4	0,6
1	25	6	1,9	1,5
2	31	16	3,3	4,0
3	49	42	6,1	6,4

Tabelle 3.19 zur Abbildung 3.18 Schutzwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und GSH-EE bei  
Inkubation mit t-BHP und EA.

	Ohne Koinkubation	Koinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol	Koinkubation mit GSH-EE	Ohne Koinkubation	Koinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol	Koinkubation mit GSH-EE
Zellen in Region R2 und R3	Zellen [%]	Zellen [%]	Zellen [%]	sem	sem	sem
Kontrollprobe	9	7	10	1,0	0,1	1,4
100 $\mu$ M t-BHP 6 h	47	38	30	4,7	3,0	1,8
100 $\mu$ M EA 1 h	31	27	21	1,9	1,0	2,3

## 5.4 Literaturverzeichnis

- [1] Henning, R., (1993), „Stickoxid freisetzende Substanzen und Inhibitoren der NO-Synthese.“ *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **41 (4)**, 412-419
- [2] Murphy, D. D., Wagner, R. C., (1994) „Differential contractile response of cultured mikrovaskular pericytes to vasoactive agents.“ *Microcirculation* **1 (2)**, 121-128
- [3] Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch (1994) , *Walter de Gruyter-Verlag Berlin*, 257 Auflage
- [4] Eckert, R., (1986), Tierphysiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York*
- [5] Schmid-Schönbein, H., Grunau, G., Bräuer, H., (1980), „Exempla hämorheologica“ *Universitätsdruckerei H. Stürz AG Wiesbaden*
- [6] Rubin, L. I., (1992), „Endothelial cells: adhesion and tight junctions.“ *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 830-833
- [7] Simionescu, N., Simionescu, M., Palade, G. E., (1981) „Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites.“ *J. Cell. Biol.* **90**, 605-613
- [8] Star, R. A., (1993), „Nitric oxide“ *Am. J. Med. Sci.* **306 (5)**, 348-358
- [9] Wu, X., Somlyo, A.V., Somlyo, A. P., (1996), „Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase.“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220 (3)**, 658-663
- [10] Town, M. H., Schillinger, E., Speckenbach, A., Prior, G., (1982), „Identification and characterisation of a prostacyclin-like receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analog, ciloprost, as radioactive ligand.“, *Prostaglandins* **24**, 61-72

- [11] Rosenberg, J. S., Damus, P. S., (1973), „The purification and mechanism of action of human antithrombin heparin cofactor.“ *J. Biol-Chem.* **248**, 6490-6505
- [12] Simionescu, N., Simionescu, M., (1988), „Endothelial cell biology in health an disaese.“ *Plenum Press- New York, London*
- [13] Rösen, P., Pogtsa, G., Tschöpe D., Addicks, K., Reinauer, H., (1992) „Diabetische Kardiopathie. Pathophysiologische Konzepte und therapeutische Ansätze.“ *Klin. Wochenschr.* **69** 3-15
- [14] Lum, H.; Roebuck, K. A., (2001), „Oxidant stress und endothelial dysfunktion“ *AJP– Cell Physiologie* **280** C719-C741
- [15] Ceriello, A.; Russo, P.; Amstad, P., Cerutti, P., (1996), „High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture.“ *Diabetes* **45**, 471-477
- [16] Baynes, J., (1991), „Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.“ *Diabetes* **40**, 405-412
- [17] Du, X., Färber, K., Rösen, P., (1999), „Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF- $\kappa$ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase.“ *Free Radical Biology & Medicine* **27** 752-763
- [18] Rösen, P., Du, X., Tschöpe, D., (1998), „Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by  $\alpha$ -tococpherol.“ *Molecular and Cellular Biochemsistry* **188** 103-111
- [19] Morel, Y., Barouki, R., (1999), „Repression of gene expression by oxidative stress.“, *Biochem J.* **342**, 481-496
- [20] Vayssier-Taussat, M., Camilli, T., Aron, Y., Meplan, C., Hainaut, P., Polla, B., Weksler, B.; (2001), „Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280(3)** H1293-H1300

- [21] Ceriello, A.; Russo, P.; Amstad, P., Cerutti, P., (1996), „High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture.“ *Diabetes* **45**, 471-477
- [22] Celli, A., Que, F.G., Gores, J., La Russo, N.F., (1998), „Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes.“, *AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology* **275**, 749-757
- [23] Krammer, P. H., (2000) „Apoptose“ *Dt Ärztebl* **97 [25]** 1752-1759
- [24] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, (1972), „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics“ *Brit J Cancer* **26**: 239–257.
- [25] Kroemer, G., Dallaporta, B.; Reche-Rignon, M., (1998), „The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis“ *Annu. Rev. Physiol.* **60** 619-642
- [26] Kroemer, G., Petit, P. X., Zamzami, N., Vayssière, J. L., B., (1995), „The biochemistry of apoptosis.“ *FASEB J.* **9**, 1277-1287
- [27] Kroemer, G., (1995), „The pharmacology of T cell apoptosis“, *Adv. Immunol.* **58**, 211-296
- [28] Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, P. A., Dallaporta, B., Zamzami; N., (1997), „ The apoptosis–necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death.“, *Oncogene* **15**, 1573-1582
- [29] Xiang, J., Chao, D., T., Korsmeyer, S., J., (1996), „Bax- induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-linked proteases.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14559-14563
- [30] Kroemer, G., Lisardo, B., Zamzami, N., Hortelano, S., Martinez, A., C., (1997), „Detection of apoptosis and apoptosis associated alterations .“ *The Immunology Methods Manual, R. Lefkowitz, New York Academic* **14.2**, 1111-1125

- [31] Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., (1997), „Intracellular ATP levels determine cell fated by apoptosis or necrosis.“ *Cancer Res.* **57**, 1835-1840
- [32] Green, D.R., Reed, J.C., (1998), „Mitochondria and apoptosis.“ *Science* **281**, 1309-1312
- [33] Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.J., Giardino, I., Brownlee, M., (2000), „Normalizing mitochondrial superoxide production blocs three pathways of hyperglycaemic damage.“ *Nature* **404** 787-790
- [34] Griffith, O.W., (1999), „Biologic and Pharmacologic Regulation of mammalian glutathione synthesis“ *Free Radical Biology & Medicine* **27**, 922-935
- [35] Urata, Y., Yamamoto, H., Goto, S., Tsushima, H., Akzawa, S.D., Yamashita, S., Nagataki, S., Kondo, T., (1996), Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis faktor- $\alpha$  in mouse endothelial cells.“ *J. Biol. Chem.* **271**, 15146-15152
- [36] Yoshida, K., Hirokawa, J., Tagami, S., Kawakami, Y., Urata, Y., Kondo, T., (1995), „Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux.“ *Diabetologia* **38**, 201-210
- [37] Stohs, S. J., (1995), „The role of free radicals in toxicity and disease.“ *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **6**, 205-228
- [38] Ceriello, A.; Russo, P.; Amstad, P., Cerutti, P., (1996), „High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture.“ *Diabetes* **45**, 471-477
- [39] Macho, A., Hirsch, T., Marzo, I., Marchetti, P., Dallaporta, B., Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G., (1997), „Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis.“ *the journal of immunology* **258**, 4612-4619

- [40] Yang, J.C., Cortopassi, G.A., (1997), „Induktion of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic faktor cytochrome c.“ *Free Radical Biology & Medicine* **24**, 624-631
- [41] Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangoin, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aerborsold, R., Siderovski, D.P., Penninger J.M., Kroemer G., (1999), „Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing faktor.“ *Nature* **397** 441-446
- [42] Sheng-Tanner, X., Bump, E.A., Hedley, D.W., (1998), „An oxidative stress-mediated death pathway in irradiated human leukemia cells mapped using multilaser flow cytometry.“ *Radiation Research* **150**, 636-647
- [43] Booyse, F. M., Seddlak, B. J., Rafelson, M. E., (1975), „Culture of arterial endothelial cells“, *Thrombos. Diathes., Haemorrh.* **31**, 825-839
- [44] Oestereich, R., (1990) Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [45] Zink, S., (1991) „Regulation der Permeabilität kultivierter, mikro und makrovaskulärer Rinderendothelzellen“ Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [46] Hoyer, L., W., De Los Santos, R. P., Hoyer, J., R., (1973),“ Antihemophilic factor antigen localization in Endothelial cells by immunofluorescent microscopy“ *J. Clin. Invest.* **52**, 2737-2744
- [47] Haugland, R. P., (1999), „Handbook of fluorescent probes and research chemicals“ *Molekular Probes CD-ROM*
- [48] Wüllner, U., Seyfried, J., Groscurth,, Beinroth, S., Winter, S., Gleichmann, M., Heneka, M., Löschmann, P.A., Schult, J.B., Weller, M., Klockgether, T., (1999), „Glutathione depletion and neuronal cell death : the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function.“ *Brain Research* **826** 53-62

- [49] Wang, H., Joseph, J. A.; (1999), „Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader“ *Free Radical Biology & Medicine* **27** 612-616
- [50] Lizard, G.; Miguet, C.; Bessede, G.; Monier, S.; Gueldry, S.; Neel, D.; Gambert, P., (1999), „Impairment with various antioxidants of the loss of mitochondrial transmembran potential and of the cytosolic releas of cytochrom c occuring during 7-Ketocholesterolinducedapopotsis“ *Free Radical Biology & Medicine* **28** 743-753
- [51] Sugano, N., Ito, K., Murai, S.; (1999), „Cyclosporin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induces apoptosis of human fibroblasts“ *FEBS* **447** 274-276
- [52] Ho, F. M., Liu, S. H., Liau, C. S., Huang, P. J., Lin-Shiau, S. Y.; (2000), „High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and caspase-3“ *Circulation* **101** 2618-2624
- [53] Färber, K., (1998), „Einfluß von Diabetes auf die myokardiale Expression von NO-Synthasen und Zyklooxygenasen“, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [54] Minamikawa, T., Williams, D. A., Bowser, D. N., Nagley, P.; (1998), „Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells“ *Experimental Cell Research* **246**, 26-37
- [55] Krohn, A.; Wahlbrink, T.; Prehn, J.H.M., (1999), „Mitochondria depolarization is not required for neuronal apoptosis“ *The journal of neuroscience* **19** (17), 7394-7404
- [56] Narita, M.; Shimizu, S.; Ito, T.; Chittenden, T.; Lutz, R.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y., (1998), „Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrom c release in isolated mitochondria“ *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14681-14686
- [57] Morias Cardoso, S., Pereira, C.; Resende Oliveira, C.; (1998), „Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress“ *Free Radical Biology & Medicine* **26** 3-13

- [58] Nakagami, H., Morishita, R., Yamamoto, K., Yoshimura, S., Taniyama, Y., Aoki, M., Matsubara, H., Kim, S., Kaneda, Y., Ogihara, T.; (2001), „Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells“ *Diabetes* **50** 1472-1481
- [59] Ahmed, M. U., Dunn, J. A., Walla, M. D., Thorpe, S. R., Baynes, J., W.; (1988), „Oxidative degradation of glucose adducts to protein“ *The journal of biological chemistry* **268** [18] 8816-8821
- [60] Griffith, O. W., Mulcahy, R. T., (1999) „The enzymes of glutathione biosynthesis:  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase.“ *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **73**, 209-267
- [61] Meister. A., (1994), „Glutathione, ascorbate, and cellular protection.“ *Cancer Res.* **54**(Suppl), 1969S-1975S
- [62] Meister. A., Anderson, M. E., (1983), „Glutathione“ *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760
- [63] Fahey, R.C., Sudquist, A. R., (1991), „Evolution of glutathione metabolism“ *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **64**, 1-53
- [64] Kalyanaraman, B., Karoui, H., Singh, R. J., Felix, C. C., (1996), „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“ *Anal. Biochem.* **241**, 75-81
- [65] Luperchio, S., Tamir, S., Tannenbaum, S. R., (1996) „NO-Induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells“ *Free Radc. Biol. Med.* **21**, 513-519
- [66] Briviba, K., Klotz, L. O., Sies, H., (1999) „Defenses against peroxynitrite“ *Meth. Enzymol.* **301**, 301-311
- [67] Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohè, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohè, L., (1995), „The diversity of glutathione peroxidases“ *Meth. Enzymol.* **252B**, 38-53

- [68] Kehrer, J. P., Lund, L. G., (1994), „Cellular reducing equivalents and oxidative stress“ *Free. Radic. Biol. Med.* **17**, 65-75
- [69] Akerboom, T. P., Bilzer, M., Sies, H., (1982), „The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused liver“ *J. Biol. Chem.* **257**, 4248-4252
- [70] Sen, C. K., Packer, L., (1996), „Antioxidant and redox regulation of gene transcription.“ *FASEB J.* **10**, 709-720
- [71] Müller, J. M., Rupec, R. A., Baeuerle, P. A., (1997), „Study of gene regulation by NF- $\kappa$ B and Ap-1 in response to reaktive oxygen intermediates“ *Methods* **11**, 301-312
- [72] Shi, M. M., Kugelmann, A., Iwamoto, T., Tian, L., Forman, H. J., (1994), „Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells“ *J. Biol. Chem.* **269**, 26512-26517
- [73] Tian, L., Shi, M. M., Forman, H. J., (1997), „Increased transcription of the regulatory subunit of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion.“ *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 126-133
- [74] Cai, J., Sun, W., Lu, S. C., (1997), „Differential regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression.“ *Biochem. J.* **326**, 167-172
- [75] Pinkus, R., Weiner, L. M., Daniel, V., (1996), „Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression.“ *J. Biol Chem.* **271**(23), 13422-13429
- [76] Hayes, J. D., Ellis, E. M., Neal, G. E., Hartison, D. J., Manson, M. M., (1999), „Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress.“ *Biochem Soc Symp.* **64**, 141-168.

- [77] Zoratti, M., Szabó, I., (1995), „The mitochondrial permeability transition.“ *Biochem. Biophys. Acta.* **1241**, 139-176
- [78] McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifeletti, R. R., Snyder, S. H., (1992), „Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3170-3174
- [79] Constantini, P., Chernyak, B. V., Petronilli, V., Bernardi, P., (1996), „Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites.“ *J. Biol. Chem.* **271**, 6746-67521
- [80] Petronilli, V., Constantini, P., Scorrano, L., Passamonti, R., Bernardi, P., (1994), „The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents.“ *J. Biol. Chem.* **269**, 16638-16643
- [81] Bernardi, P., Broekemeier, K. M., Pfeiffer, D. R., (1994), „Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane.“ *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**(5), 509-17.
- [82] Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D., (1997), „The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.“ *Science* **275** (5303), 1132-1136
- [83] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X, (1997), „Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.“ *Cell* **91**, 479–489.
- [85] Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y(1999), „Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1.“, *Nature* **399**: 549–557.

- [86] Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X,(1997), „Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3.“, *Cell* **90**: 405–413.
- [87] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DR, Penninger JM, Kroemer G, (1997), „Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor“ *Nature* **397**, 441–446.
- [88] Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G, (1997), „The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide- induced apoptosis.“ *J Exp Med* **186**, 25–37.
- [89] Susin, S.A, Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T, Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G., (1996), „Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease.“ *J Exp Med* **184**, 1331–1341.
- [90] Newmeyer, D. D., Farschon, D. M. Reed, J. C., (1994), „Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria.“ *Cell* **79**, 353-364
- [91] Wang, H., Joseph, J. A.; (1999), „Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader“ *Free Radical Biology & Medicine* **27** 612-616
- [92] Le Bel, C. P., Ishiropoulos, H., Bondy, S. C., (1992), „Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.“ *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227-231
- [93] Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., Thomas, M., (1982), „Flow cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.“ *J. Immunol.* **130** (4), 1910-1917

- [95] Cai, J., Jones, D. P., (1998), „Superoxide in apoptosis: Mitochondrial generation triggered by cytochrome-c release.“ *J. Biol. Chem.* **273**, 11401-11404
- [96] Mannella, C. A., (1998), „Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications.“ *J. Struct. Biol.* **121**(2), 207-218.
- [97] Benzi, G., Curti, D., Pastoris, O., Marzatico, F., Villa, R. F., Dagani, F., (1991), „Sequential damage in mitochondria complexes by peroxidative stress.“ *Neurochem. Res.* **16**, 1295-1302
- [98] Murakami, K., Kondo, T., Ohtsuka, Y., Fujiwara, Y., Shimada, M., Kawakami, Y., (1989), „Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus.“ *Metabolism* **38**, 753-758
- [99] Tagami, S., Kondo, T., Yoshida, K., Hirokawa, J., Ohtsuka, Y., Kawakami, Y., (1992), „Effect of insulin on impaired antioxidants in aortic endothelial cells from diabetes mellitus.“ *Metabolism* **41**, 1053-1058
- [100] Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., (1993), „Vitamin E consumption and the risk of coronary diseases in men.“ *N. Engl. J. Med.* **328**, 1450-1456
- [101] Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Ascherio, A., (1993), „Vitamin E consumption and the risk of coronary diseases in women.“ *N. Engl. J. Med.* **328**, 1444-1449
- [102] Jornot, L., Junod, A. F., (1993), „Variable glutathione levels and expression of antioxidant enzymes in human endothelial cells.“ *Am. J. Physiol.* **8**, L482-L489
- [103] Kondo, T., Murakami, K., Ohtsuka, Y., (1987), „Estimation and characterisation of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus.“ *Clin. Chim. Acta.* **166**, 227-236.
- [104] Oogawara, T., kawamura, N., Kitagawa, Y, Taniguchi, N., (1992), „Site-specific and random augmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction: implication of reaction oxygen species.“ *J. Biol. Chem.* **267**, 18505-18510

[105] Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., (1986), „Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking.“ *Nature* **232**, 11629-163

[106] Oxlund, H., Andreassen, T. T., (1992), „Aminoguanidine treatment reduces the increase in collagen stability of rats with experimental diabetes mellitus.“ *Diabetologia* **35**, 19-25

[107] Tan, S.; Sagara, Y.; Liu, Y.; Maher, P.; Schubert, D., (1998), „The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death.“ *The journal of cell biology* **141**, 1423-1432

[108] Dabbeni-Sala, F., Floreani, M., Franceschini, D., Stephen D. Skaper, S. D., Giusti, P.; (2001), „Kainic acid induces selective mitochondrial oxidative phosphorylation enzyme dysfunction in cerebellar granule neurons: protective effects of melatonin and GSH ethyl ester“ *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.00-0427fje.

## 5.5 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Peter Rösen möchte ich vor allem für die Rücksicht und den Zuspruch in schweren Zeiten danken, weiterhin danke ich wegen der interessanten Forschungsthematik, der Diskussionsbereitschaft und den vielfältigen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Braun danke ich für die Betreuung der Dissertation an der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken die mir durch Einweisen in Arbeitstechniken und bei der Arbeit behilflich waren.

Dr. Sigrid Zink für die Einführung in der Durchflußzytometrie und Zellbiologie.

Daniela Herzfeld für die viele Hilfe im Labor und mütterliche Fürsorge.

Margit Kempf für die Einführung in die Zellkultur.

Sowie Dr. Karin Färber, Dr. Jürgen Weiß, Antonia Osmers, Antonia Garcis, Igor Gerasimovski, Dr. Xueliang Du, Dr. Guang Zhi, Dr. Liu Hui, für die Hilfe und die gute Stimmung im Labor.

Dr. Barbara Schwippert-Houtermans für die Hilfe im Umgang mit dem Durchflußzytometer

Herr Dr. Kühn und Frau Kühn für die Hilfe im Umgang mit dem Fluoreszenzmikrotiterplattenmessgerät.

Prof. Dr. Eckel und seine Arbeitsgruppe mit Dr. Irini Rakazi, Mark Sommerfeld, Daniela Ledwig, Dr. Olaf Dransfeld.

Besonders danke ich meiner gesamten Familie für das unermeßliche Wohl, welches sie mir angedeihen ließen.

Aber auch meinen freunde wie sobo, frenny, s-man, sheri, marcel, kerstin, nadine und robby für ständige bereitschaft zur hilfe und diskussion über eigene und fremde wissenschaftliche gebiet von der analytik bis zu Zebaoth.