

**Aus der Klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-  
Forschungsinstitutes  
Leibniz-Institut  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Leiter: Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

**Untersuchungen zu den  
Wechselwirkungen zwischen  
Hitzeschockprotein 70 und der  
induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase  
an einer Ratteninsulinomzelllinie**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Jörg Bruckhoff

2003

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kolb  
Korreferent: Prof. Dr. Hohlfeld

## Verwendete Abkürzungen

CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsantigen)
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDRF	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
FCS	Fötale Kälberserum
GADA	Glutamatdecarboxylaseantikörper
GRP	Glucoseregulierende Proteine
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSF	Hitzeschutzfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IAA	Insulinautoantikörper
IA-2A	Tyrosinphosphatasenantikörper
ICA	Inselzellantikörper
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
L-NMA	N-Methyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen aktivierte Proteine
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NF $\kappa$ B	Nukleäre Transkriptionsfaktor $\kappa$ B
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PARP	Poly- (ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Polymerase Kettenreaktion)
PSL	Phosphor stimulierte Lumineszenz
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodium dodekylsulfat
TH-Zellen	T- Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Der Typ 1 Diabetes	1
1.3	Immunpathogenese des Typ 1 Diabetes	2
1.4	Genetische Aspekte des Typ 1 Diabetes	4
1.5	Stickstoffmonoxid und Typ 1 Diabetes	4
1.6	Hitzeschockproteine	7
1.7	HSP 70 und Typ 1 Diabetes	9
1.8	Interaktionen zwischen HSP 70 und iNOS	10
1.9	Ziel der Arbeit	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Material und Geräte	12
2.1.1	Zelllinien	12
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.4	Enzyme, Zytokine, Antikörper, Nukleinsäuren und Nukleotide	15
2.1.4.1	Enzyme und Zytokine	15
2.1.4.2	Antikörper	16
2.1.4.3	Nukleotide	16
2.1.4.4	Nukleinsäuren	16
2.1.5	Sterilisation der Chemikalien und Geräte	17
2.1.6	Einwegartikel für die Zellkultur	17
2.1.7	Lösungen für die Zellkultur	17
2.1.8	Stammlösungen und –puffer	19
2.1.9	Geräte	22
2.2	Methoden	24

---

2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	24
2.2.2	Behandlung von Zellen mit Hitzeschock	25
2.2.3	Bestimmung der Zahl lebender und toter Zellen	25
2.2.4	Zytotoxizitätstest	25
2.2.5	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit	26
2.2.6	Bestimmung des Nitritgehaltes im Zellüberstand mit der Griess-Methode	27
2.2.7	Nachweis von Proteinen in Zellysaten mittels Western-Blot	28
2.2.7.1	Herstellung von Zellysaten	28
2.2.7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.7.3	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	30
2.2.7.4	Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	30
2.2.8	Nachweis von mRNA-Expression in RIN und WEHI-Zellen	31
2.2.8.1	RNA-Isolation aus RINm5F und WEHI-Zellen	31
2.2.8.2	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	32
2.2.8.3	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.8.4	Reverse Transkription der mRNA	33
2.2.8.5	c-DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.8.6	DNA-Gelelektrophorese	36
2.2.8.7	Transfer von DNA aus Agarose-Gel auf Nylonmembranen	37
2.2.8.8	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	37
2.2.8.9	Hybridisierung membrangebundener DNA	38
2.2.8.10	Quantifizierung der radioaktiven Signale	38
2.3	Statistik	39

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Protektive Effekte der Hitzeschockbehandlung	40
3.2	Western-Blot-Analysen zum Nachweis von HSP 70	41
3.3	Protektive Effekte einer Transfektion von RIN-Zellen mit einem HSP 70 exprimierendem Vektor	42
3.4	Induktion der NO-Produktion bei RIN-Zellen durch Zytokine	43
3.5	Einfluß der Glukosekonzentration auf die Nitritproduktion	46
3.6	Einfluß von Hitzeschock auf die NO-Produktion von RIN-Zellen	47
3.7	Erhöhung der NO-Produktion durch Transfektion von RIN-Zellen mit einem HSP 70 exprimierendem Vektor	50
3.8	Erhöhung der NO-Produktion durch Transfektion von WEHI-Zellen mit einem HSP 70 exprimierendem Vektor	57
3.9	Expression von iNOS-Protein bei Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen	58
3.10	Expression von iNOS-Protein bei RK/1- und R70/3-Zellen	59
3.11	Expression von iNOS-mRNA in RIN- und WEHI-Zellen	60
3.11.1	Expression von iNOS mRNA in RK/1- und R70/3-Zellen	60
3.11.2	Nachweis von iNOS mRNA-Expression in Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen	62
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Einleitung	64
4.2	Schützende Effekte von Hitzeschock sowie Hitzeschockprotein 70 vor Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid bei RIMm5F-Zellen	64

---

4.3	Einfluß von Hitzeschock und HSP70 auf die iNOS-Expression, NO-Produktion und Lyserate.	66
4.4	Die Erhöhung der iNOS Genexpression ist MAP-Kinase vermittelt	70
4.5	Rolle von HSP in Entzündungsprozessen und bei Autoimmunreaktionen	71
4.6	Klinische Relevanz von HSP	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>

---

## **1. Einleitung**

### **1.1 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels, die zu einer Hyperglykämie im Nüchternzustand und postprandial führen. Es wird ein primärer von einem sekundären Diabetes mellitus unterschieden. Zur ersten Gruppe zählt der Typ 1 Diabetes (auch insulin dependent diabetes mellitus, IDDM, oder juveniler Diabetes mellitus genannt), der Typ 2 Diabetes, sowie der Gestationsdiabetes. Der sekundäre Diabetes mellitus umfaßt exogene Ursachen wie Pankreaserkrankungen, endokrine Erkrankungen, medikamentös induzierte Hyperglykämien u.a. (Herold, 2000).

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

Von allen Diabetes mellitus Formen macht der Typ 1 Diabetes nur etwa 10% der Erkrankungen aus (Herold, 2000). Die Prävalenz in der Normalbevölkerung Mitteleuropas wird mit 0,1 bis 0,3% angegeben, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind (Kolb, 1996).

Die Genese des Typ 1 Diabetes ist bis heute nicht endgültig geklärt; es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung die klinisch manifest wird, wenn vermutlich mehr als 80% der Betazellen bereits zerstört wurden. Die Folge ist ein absoluter Insulinmangel, wodurch die Glukoseaufnahme von Körperzellen beeinträchtigt wird, was wiederum zu einer Hyperglykämie führt. Die durch den Glukosemangel in den Körperzellen gesteigerte Lipolyse führt zur Anhäufung von Ketonkörpern, wodurch es zu einer Ketoazidose kommt, die sich zum lebensbedrohlichen ketoazidotischen Koma entwickeln kann. Durch eine Insulin-Substitutionstherapie kann dieses Krankheitsbild zwar umgangen werden, da eine optimale, lebenslange Blutzuckereinstellung jedoch nur selten gelingt, drohen Patienten, die an Typ 1 Diabetes leiden, Spätkomplikationen vor allem in Form von Augen-, Nerven-, Gefäß- und Nierenerkrankungen (Deckert et al., 1978; Herold, 2000).



---

Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich am häufigsten in der Pubertät, man schätzt jedoch, daß etwa ein Drittel der Erkrankungen erst nach dem 30. Lebensjahr klinisch zu Tage treten (Kolb, 1991 (a)).

### **1.3 Immunpathogenese des Typ 1 Diabetes**

Bereits 1940 wurde von von Meyenburg die Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch mononukleäre Zellen beschrieben (von Meyenburg, 1940). Später konnte gezeigt werden, daß es hier zu einer selektiven, chronisch-progressiven immunvermittelten Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen kommt (Rossini et al., 1993). Hinweise auf autoimmune Prozesse bei der Pathogenese der Erkrankung ergaben sich durch den Nachweis von Inselzellantikörpern (ICA) (Botazzo et al., 1974) und Insulinautoantikörpern (IAA), die bereits lange vor der klinischen Manifestation der Erkrankung nachweisbar sind (Palmer et al., 1983). Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Antikörper identifiziert worden, des weiteren zeigte sich, daß es unterschiedliche Muster der gebildeten Antikörper zwischen an Typ 1 Diabetes Erkrankten in frühem und im späteren Lebensalter gibt. So finden sich bei Patienten, die früh erkranken, vermehrt Tyrosinphosphatasen- (IA-2A) und Glutamatdecarboxylase 65-Antikörper (GADA), wohingegen bei spät Erkrankten vermehrt unspezifische ICA nachweisbar sind (Seissler et al., 1998). Mit Hilfe von Inselzellautoantikörpern und GADA gelingt es bereits heute, diejenigen Personen mit zu identifizieren, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten 10 Jahre einen Typ 1 Diabetes entwickeln werden. Es zeigt sich aber auch, daß bei fehlender genetischen Prädisposition sich nur eine benigne Entzündung der pankreatischen Inseln (Insulitis) entwickeln kann. Zur destruktiven Insulitis mit Ausbildung eines Typ 1 Diabetes kommt es offenbar, bei geeigneter genetischen Prädisposition, erst nach Aktivierung einer autoaggressiven, zellvermittelten Immunreaktion (Stiefelhagen, 1998).

Um die immunologischen Vorgänge, die an der Zerstörung der Betazellen beteiligt sind, zu erforschen, wurden zahlreiche Modellsysteme entwickelt, die wichtige Ergebnisse auch für den humanen Typ 1 Diabetes liefern. So zeigte sich, daß die Schädigung der Betazellen kaum durch Inselzellantikörper, sondern vielmehr, wie

---

bereits oben erwähnt, durch inselinfiltrierende Immunzellen verursacht wird, wobei der Mechanismus der Schädigung noch nicht endgültig geklärt ist. Man geht heute davon aus, daß Mediatoren, die von diesen Zellen freigesetzt werden, wesentlich zur Betazellschädigung beitragen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß Sauerstoffradikale (reactive oxygen intermediates, ROI) und Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) auch in Inselzellen zu DNA-Schäden führen können. Bei der Behebung dieser Schäden werden durch die Aktivierung des nukleären Enzyms Poly- (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) große Mengen an NAD<sup>+</sup> verbraucht. Da es durch die Noxen gleichzeitig zu einer mitochondrialen Funktionsstörung mit konsekutivem ATP-Mangel kommt, kann NAD<sup>+</sup> nicht mehr in ausreichendem Maße nachgebildet werden. Am Ende dieser Kaskade steht der Untergang der Betazelle (Uchigata et al., 1982; Kolb, 1993; Fehsel et al.; 1993, Radons et al., 1993; Radons et al., 1994). Bestätigt wurde dieser Pathomechanismus dadurch, daß die pharmakologische Inhibition der PARP-Aktivierung Inselzellen vor einer Lyse durch ROI (Radons et al., 1993) bzw. durch NO (Kallmann et al., 1992; Radons et al., 1994) schützt, und daß PARP-defiziente Tiere vor der Entwicklung einer Hyperglykämie geschützt sind, die durch das Betazelltoxin Streptozotocin induziert werden kann (Burkart, 2000 (a)).

Hinweise auf einen autoimmunen Charakter der Erkrankung ergeben sich weiterhin dadurch, daß eine immunsuppressive Therapie beim Menschen, etwa mit Cyclosporin, den Krankheitsverlauf verzögern kann und zu einer Verlängerung der Remissionsphase führt (Kolb, 1996). Weiterhin kann der Typ 1 Diabetes, insbesondere bei älteren Erkrankten, mit einer Reihe von anderen Autoimmunerkrankungen, wie Hashimoto-Thyreoiditis, idiopathischem M. Addison und perniziöser Anämie assoziiert sein (Klöppel et al., 1996).

Auch kommt es häufig bei pankreastransplantierten Patienten, deren Organ von einem HLA-identischen Spender stammt, zu einer Insulitis und damit zu einem Diabetesrezidiv (Sibley et al., 1985). Desweiteren wurde der Fall einer Patientin beschrieben, bei der vier Jahre nach einer Knochenmarkstransplantation, von einem an Typ 1 Diabetes erkrankten und ICA-positivem Spender, ein klassischer Typ 1 Diabetes auftrat. Die Patientin, die vor der Transplantation ICA-negativ war, wurde im Verlauf ICA-positiv (Lampeter et al., 1993). Diese Hinweise stützen eine Autoimmunhypothese des Typ 1 Diabetes.

Daß die zelluläre Immunreaktion für die Betazellschädigung entscheidend ist, zeigte ein Fallbericht über einen Patienten mit M. Bruton. Bei dieser seltenen Erkrankung besitzen die Patienten keine B-Lymphozyten. Daß sich bei einem solchen Patienten trotzdem ein Typ 1 Diabetes entwickeln kann zeigt, daß die zelluläre Immunantwort für die  $\beta$ -Zellerstörung verantwortlich ist (Martin et al., 2001).

Insbesondere sind es offenbar Makrophagen, die in diesem Entzündungsprozeß eine Hauptrolle spielen, in dem sie die ersten inselinfiltierenden Zellen sind und zusätzlich als Regulator der T-Lymphozyten medierten Immunantwort gegen Inselzellen fungieren. Im Tiermodell scheint NO hierbei das Hauptagens der von den Makrophagen freigesetzten toxischen Mediatoren zu sein (Kröncke et al., 1991; Burkart, 2000 (a)).

#### **1.4 Genetische Aspekte des Typ 1 Diabetes**

Aus der Tatsache, daß 20% der erkrankten Typ 1 Diabetiker eine positive Familienanamnese aufweisen (Herold, 2000) und daß die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen zwischen 30 und 40 Prozent liegt, ergibt sich eine wichtige Rolle für eine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes (Zielasek et al., 1989). Als prädisponierende Faktoren gelten vor allem die HLA-Typen DR 3/DR 4 und DQ<sub>W8</sub> (Nerup et al., 1987). Diese HLA-DR- und DQ-Gene gehören zu Immunantwortgenen, welche die Antigenerkennung durch T-Helferzellen vermitteln. Lokalisiert sind diese Gene auf Chromosom 6 (Klöppel et al., 1996).

Die genetische Prädisposition ist ein wichtiger Faktor für die Entstehung eines Typ 1 Diabetes, jedoch werden auch Umwelteinflüsse für das endgültige Auftreten der Erkrankung, wie beispielsweise Nahrungsmittelbestandteile, virale- oder bakterielle Infektionen diskutiert (Kolb, 1996).

#### **1.5 NO und Typ 1 Diabetes**

NO zählt zu den mäßig reaktiven, relativ langlebigen Radikalen. Es nimmt mannigfaltige Aufgaben im Körper wahr, angefangen von Vasodilatation - Nitrate werden als therapeutisches Konzept bei myokardialen Ischämien angewandt - bis

---

zur Funktion als Neurotransmitter, sowie als antimikrobielle und tumorzerstörende Substanz (Moncada et al., 1993; Lowenstein et al., 1994). Aufgrund seiner vasodilatatorischen Eigenschaft wurde es von Furchgott et al. (1980) zunächst als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet, später wurde diese Substanz als NO identifiziert (Palmer et al., 1987). In einer von einer NO-Synthase katalysierten Reaktion entsteht aus dem Substrat, der Aminosäure L-Arginin (Palmer et al., 1988), NO sowie Citrullin (Moncada et al., 1990).

Bei Säugetieren wurden bisher drei verschiedene Isoformen von NO-Synthasen identifiziert. Zwei werden konstitutiv exprimiert (e(ndotheliale)NOS, n(euronale)NOS, Typen 1 und 3), eine weitere Form (iNOS, Typ 2) ist induzierbar. Die Aktivierung der iNOS erfolgt durch Zytokine und/oder Lipopolysaccharid (LPS) (Michel und Feron, 1997).

Die konstitutiven Formen produzieren geringe Mengen NO für einen kurzen Zeitraum. Man nimmt an, daß das hier gebildete NO über die Induktion von cGMP an der intrazellulären Signaltransduktion teilnimmt (Moncada et al., 1990). Über diesen Weg sind die konstitutiv exprimierten NOS an der Blutdruckregulierung beteiligt (Moncada und Higgs, 1993).

Dahingegen gilt das durch iNOS gebildete NO, das über einen längeren Zeitraum und in höheren Dosen gebildet wird (Marletta et al., 1988), als ein für die Zytotoxizität von aktivierten Makrophagen verantwortliche Agens (Hibbs et al., 1988; Xie und Nathan, 1994). Der Genlocus für iNOS befindet sich auf Chromosom 17 (Gerling et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß hohe NO-Konzentrationen in der Lage sind, DNA-Schäden zu verursachen und zum einen Betazellen so in ihrer Funktion einzuschränken, daß es zu einer verminderten Insulinsyntheseleistung kommt (Heitmeier et al., 1997), zum anderen aber auch den Untergang von humanen Inselzellen bewirken können (Eizirik et al., 1996). Neben der direkten DNA-Schädigung (Fehsel et al., 1993) ist NO aber auch in der Lage, die mitochondriale Funktion über eine Inhibition des oxidativen Stoffwechsels zu hemmen (Granger et al., 1980; Radons et al., 1994). In der Folge kommt es zur Peroxidierung von Lipiden, zur Inaktivierung von eisen-schwefelhaltigen Atmungskettenenzymen, zur Hemmung der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase (White et al., 1996) sowie zum Kalziumausstrom aus den Mitochondrien in das Zytosol durch Beeinflussung von Ionenkanälen (Nishikawa et al., 1996; Richter et al., 1994).

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

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

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

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

Die Wichtigkeit von NO im Entstehungsprozeß des Typ 1 Diabetes wird dadurch untermauert, daß es in Tiermodellen gelang, durch Inhibitoren der NO-Synthase wie

N-methyl-L-Arginin (L-NMA) den Krankheitsbeginn zu verzögern (Wu, 1995) oder die Hyperglykämie bzw. das Ausmaß der Insulinitis zu reduzieren (Lukic et al., 1991). Auch die orale Gabe von N-Nitro-L-Arginin Methylester erbrachte ähnliche Ergebnisse (Kolb (b) et al., 1991; Lindsay et al., 1995; Papaccio et al., 1995). Eine Verhinderung der Erkrankung konnte hierdurch jedoch nicht erzielt werden.

Neben den o.g. toxischen Effekten konnten neuere Studien aber auch zeigen, daß NO regulierend in die Genexpression eingreift. So konnte beispielsweise in Mäusen, die keine iNOS besitzen im Vergleich zu Mäusen mit iNOS nachgewiesen werden, daß das über iNOS produzierte NO zur Produktion von Hitzeschockprotein 70-mRNA notwendig ist (Liu et al., 2000). Dieser Mechanismus ist auch in anderen Zellen, wie beispielsweise Astrogliazellen (Calabrese et al., 2000) nachweisbar. Er erfolgt über eine Aktivierung des Hitzeschock Faktors 1 (HSF 1) (Xu et al., 1997).

## 1.6 Hitzeschockproteine

Das Phänomen der Hitzeschockantwort wurde erstmals 1962 von dem italienischen Wissenschaftler Frederico Ritossa publiziert. Er erhöhte die Wachstumstemperatur von Drosophilalarven und fand an deren Chromosomen bereits nach 1-2 min. Aufblähungen (Puffs). Später fand sich parallel zur Puffbildung eine verstärkte Synthese von einer Gruppe von Proteinen, die daher ihren Namen Hitzeschockproteine (HSP) erhielten (Tissières et al., 1974).

Die Einteilung der HSP erfolgt nach ihrem Molekulargewicht. Bisher sind HSP der Größe 8, 28, 58, 72, 73, 90 und 110 kDa bekannt (Welch, 1992 (b)). Zu den HSP werden aber auch die glucoseregulierenden Proteine (GRP) gezählt. Hier finden sich Proteine der Größe 78, 94 und 170 kDa (Bond et al., 1986).

Mittlerweile ist bekannt, daß es sich bei HSP um hoch konservierte Proteine handelt, die sowohl in Pro-, als auch in Eukaryonten vorkommen. Mitglieder der HSP 70 Gruppe gelten als die am höchsten konservierten Proteine, sie haben eine mindestens fünfzigprozentige Aminosäuregleichheit (Boorstein et al., 1994).

Die ersten Untersuchungen über die Funktion von HSP stammen aus dem Anfang der achtziger Jahre von Li und Werb (1982) und Landry et al. (1982). Sie entdeckten, daß Zellen, die für kurze Zeit einer subletalen Temperatur ausgesetzt wurden, anschließend vor einer sonst letalen Temperaturerhöhung geschützt waren.

Dieser Befund wird als induzierbare Thermotoleranz bezeichnet. Später konnte nachgewiesen werden, daß HSP 70 für diesen Effekt zumindest mitverantwortlich ist. Bei Streß wird HSP 70 als dominierendes HSP sehr stark exprimiert. Rattenfibroblasten, die stabil mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor transfiziert sind, weisen eine größere Thermotoleranz auf als entsprechende Kontrollzellen (Li et al., 1991; 1992).

Diese protektive Wirkung der HSP ist jedoch nicht allein auf eine Thermotoleranz begrenzt. So konnte für HSP 70 eine schützende Wirkung vor TNF- $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jäättelä et al., 1992), der Peroxydierung von Lipiden (Jacquier-Sarlin et al., 1994), sowie der Inhibition der mitochondrialen Atmung (Williams et al., 1993) nachgewiesen werden, wobei die letzteren beiden für die toxischen Auswirkungen von NO eine besondere Bedeutung haben (siehe 1.5.).

Beim Menschen sind vier Mitglieder der HSP 70 Familie bekannt: HSP 70, HSC 70, GRP 78 und das mitochondriale HSP 70 (mtHSP 70), wobei zwischen dem durch Streß induzierten HSP 70 und dem konstitutiv exprimierten HSC 70 eine Homologie von 95% besteht und sie sehr ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen (Welch, 1992 (b)). Beide befinden sich im Nucleus und im Zytosol und sind an der Proteinreifung beteiligt. Mittlerweile ist bekannt, das HSP auch an der Proteinfaltung und am Proteintransport beteiligt sind, sie werden daher auch als molekulare Chaperone (engl. Gouvernanten) bezeichnet. Durch ihre Chaperonfunktion verhindern sie eine Akkumulation von nicht korrekt gefalteten Proteinen (Morimoto et al., 1994; Freydmann et al., 1994).

Die schnelle und temporäre Induktion der Streßproteinsynthese wird über einen spezifischen Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF 1), der in ungestreßten Zellen in einer inaktiven Form vorliegt, gesteuert. Durch Streß ist dieser HSF in der Lage Trimere zu bilden, er akkumuliert im Zellkern und wird phosphoryliert. Über eine Bindung an spezifischen Sequenzen im Promoter der Streßproteingene wird schließlich die Transkription initiiert. Mittlerweile sind auch noch andere HSF bekannt, die jedoch nicht an der streßinduzierten HSP Synthese beteiligt sind. Es besteht aber auch eine negative Rückkopplung über die HSP und vor allem über HSP 70 auf HSF 1 (Morimoto et al., 1994).

## 1.7 HSP 70 und Typ 1 Diabetes

Ein möglicher Zusammenhang zwischen HSP 70 und der Entwicklung des Typ 1 Diabetes wird schon bereits seit Anfang der neunziger Jahre vermutet. So zeigten bereits Untersuchungen von Kawaguchi et al. (1993) eine Assoziation zwischen Polymorphismen von HSP 70 und der Inzidenz des Typ 1 Diabetes, wenngleich dieser Zusammenhang am ehesten auf die Kopplung mit dem HLA-DR3-Allel zurückzuführen ist. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Pociot et al. (1993).

Auch auf der Ebene der Inselzellen ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HSP 70 und Typ 1 Diabetes. Die Fähigkeit der Inselzelle sich nach einer nicht-tödlichen Schädigung, beispielsweise durch NO, Zytokine oder freie Radikale zu erholen, scheint von der Expressionsrate von HSP 70 abhängig zu sein. So wird auch die erhöhte Resistenz von menschlichen Inselzellen, verglichen mit Inselzellen von Nagetieren, gegen oben genannte Einflüsse auf die beim Menschen gegenüber Nagetiere drei- bis vierfach erhöhte Expression von HSP 70 zurückgeführt (Welsh et al., 1995; Eizirik et al., 1996; Burkart (b) et al., 2000).

Weiter gestützt wurde die Hypothese, daß HSP bei der Protektion pankreatischer Betazellen eine wichtige Rolle spielen durch Tiermodelle. So zeigte sich, daß sich die Empfindlichkeit von Inselzellen normaler Ratten, die bekanntermaßen hochsensibel auf ROI und NO reagieren, durch Induktion einer Streßantwort, wie beispielsweise einen Hitzeschock, deutlich herabsetzen läßt. Dahingegen ließ sich eine derartige protektive Streßantwort in Inselzellen von Diabetes suszeptiblen Ratten (diabetes-prone Bio Breeding (BB) rat) nicht auslösen, sehr wohl jedoch in Diabetes resistenten BB-Ratten, wobei beide Linien genetisch fast identisch sind und sich lediglich in einem nicht-MHC-gebundenen „Diabetes-Risiko-Gen“ unterscheiden (Colle, 1990). Parallel durchgeführte Western-blot Analysen zeigten, daß hier eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Induktion von HSP 70 und dem Auftreten einer schützenden Streßantwort besteht, so daß eine genetisch determinierte fehlende oder zu geringe HSP 70-Induktion für die Entstehung eines Typ 1 Diabetes durch das Unvermögen der Zellen auf exogene Einflüsse mit einer schützenden Streßantwort zu reagieren, mitverantwortlich sein könnte (Bellmann et al., 1997).

Daß HSP 70 für den schützenden Effekt der Streßantwort vor ROI, NO und dem Betazelltoxin Streptozotozin hauptverantwortlich ist, konnte durch eine stabile



---

Transfektion eines HSP 70-Gens in eine Ratteninsulinomzelllinie (RINm5F) gezeigt werden. Hierdurch konnte der gleiche schützende Effekt erzielt werden wie durch einen Hitzestreß (Bellmann et al., 1996).

### **1.8 Interaktionen zwischen HSP 70 und iNOS**

Über mögliche Interaktionen zwischen HSP 70 und iNOS, die wie oben beschrieben beide möglicherweise in der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes eine wichtige Rolle spielen, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Gezeigt werden konnte jedoch, daß eine gesteigerte iNOS-Aktivität, zumindest in Ratteninselzellen, zu einer erhöhten HSP 70 Produktion führt. Bisherige Untersuchungen über den Einfluß einer gesteigerten HSP 70 Expression auf die iNOS kamen leider zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wurde zum Teil eine erhöhte, zum Teil aber auch eine erniedrigte NO-Produktion festgestellt (Feinstein et al., 1996; Wong et al., 1995; de Vara et al., 1996).

---

## 1.9 Ziel der Arbeit

Bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 geht man heute davon aus, daß es sich um einen autoimmunen Prozeß handelt, durch den inselinfiltrierende Immunzellen Betazellen schädigen und schließlich zerstören. Einer der Hauptmediatoren, der zu einer Zerstörung der Betazelle führt, scheint das im Verlauf einer Insulitis von aktivierten Makrophagen produzierte NO zu sein. Durch Inhibition der iNOS, die auch in Makrophagen nachweisbar ist, gelang es in der Vergangenheit bereits das Krankheitsbild im Tiermodell zu verzögern.

Von Hitzeschockproteinen (HSP) weiß man, daß sie nicht nur eine thermoprotektive Wirkung haben, sondern Zellen auch vor anderen Noxen, wie beispielsweise ROI oder NO schützen können. Bei Streß wird HSP 70 als dominierendes HSP sehr stark exprimiert, ihm wird eine Hauptrolle unter den HSP in Bezug auf Zellprotektion zugeschrieben. Auch bei der Entwicklung des Typ 1 Diabetes wird ein betazellprotektiver Effekt von HSP 70 vermutet. So zeigt sich im Tiermodell, daß sich in Diabetes suszeptible Ratten, im Vergleich zu Diabetes resistenten Ratten, eine deutlich niedrigere HSP 70-Induktion auslösen lässt.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, inwieweit ein Hitzeschock bzw. HSP 70 in der Lage ist, Zellen vor exogenen Noxen zu schützen. Im weiteren sollte herausgefunden werden, ob HSP 70 einen Einfluß auf die, durch iNOS vermittelte, NO-Produktion hat und über welchen möglichen Mechanismus dieser Einfluß ausgeübt wird. Hintergrund dieser Fragestellung sind zum einen die bekannten, wichtigen Rollen die sowohl HSP als auch iNOS in den Modellen der Genese des Typ 1 Diabetes zugeschrieben werden, zum anderen auch die Tatsache, daß über Interaktionen zwischen HSP 70 und iNOS bisher nur sehr wenig bekannt ist.

---

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material und Geräte**

#### **2.1.1 Zelllinien**

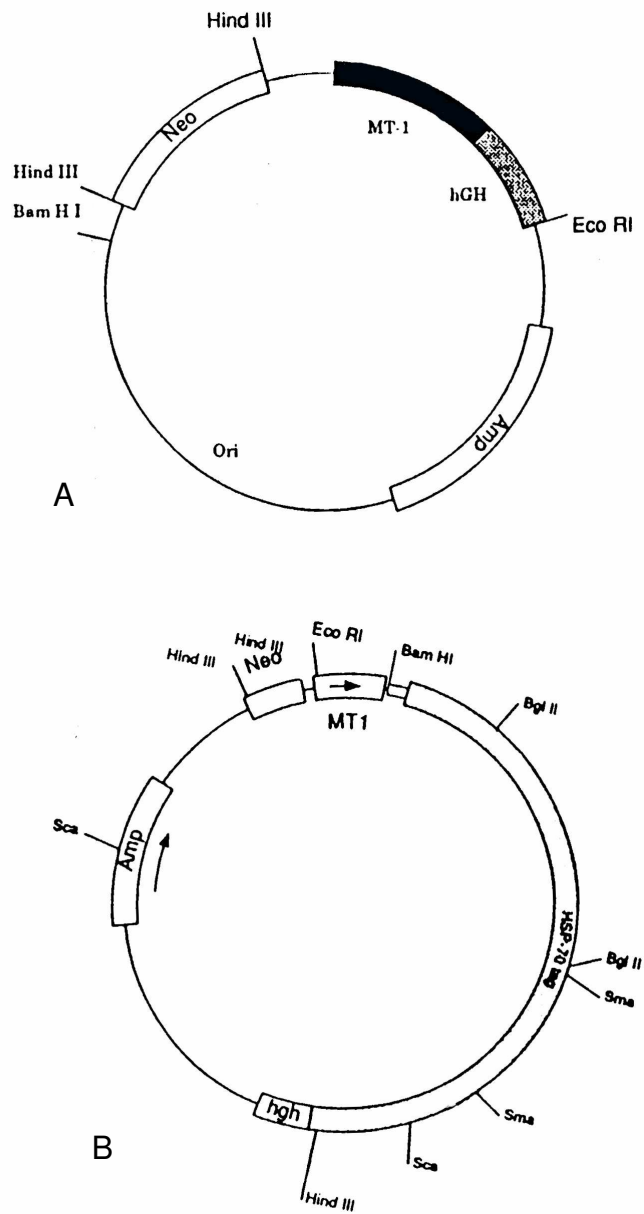
Für die Experimente wurden zum einen RINm5F-Zellen, eine durch Röntgenbestrahlung induzierte Insulinomzelllinie aus NEDH-Ratten (Chick et al., 1977) und zum anderen WEHI-S-Zellen, eine Mäusefibrosarkomzelllinie aus BALB/c Mäusen verwendet.

Zur Generierung der RK/1 Zelllinie wurde der Expressionsvektor pZEM-neo in RINm5F-Zellen transfiziert (siehe Abb. 1A). Hierbei handelt es sich um einen in Eukaryonten exprimierbaren Vektor, der einen Metallothioneinpromotor, sowie ein Ampicillin- und ein Neomycinresistenzgen besitzt.

Zur Generierung der R70/3 Zelllinie wurde der Expressionsvektor pZhsp70 verwendet, der eine Variante von pZEM-neo darstellt (siehe Abb. 1B). Hinter dem Promotor wurde das komplette humane HSP 70-Gen einschließlich einer anhängenden tag-Sequenz (Milarski und Morimoto, 1989) einkloniert. Die tag-Sequenz ist am Carboxyterminus von HSP 70 angehängt und besteht aus der für die Aminosäuren 5-15 kodierenden Sequenz des humanen Laktatdehydrogenasegens aus humanen Testis.

Die Zelllinien Wn 10x und Wn 113-5 wurden in der gleichen Weise generiert, wobei in die Wn 113-5-Zellen das humane HSP 70-Gen und in die Wn 10x-Zellen lediglich pZEM-neo einkloniert wurde.

Die Zelllinien RK/1, R70/3, Wn 10x und Wn 113-5 wurden von Dr. Kerstin Bellmann, Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut, zur Verfügung gestellt (Bellmann et al., 1996).



**Abb 1.** A: pZEM-neo, Expressionsvektor unter Kontrolle des Metallothioneinpromotors (MT 1) mit Ampicillin- (Amp) und Neomycinresistenzgen (Neo) und *human growth hormone* (hGH)-nicht translatiertem Bereich für das korrekte Spleißen (hGH); B: pZmsp70-tag, pZEM-neo mit inkloniertem humanem HSP70-Gen (HSP-70tag).

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien und Enzyme wurden, soweit sie nicht im Folgenden aufgelistet sind, von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roche (Mannheim) bezogen.

Agarose: Qualex Gold	AGS GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DEPC, Diethylpyrokarbonat	Serva, Heidelberg
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
DTT, Dithiothreitol, 0,1 M	Gibco, Eggenstein
Ethidiumbromid, wässrige Lösung (1% )	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Glycerin (86 %)	Roth, Karlsruhe
HEPES	Serva, Heidelberg
Hybond-ECL	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hypoxanthin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Jet-Sorb®-Kit zur DNA-Extraktion aus Agarose-Gel	Genomed, Bad Oeynhausen
Lithium-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema, DE-VAU-GE, Lüneburg
2-Merkaptoethanol	Serva, Heidelberg
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	USB/Amersham-Buchler, Braunschweig
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Eggenstein
Nitroprussid	Alexis, Lausen, Schweiz
Proteinleiter 10 kDa	Gibco, Eggenstein
Sodium dodekylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
TEMED	Biorad, Minden
Trizol	Gibco, Eggenstein
Trypanblau (0,4% in 0,85% NaCl)	Gibco, Eggenstein
Trypsin	Difco, Augsburg
Xylenzyanol	Serva, Heidelberg

---

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier, 3 MM	Whatman, Bad Soden
Nuc-Trap® probe purification columns	Stratagene, Heidelberg
Nylon-Membran: Hybond-N	Amersham-Buchler, Braunschweig
PCR-Tubes, ultradünn, 0,5 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Polaroidfilme, Typ 665 EP	Lang, Düsseldorf

### 2.1.4 Enzyme, Zytokine, Antikörper, Nukleinsäuren und Nukleotide

#### 2.1.4.1 Enzyme und Zytokine

Interferon- $\gamma$ , rekombinant, Ratte	Biozol, Eching
Interleukin 1 $\beta$ , rekombinant, Maus	Endogen, Boston, MA, USA
Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
LPS, aus E. coli	Sigma, St. Louis, MO, USA
Prime It II-Kit®	Stratagene, Heidelberg
Rhodanese	Sigma, St. Louis, MO, USA
Reverse Transkriptase, 200 U/ $\mu$ l	Gibco, Eggenstein
RNAsin, RNase-Inhibitor, 28000 U/ml	Promega, Madison, WC, USA
Taq-Polymerase 5 U/ $\mu$ l	USB/Amersham-Buchler, Braunschweig
Tumor Nekrosefaktor $\alpha$ , rekombinant, Maus	Genzyme, Cambridge, MA, USA
Xanthinoxidase	Sigma, St. Louis, MO, USA

---

#### 2.1.4.2 Antikörper

anti-HSP70	Maus-anti-induzierbare Form von HSP70 von fast allen Säugetieren, monoklonal (Stress Gen, Victoria, B.C. Kanada)
anti-macNOS	Maus-anti-iNOS, monoklonal (Transduction Laboratories, Lexington, KT, USA)

#### 2.1.4.3 Nukleotide

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dATP, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
dNTPs= Desoxynukleosid-Triphosphat-Set, 0,1 M	Roche, Mannheim

#### 2.1.4.4 Nukleinsäuren

Kb-Leiter-Stammlösung, DNA-Längenstandard	Gibco, Eggenstein
---	-------------------

Oligonukleotid-Primer für die RT-PCR (10-15 pmol/ $\mu$ l)

Sequenzen: 1. $\beta$ -Actin	5': TCA TAG ATG GGC ACA GTG TG
	3': CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG (Dr. H. Rothe, Deutsches Diabetes- Forschungsinstitut)
2. iNOS	5': CCT TTC CGA AGT TTC TGG CAG CA GC
	3': GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TT GG (Dr. H. Rothe, Deutsches Diabetes- Forschungsinstitut)

### 2.1.5 Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120°C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mittels eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

### 2.1.6 Einwegartikel für die Zellkultur

Plastikartikel für die Zellkultur (Mikrotiterplatten, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturschalen- und Flaschen) wurden von Falcon (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) und Greiner (Solingen, Deutschland) bezogen.

### 2.1.7 Lösungen für die Zellkultur

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	100 ml	10 x HBSS (Gibco, Eggenstein)
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,3	
	sterilfiltrieren	

Lösung A	9 g	NaCl
	10 mM	Hepes
	1 ml	Phenolrot
	10 ml	1 M KCl
	10 ml	10 % D-Glucose
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,3	
	sterilfiltrieren	

Lösung B	20 ml	Lösung A
	100 µl	40 mM EDTA



RPMI 1640

Gibco, Eggenstein

Testmedium

100 mg	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
400 mg	KCl
48,48 mg	MgSO <sub>4</sub> (anhydriert)
6 g	NaCl
800 mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> (anhydriert)
200 mg	L-Arginin
50 mg	L-Asparagin
20 mg	L-Asparaginsäure
65,15 mg	L-Cystein (2 HCl)
20 mg	L-Glutamat
300 mg	L-Glutamin
10 mg	Glycin
15 mg	L-Histidin
20 mg	L-Hydroxyprolin
50 mg	L-Isoleucin
50 mg	L-Leucin
40 mg	L-Lysin HCl
15 mg	L-Methionin
15 mg	L-Phenylalanin
20 mg	L-Prolin
30 mg	L-Serin
20 mg	L-Threonin
5 mg	L-Thryptophan
28,83 mg	L-Tyrosin
20 mg	L-Valin
1,35 g	D-Glucose
1 ml	Phenolrot
10 ml	Vitamine
10 ml	Glutathion
25 mg	Ampicillin
120 mg	Penicillin
270 mg	Streptomycin

---

	10 ml	100 mM Na-Pyruvat
	10 ml	100 x nicht-essentielle Aminosäuren
	2 g	NaHCO <sub>3</sub>
	10 ml	L-Glutamin
	2,383 g	Hepes
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,3	
	sterilfiltriert	
Trypsinlösung	20 mg	Trypsin
	ad 10 ml	0,9 % NaCl
	sterilfiltrieren	
	Aliquots bei -20 °C lagern	

### 2.1.8 Stammlösungen und -puffer

Acrylamid, 30 %	30 g	Acrylamid
	ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O	
	Lagerung bei 4 °C	
APS	1 g	Ammoniumpersulfat
	ad 10 ml H <sub>2</sub> O	
	Lagerung bei -20 °C	
Blotting Puffer	3,03 g	TRIS
	14,41 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	ad 1 l H <sub>2</sub> O	
Church-Puffer:	125 ml	NaPi (pH 7,2; 1M)
	175 ml	SDS (20%)
	1 ml	EDTA (0,5 M)

---

Denaturierungspuffer	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
	lösen in ddH <sub>2</sub> O	
DEPC-Wasser	0,1 %	DEPC in ddH <sub>2</sub> O lösen
DNA-Auftrage-Puffer	30 %	Glycerin
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylenzyanol
DNA-Längenstandard (kb-Leiter)	20 µl	kb-Leiter-Stocklösung (6 µg/µl)
	40 µl	DNA-Auftragepuffer
	180 µl	ddH <sub>2</sub> O
dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösung		
	0,1 M	dTTP
	0,1 M	dGTP
	0,1 M	dATP
	0,1 M	dCTP
	Mischung zu gleichen Teilen aus dem dNTP-Set, Roche, Mannheim	
Laufpuffer	30,3 g	TRIS
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l H <sub>2</sub> O	
	pH 8,3	
Lower TRIS (4x)	90,85g	TRIS
	20 ml	10 % SDS
	ad 500 ml	H <sub>2</sub> O
	pH 8,8	

---

NaPi (Natriumphosphat) (1 M)	89 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	3 - 4 ml	$\text{H}_3\text{PO}_4$
	ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
Neutralisierungslösung	1,25 M	Tris-HCl (pH 7,4)
	5 M	NaCl
PBS	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	14,4 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	2,4 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O
	pH 7,2	
Ponceau S (10x)	2 g	Ponceau S
	30 g	Trichloressigsäure
	30 g	Sulfosalicylsäure
	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O
SSC, Standard-Saline-Citrat, 20x	3 M	NaCl
	0,3 M	Natrium-Citrat
		mit NaOH auf pH 8 einstellen
STE, Sodium-Tris-EDTA		TE-Puffer mit 150 mM NaCl
TBE, Tris-Borsäure-EDTA, 5x	60,6 g	Tris
	26,7 g	Borsäure
	1,9 g	EDTA
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O
TE-Puffer, Tris-EDTA	10 mM	Tris/HCl (pH 8)
	1 mM	EDTA

---

TBS	50 ml	3 M NaCl
	20 ml	1 M TRIS, pH 7,6
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
TBS + Tween	6 ml	10 % Tween 20
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
Upper TRIS (4x)	30,3 g	TRIS
	20 ml	10 % SDS
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O	
	pH 6,8	
Waschpuffer:	40 mM NaP in 1 % SDS	

### 2.1.9 Geräte

Blotting Apparatur, Trans-blot SD	Biorad, Minden, Deutschland
Brutschrank, Cytoperm-2	Heraeus, Hanau
DNA-Thermocycler, HYBAID OmniGene	MWG-Biotech, Ebersberg
Elektrophoresekammer, horizontal	BRL, Gaithersburg, USA
Handmeßgerät für $\beta$ - und $\gamma$ -Strahlung, Contamat	FAG, Linkenheim-Hochstetten
Imaging plate, Fujix BAS 1000, Typ BAS-III S	Raytest, Straubenhardt
Photoapparat, Direct screen instant camera	Polaroid, Offenbach
Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Photometer Spectrophotometer DU 650	Beckman, Unterschleissheim
Photozubehör, Photoman	Hoefer, CA, USA
Push Column Beta Shield Device, Halterungen für Reinigungssäulen	Stratagene, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
SDS-Gelapparatur	Biorad, Minden
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

---

UV-Durchsichtgerät TFP-20M	Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, Frankreich
Wärmeschrank	Bachofer, Reutlingen
Werkbank HLB 2448	Heraeus, Hanau
Zentrifugen:	
- Tisch-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
- Minifuge GL 4400	Heraeus, Hanau
- Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Hanau

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturen wurden in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % gehalten. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit einem Zusatz von 10% FCS in 25 ml Flaschen. Die Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich mit einer Trypsinbehandlung vom Flaschenboden gelöst und in verschiedenen Verdünnungen in neuen Flaschen ausgesät. Hierzu wurde das gesamte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml Lösung A gespült. Anschließend wurde zu allen RIN-Zelllinien 5 ml Lösung B, zu allen WEHI-S-Zelllinien 5 ml Lösung A gegeben. Danach wurden 100 µl Trypsinlösung hinzupipettiert und die Zellen bei Raumtemperatur für ein bis drei min inkubiert, bis das Ablösen der Zellen mikroskopisch beobachtet werden konnte. Im direkten Anschluß wurden die Zellen mit 10 ml RPMI 1640 mit 10% FCS versetzt, wodurch die Trypsinaktivität gehemmt wird. Danach wurden die Zellsuspensionen bei 4° C und 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen im Verhältnis 1:10 - 1:20 mit frischem Medium verdünnt und erneut in Kulturflaschen ausgesät. Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden 0,5 - 2 x 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml RPMI 1640 mit 30% FCS und 10% DMSO für 15 Min in 10 ml Röhrchen auf Eis gestellt und anschließend für 10 bis 16 Stunden bei -80° C eingefroren. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt, in dem sie über mehrere Jahre gelagert werden können.

### **2.2.2 Behandlung von Zellen mit Hitzeschock**

Um eine vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen zu induzieren wurden die Zellen einer Hitzeschockbehandlung unterzogen. Dazu wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und Flachboden ausgesät und in einem Wärmeschrank für 60 min bei 43°C, die Kontrolle unter den oben beschriebenen allgemeinen Kulturbedingungen, inkubiert.

Für die Western-Blot Analysen wurden  $5 \times 10^7$  Zellen in 10 ml Zellkulturmedium in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) ausgesät und unter gleichen Bedingungen inkubiert.

### **2.2.3 Bestimmung der Zahl lebender und toter Zellen**

Um die Relation zwischen lebenden und toten Zellen in einer Suspension zu ermitteln, wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Aufgrund irreversibler Schädigung von Zellmembran und Transportmechanismen färben sich tote Zellen blau, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Für die Färbung wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 (v/v) mit verdünnter Trypanblaulösung (1:4 verdünnt mit 0,9 % NaCl-Lösung) gemischt und ein Aliquot in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. In den vier Eckquadraten mit je 16 kleinen Quadraten wurde die Zahl der Trypanblau-positiven und der ungefärbten Zellen bestimmt. Der Mittelwert wurde zur Berechnung der Zahl der lebenden und der toten Zellen nach folgender Formel eingesetzt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Es wurden jeweils mindestens 200 Zellen ausgezählt.

### **2.2.4 Zytotoxizitätstest**

Hierzu wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium pro Reaktionskammer von Flachbodenmikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und für 24 h im



---

Brutschrank inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen auf den Böden der Reaktionskammern zu ermöglichen.

Reaktive Sauerstoffradikale wurden mittels der Oxidation von Hypoxanthin durch das Enzym Xanthinoxidase generiert. Hierzu wurde eine Hypoxanthinkonzentration von 0,1mM und eine Xanthinoxidasekonzentration von 9mU/ml verwendet.

Als NO-Donor wurde Nitroprussid benutzt. Bei der Dekomposition von Nitroprussid entsteht Stickstoff (NO), es kann jedoch auch Cyanid freigesetzt werden. Um letzteres abzufangen wurde den Versuchsansätzen 8 U Rhodanese und 5 mM von dessen Substrat Natriumthiosulfat je 100 µl zugegeben. Nach der Toxinzugabe wurde der Testansatz für verschiedene Zeitspannen im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde aus den Reaktionskammern jeweils 80 µl des Kulturüberstandes abgenommen und 15 µl einer Trypanblaulösung zugegeben.

Nach einer 15 minütigen Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden jeweils mindestens 200 Zellen pro Reaktionskammer ausgezählt und anschließend der Anteil der Trypanblau-positiven Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Trypanblau-positive Zellen} = \frac{100 \times \text{Anzahl der Trypanblau-positiven Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

### **2.2.5 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit**

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden 0,5 x 10<sup>6</sup> RIN-, RK/1- oder R70/3-Zellen in 25 ml Kulturflaschen ausgesät und unter Kulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach einem Zeitraum von 24 bis 120 h wurden die Zellen zweimal mit Lösung A gewaschen und anschließend mit Lösung B trypsiniert. Nach Zugabe von 10 ml RPMI 1640 Medium wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt, drei min bei 4° C und 250 g zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Im Anschluß wurden die Zellen in 10 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf die Gesamtmenge von 10 ml umgerechnet.

### 2.2.6 Bestimmung des Nitritgehaltes im Zellüberstand mit Hilfe der Griess-Methode

Mittels der Griess-Methode ist es möglich, den Nitritgehalt eines Zellüberstandes, der ein Maß für die NO-Freisetzung aus kultivierten Zellen ist, zu bestimmen.

Für den Griess-Test werden folgende Lösungen benötigt:

- Lösung A: 0,1 g Sulfanilamide in 10 ml 2,5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
Lösung B: 0,03 g Naphtylethylendiamin in 10 ml 2,5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
Lösung C: Mischung von Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1.

Da die Lösungen lichtempfindlich sind, erfolgte die Lagerung im Dunkeln bei 4 °C.

Die Nitritstammlösung für den Teststandard besteht aus 69 mg/ml  $\text{NaNO}_2$  in RPMI 1640, welches mit 10 % FCS versetzt ist. Dieser Ansatz entspricht einer 1 molaren  $\text{NaNO}_2$ -Lösung. Anschließend wurde in einer Verdünnungsreihe mit Kulturmedium viermal je 1:10 verdünnt, um eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu erreichen.

Testansatz:

Der Griess Test wurde in einer Flachbodenmikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Die erste Reihe wurde freigelassen (Plattenstandard), in die zweite Reihe wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 gefüllt, um den Nitritgehalt im Kulturmedium zu bestimmen.

In die dritte bis fünfte Reihe wurde der Standard, jeweils in Triplikaten gefüllt. Die ersten drei Vertiefungen wurden mit 50  $\mu\text{l}$  der Standardlösung (100  $\mu\text{M}$ ) gefüllt und in alle folgenden Vertiefungen wurde je 50  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 vorgelegt. In das zweite Triplikat wurden ebenfalls 50  $\mu\text{l}$  der Standardlösung pipettiert, mit dem RPMI 1640 Medium gemischt, 50  $\mu\text{l}$  entnommen und zu den folgenden drei Vertiefungen gegeben und wiederum gemischt. Anschließend wurden wiederum 50  $\mu\text{l}$  entnommen und zu den folgenden drei Vertiefungen gegeben, u.s.w.. Durch diese sequentielle Verdünnung erhielt man Standardwerte mit Konzentrationen von 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ .

---

In die folgenden Reihen wurden 50 µl der Proben (z.B. Zellkulturüberstände) pipettiert und danach wurde zu allen Vertiefungen 50 µl der Lösung C gegeben. Nach 2-5 min wurde die Extinktion der Proben bei 540 nm in einem 8-Kanal-Photometer bestimmt. Aus der Extinktion der Standardwerte ergibt sich eine Eichkurve, anhand derer sich die Nitritkonzentrationen in den Proben bestimmen lassen. Der Nitritgehalt im RPMI 1640 Medium wurde von dem Nitritgehalt der Proben subtrahiert.

## **2.2.7 Nachweis von Proteinen in Zellysaten mittels Western-Blot**

Der immunchemische Nachweis von Proteinen wurde mit Hilfe der Western-Blot Analyse durchgeführt (modifiziert nach Laemmli, 1970). Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrer Größe über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das gesuchte Protein wird anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

### **2.2.7.1 Herstellung von Zellysaten**

Die Zellen, aus denen spezifische Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden zweimal mit 4° C kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers von der Petrischale abgelöst. In diesem Fall wurde auf die Trypsinierung der Zellen verzichtet, um eine mögliche Induktion von Hitzeschockproteinen durch die Behandlung auszuschließen.

Die Zellen wurden 5 min bei 250 g und 4° C zentrifugiert, in Laemmli-puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert (  $5 \times 10^5$  Zellen /10 µl), 5 min bei 95° C inkubiert und im Anschluß in einem Eppendorf-Gefäß direkt auf Eis gegeben. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 14000 g und 4° C zentrifugiert. Eine Lagerung der Lysate über mehrere Tage bis zur Proteinbestimmung erfolgte bei -20° C.

### 2.2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelapparatur zur Auftrennung der Proteine wurde nach Protokollen der Fa. Biorad mit Abstandshaltern der Größe 0,75 mm zwischen beiden Glasplatten aufgebaut. Das untere Gel wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und polymerisierte 30 min aus. Darüber wurde das obere Gel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Geltaschen eingesteckt. Anschließend folgte eine 20 minütige Polymerisationsphase. Danach wurde der Kamm herausgezogen und die Geltaschen mit Wasser gespült. Die Gelapparatur wurde mit Laufpuffer (1x) gefüllt und 10 µl der Proben je Geltasche aufgetragen. In die letzte Geltasche wurden 10 µl eines 10 Kilodalton-Markers gegeben, um später die Größe der gefundenen Proteine bestimmen zu können. Die Laufzeit betrug 60 min bei 200 V.

Durch die unterschiedliche Vernetzung der beiden Gele kommt es zu einer besseren Auftrennung der Proben mit schärferen Proteinbanden.

Unteres Gel (10%)	940 µl	Lower TRIS (4x)
	1245 µl	Acrylamid (30 %)
	505 µl	Bisacrylamid (2 %)
	1060 µl	H <sub>2</sub> O
	4,5 µl	TEMED
	10 µl	APS
Oberes Gel (5 %)	625 µl	Upper TRIS (4x)
	325 µl	Acrylamid (30 %)
	260 µl	Bisacrylamid ( 2 %)
	1290 µl	H <sub>2</sub> O
	5,5 µl	TEMED
	25 µl	APS

### **2.2.7.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran**

Nach Abtragung des oberen Gels wurde das untere Gel von der Glasscheibe entfernt und 10 min in Blotting Puffer schüttelnd inkubiert. Ein entsprechend großes Stück Hybond-ECL Membran und 4 Stücke Whatman-Papier wurden zurechtgeschnitten und ebenfalls für 10 min in Blotting-Puffer schüttelnd inkubiert. Der aus zwei Schichten Whatman-Papier, dem Gel, der ECL-Membran und wiederum 2 Schichten Whatman-Papier bestehende Blot wurde in die Blotting Apparatur gegeben. Diese wurde mit Blotting-Puffer aufgefüllt, eine bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlte Eisbox zugegeben und bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Magnetrührer inkubiert.

Der Transfer erfolgte bei 100 V für 60 min. Zur Anfärbung der Proteine wurde die Membran für 2 min mit Ponceau S inkubiert, um so den Erfolg des Transfers vom Gel auf die Membran überprüfen zu können. Zum Entfärben wurde die Membran dreimal für zwei min mit TBS gewaschen.

### **2.2.7.4 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Um filtergebundene Proteine immunzytochemisch nachzuweisen, wurde die ECL-Methode (ECL: enhanced chemiluminescence ; Whitehead et al, 1979) angewendet (Amersham).

Lumineszenz ist definiert als Lichtemission, die aus dem Energieverlust einer Substanz entsteht, die sich in einem angeregten Zustand befindet. Bei Chemilumineszenz erfolgt diese Anregung durch eine chemische Reaktion. Bei der ECL-Methode erfolgt diese Reaktion durch die von Peroxidase in Anwesenheit von Hydrogenperoxid katalysierte Oxidation von Luminol. Direkt nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand, der durch die Lichtemission der Wellenlänge 428 nm abklingt und durch einen Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilm detektiert werden kann.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurde die Membran für 30 min mit 5 % Trockenmilchpulver (in TBS) schüttelnd inkubiert und dann 1 x 15 min und 2 x 5 min mit TBS und Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (beim monoklonalen anti-iNOS-Antikörper Verdünnung

---

1:500, bei monoklonalem anti-HSP70-Antikörper Verdünnung 1:1.000 in 0,5 % Trockenmilchpulver in TBS) 16 h schüttelnd bei 4° C inkubiert und dann dreimal 10 min mit TBS + Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde beim anti-iNOS-Antikörper 1:10.000, beim anti-HSP70-Antikörper 1:20.000 in 0,5 % Trockenmilchpulver in TBS verdünnt und mit der Membran 30 min schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran (je 10 min) mit TBS + Tween, wurde sie 1-2 min mit den 1:1 gemischten Komponenten des Luminol-enthaltenden ECL-Detektionskits (Amersham) inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt, die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und ein Hyperfilm-ECL (Amersham) in einer Fotokassette aufgelegt. Der Film wurde nach 2 min bis 16 h entwickelt.

Der Nachweis eines Proteins erfolgte mittels einer Schwärzung des Films an der dem Molekulargewicht entsprechenden Stelle.

## **2.2.8 Nachweis von mRNA-Expression in RIN und WEHI-Zellen**

### **2.2.8.1 RNA-Isolation aus RINm5F und WEHI-Zellen**

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Trizol-Reagenz aus Zellen isoliert. Hierzu wurde das gesamte auf den Petrischalen befindliche Medium abgesaugt und 1 ml Trizol auf die verbliebenen adhärenen Zellen gegeben. Da es sich bei Trizol um einen phenolhaltigen Stoff handelt, wurde stets mit Handschuhen unter einem Abzug gearbeitet. Die Zellen lösten sich von der Petrischale und wurden im folgenden mit einem Zellschaber homogenisiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pipette wurde die Zellsuspension nochmals homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 0,2 ml Chloroform zugefügt und nochmals für drei min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4° C und 12.000 g für 15 Min zentrifugiert. Um Verunreinigungen mit RNAsen zu verhindern, wurde auch in den folgenden Arbeitsschritten immer mit Handschuhen gearbeitet. Nach der Zentrifugation wurde die oberste der drei entstandenen Phasen abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß es nicht zu Verunreinigungen mit der zweiten, DNA und Proteine enthaltenden, Phase kommt.

Anschließend wurden 0,5 ml Isopropanol und 0,5 µl Glykogen als Carrier zugegeben, gründlich mit einem Vortex-Mixer gemischt und die Proben 10 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4° C und 12.000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 0,2 ml 70% DEPC-H<sub>2</sub>O/Ethanol gelöst. Es wurde nochmals auf dem Vortex-Mixer gemischt, die Proben bei 4° C und 7.500 g fünf min zentrifugiert, und der gesamte Überstand im direkten Anschluß daran abgenommen. Die Proben wurden luftgetrocknet und danach in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -20° C.

#### **2.2.8.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Zur Bestimmung der RNA-Konzentrationen wurde bei jeder Probe eine photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm durchgeführt. Da eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht, wurde das Ergebnis mit dem Faktor 40 multipliziert.

Zur Bestimmung der Protein-Kontamination wurde zusätzlich die Ratio, d. h. das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Nukleinsäuren haben zwei Absorptionsmaxima, bei 260 und bei 280 nm mit einem Verhältnis von 2 : 1. Da Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (z.B. Tryptophan) ebenfalls bei 280 nm absorbieren zeigt eine Ratio von < 2 eine Verunreinigung durch Proteine an. Eine Ratio von > 1,8 zeigt einen akzeptablen Reinheitsgrad der Proben an. Die Proben wurden mit 10 µl DTT und 1 µl RNAsin versetzt und bei - 80° C gelagert.

#### **2.2.8.3 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion**

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1985 erstmals beschrieben (Saiki et al.). Sie stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, das unter Nachahmung der in vivo DNA-Replikation die selektive in vitro DNA-Amplifikation einer speziellen DNA-Region ermöglicht.

Kurze Zeit nach Beschreibung des PCR-Verfahrens wurde die Verknüpfung von Reverser Transkription und PCR beschrieben (Chelly et al., 1988; Kawasaki, 1991). Durch diese Verknüpfung, kurz RT-PCR genannt wurde erstmals die Amplifikation von spezifischen mRNA Molekülen nach Umschreibung in cDNA möglich. Es zeigte sich, daß die RT-PCR 1.000 bis 10.000 mal empfindlicher ist als die Northern-Blot-Technik (Byrne et al., 1988).

Um eine spezifische RNA- bzw. DNA-Sequenz amplifizieren zu können, sind Oligonukleotide notwendig, die die Region auf der mRNA bzw. cDNA, die amplifiziert werden soll, flankieren. Diese Oligonukleotide werden Primer genannt. Die Primer, deren Sequenz komplementär zur jeweiligen RNA- bzw. DNA-Sequenz ist, lagern sich in der Annealing-Phase der PCR an die RNA bzw. DNA an, so daß die Enzyme (Reverse Transkriptase bzw. DNA-Polymerase) an ihnen ansetzen können. Durch Einbau von dNTPs entlang der mRNA bzw. cDNA wird dann ein komplementärer neuer cDNA Strang synthetisiert (Elongation). Durch anschließende Denaturierung bei 95° C werden die beiden Stränge voneinander gelöst und stehen nun für eine erneute Polymerisation als Matrize zur Verfügung.

#### **2.2.8.4 Reverse Transkription der mRNA**

Bei der Reversen Transkription (RT) wird die aus den Zellen gewonnene mRNA durch ein Enzym (Reverse Transkriptase) in die komplementäre cDNA umgeschrieben.

Man kann drei Wege unterscheiden um eine cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase durchzuführen:

##### **1. Spezifisches Priming:**

Hierbei kommt ein 3' (antisense) Gen-spezifischer Primer, der zum mRNA Strang komplementär ist, zum Einsatz. Er lagert sich an die mRNA an und wird durch Reverse Transkriptase verlängert, wodurch eine cDNA Matrize entsteht. Mit einem, ebenfalls genspezifischen 5' (sense) Primer, kann nun die PCR-Amplifikation beginnen.



## 2. Oligo(dT) Priming:

Hierbei werden Oligo(dT) Nukleotide verwendet, die sich an das Poly A-Ende jeder mRNA anlagern und so die gesamte mRNA in cDNA umschreiben. Zur PCR werden dann die gen-spezifischen Primer hinzugegeben.

## 3. Random Priming:

Hierbei werden Hexanukleotide verwendet, die sich zufällig an einer Stelle der mRNA anlagern. Wie beim Oligo(dT) Priming wird auch die gesamte mRNA umgeschrieben und die spezifischen Primer erst zur PCR zugegeben.

Aufgrund der höheren Spezifität bereits beim ersten Schritt der PCR läßt sich mit dem spezifischen Priming eine selektive reverse Transkription der mRNA erreichen, weshalb diese Methode in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde das spezifische Priming unter Verwendung des folgenden genspezifischen Primers durchgeführt:

Für einen RT-Ansatz wurden folgende Reagenzien in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

- 4 µl 5 x RT-Puffer
- 2 µl 100mM DTT
- 0.5 µl RNAsin (28 U/ml)
- 1 µl dNTP-Lösung (0,1 M )
- 6 µg RNA aus den isolierten Proben
- ad 19 µl DEPC-Wasser

Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Gefäß zum Auffalten der Sekundärstruktur 10 min bei 65° C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurde 1 µl Reverse Transkriptase II (200 U/µl) zugefügt und kurz zentrifugiert. Zur reversen Transkription wurden die Proben 60 min bei 42° C im Thermo-Cycler inkubiert und anschließend zur Hemmung eventueller DNase-Aktivitäten kühl gestellt.

### 2.2.8.5 c-DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Ein Zyklus in der PCR besteht aus Annealing, Elongation und Denaturierung. Nach ca. 40 solcher Zyklen erreicht die Menge der amplifizierten DNA ein Sättigungsniveau, da sie während der PCR exponentiell zunimmt. Die Anzahl der Zyklen muß daher so gewählt werden, daß sich die amplifizierte DNA nicht in einem Sättigungsbereich befindet, um noch unterschiedliche Mengen der eingesetzten mRNA detektieren zu können. Weiterhin muß die berechnete Schmelztemperatur der Primer, sowie die Elongationsdauer pro Zyklus, die sich je nach Länge des zu amplifizierenden Produktes ändert, bei der Wahl des Thermo-Cyclerprogramms beachtet werden.

Für die PCR wurden pro Ansatz folgende Reagenzien in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

2 µl 10 x Polymerase-Puffer  
0,625 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM )  
0,25 µl 3'Primer (10-15 pmol/ml )  
0,25 µl 5'Primer (10-15 pmol/ml)  
ad 23,4 µl DEPC-Wasser

Die Reagenzien wurden gemischt und kurz zentrifugiert. Aus diesem Pool wurden 18,4 µl mit 5 µl der Proben aus der RT pipettiert, zentrifugiert und mit 80 µl Mineralöl überschichtet. Nach Erwärmung auf 78° C im Thermo-Cycler wurden 1,6 µl verdünnter Taq-Polymerase (1,2 U/1,6 µl mit DEPC-Wasser verdünnt) unter die Ölphase gegeben. Dieser sogenannte Hot-Start bewirkt eine Denaturierung von unspezifischen Primer-Template-Komplexen, so daß diese nicht verlängert werden können. Anschließend wurde 5 min bei 95° C denaturiert. Die Annealingzeit betrug für den ersten Zyklus 60 sec., für alle weiteren Zyklen 45 sec.

Es wurden folgende Annealingtemperaturen gewählt:

β-Actin	61° C
iNOS	55° C

---

Die Elongationsdauer betrug 2 min bei 72° C.

Nach insgesamt 36 Zyklen für iNOS und 25 Zyklen für  $\beta$ -Actin wurden die Proben nochmals 7 min bei 72° C inkubiert und anschließend bis zum Auftrag auf das Agarosegel bei 4° C gelagert.

### **2.2.8.6 DNA-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde eine Gelelektrophorese in 2 % Agarosegelen durchgeführt.

Zur Herstellung der Gele wurden:

1 g NuSieve Agarose

5 ml 5 x TBE

ad 50 ml H<sub>2</sub>O

gemischt, erhitzt bis die Agarose geschmolzen war und auf einem Magnetrührer auf ca. 50° C abgekühlt. Um die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Gel mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung versetzt. Das 13 x 8,5 x 0,7 cm große Gel wurde in ein Gelbett gegossen und mit einem Kamm zur Aussparung der Probenaschen versehen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 0,5 x TBE bedeckt. Um später die Größe der DNA-Fragmente ablesen zu können, wurde in eine Tasche 5  $\mu$ l eines DNA-Längenstandards (1 kb-Leiter) pipettiert. 10  $\mu$ l jeder Probe wurde mit 2  $\mu$ l DNA-Auftragepuffer gemischt und in die Probenaschen pipettiert.

Die Auftrennung erfolgte bei 100 - 120 V für 90 min. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe von UV-Licht auf das Vorhandensein von spezifischen Banden kontrolliert und fotografiert.

### **2.2.8.7 Transfer von DNA aus Agarose-Gel auf Nylonmembranen**

Zur weiteren Untersuchung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese auf eine Nylonmembran transferiert.

Das Agarosegel wurde für 45 min in Denaturierungspuffer und anschließend für 45 min in Neutralisierungspuffer schüttelnd inkubiert. Im Anschluß wurde das Gel zusammen mit einem gleich großen Stück Nylonmembran, sowie vier entsprechend großen Stücken Whatman-Papier kurz in 10 x SSC eingelegt. Anschließend wurden zwei Lagen Whatman-Papier, das Gel, die Membran und wiederum zwei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander auf eine Glasplatte gelegt und mit einem etwa fünf cm hohen Stapel trockener Papiertücher bedeckt. Hierauf wurde wiederum eine Glasplatte gelegt und der gesamte Aufbau mit einem Gewicht von etwa 1.000 g beschwert. Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von 16 - 20 h. Nach dem Transfer wurde die Position der Geltaschen mit einem Bleistift auf der Nylonmembran markiert, das Gel wurde verworfen. Die Membran wurde für drei min in 4 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und zur Quervernetzung der übertragenen DNA mit der Membran, beispielsweise durch Thymidin-Thymidin-Verknüpfungen, für fünf Min mit UV-Licht der Wellenlänge 318 nm bestrahlt.

### **2.2.8.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Bei den Versuchen zu dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Feinberg und Vogelstein (1982) angewendet. Hierbei finden Hexanukleotide, nach dem Prinzip des Random Primings, Anwendung, so daß DNA komplementär zur eingesetzten cDNA synthetisiert wird. Hierbei wird radioaktives [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP in den neu synthetisierten Strang eingebaut.

Für einen Ansatz wurden 12,5 ng DNA und die entsprechende Menge des „Prime it II-Kit“ der Fa. Stratagene verwendet. Die Doppelstränge des DNA-Fragmentes wurden durch 10 minütige Inkubation bei 95° C voneinander getrennt, anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Nachdem 2,5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (10 µCi/µl) und 0,5 µl Klenow-Polymerase zugegeben worden waren, wurde vorsichtig vermischt und der Ansatz für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Biogel P 60 Säule (Nuc Trap Push Column) mit 70 µl STE äquilibriert, die

---

in 70 µl STE aufgenommene radioaktive DNA-Lösung auf die Säule gegeben, langsam mit Hilfe einer Spritze durchgedrückt und in einem Eppendorf-Reagenzgefäß aufgefangen. Hierdurch werden die radioaktiven Nukleotide abgetrennt, die nicht eingebaut worden sind. Zum Abschluß wurde die Säule mit 70 µl STE gespült und die Radioaktivität der DNA-Lösung mit einem geeichten Handmeßgerät bestimmt. Zur Hybridisierung wurden nur Proben mit einer Radioaktivität von mindestens  $10^8$  cpm/µg DNA verwendet.

#### **2.2.8.9 Hybridisierung membrangebundener DNA**

Für die Hybridisierung, der Anlagerung von zwei komplementären Nukleinsäuren zu einem Doppelstrang, wurde eine modifizierte Methode von Sambrook et al. (1989) angewendet.

Bei der Vorhybridisierung wurde die Membran in Röhrchen mit einem Volumen von 50 ml gegeben. Es wurden 3 ml des auf 65° C vorgewärmten Church-Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 65° C inkubiert. Hierdurch kommt es zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen. Der Reaktionsansatz wurde zur Denaturierung bei 95° C für 10 min inkubiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Im direkten Anschluß wurde er mit 65° C warmen Church-Puffer (3 ml je Röhrchen) gemischt und auf die Röhrchen verteilt. Zur Hybridisierung wurde 16 - 20 h bei 65° C schüttelnd inkubiert.

Um nicht gebundene Nukleinsäuren zu entfernen wurden mehrere Waschschrte durchgeführt. Hierzu wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran in den Röhrchen mit 65° C warmen Waschpuffer gespült. Anschließend wurden die Membranen in Schalen gelegt und zweimal für jeweils 50 - 60 min mit 65° C warmen Waschpuffer schüttelnd inkubiert und dann in Kunststoffolie eingeschweißt.

#### **2.2.8.10 Quantifizierung der radioaktiven Signale**

Zur Auswertung der Signale wurde ein Bio-Imager verwendet. Bei diesem Auswertungssystem trifft die von der Membran ausgehende radioaktive Strahlung des P-32-Isotops auf eine „Imaging-Plate“, die hierdurch wiederum selbst Strahlen

---

aussendet, die vom Analysegerät gemessen werden können. Die gemessene Größe PSL (Phosphor stimulated Luminescence) wird in cpm (Counts per minute) angegeben. Durch diese semiquantitative Messung kann auf die Menge der in der RT-PCR amplifizierten cDNA zurückgeschlossen werden.

Um unterschiedliche Quantitäten der eingesetzten mRNA-Menge auszugleichen, wurden die Ergebnisse durch die jeweiligen Ergebnisse für  $\beta$ -Actin dividiert. Diese Vorgehensweise ist möglich, da  $\beta$ -Actin in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird und eine nahezu konstante Expression auch bei unterschiedlichen Aktivierungszuständen zeigt. Die  $\beta$ -Actin-m-RNA-Expression kann daher als Maß für die eingesetzte Gesamt-m-RNA-Menge gesetzt werden.

### **2.3 Statistik**

Bei der Auswertung der Daten wurden 3 bis 6 Einzelwerte zu einem Mittelwert zusammengefaßt.

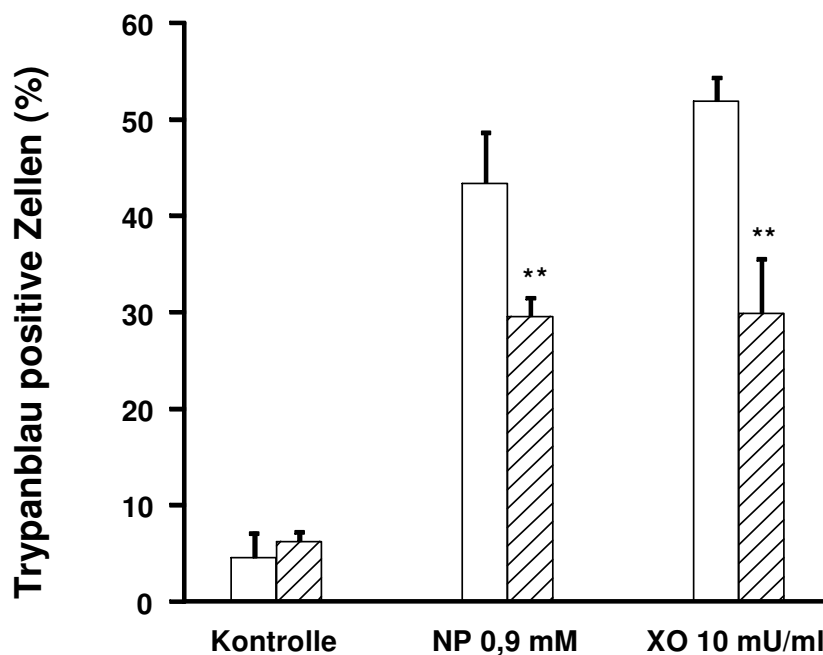
Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem Student's t-Test (zweiseitig), wobei das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgesetzt wurde.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Protektive Effekte einer Hitzeschockbehandlung**

Durch Erhöhung der Umgebungstemperatur wird auf Zellen ein Hitzestreß ausgeübt, den diese mit einer vermehrten Expression von Streßproteinen beantworten (Welch, 1992 (b)). Um einen möglichen protektiven Effekt einer Hitzeschockbehandlung vor einer radikalinduzierten Schädigung nachzuweisen, wurden zunächst RIN-Zellen für 60 min bei 43°C hitzestressiert und anschließend für 4 h bei 37°C zur Regeneration inkubiert. Danach wurden die Zellen für 18 h mit dem NO-Donor Nitroprussid oder mit dem Sauerstoffradikal-generierenden System Hypoxanthin/Xanthinoxidase behandelt. Im Falle der NO-Generation durch Nitroprussid wurden in die Ansätze, wie unter Material und Methoden beschrieben, Natriumthiosulfat und Rhodanese zugegeben, um eventuell freigesetzte CN<sup>-</sup>-Ionen zu inaktivieren. Bei der Generierung von Sauerstoffradikalen durch Xanthinoxidase wurde die Hypoxanthinkonzentration auf 0,1 mM festgelegt. Der Anteil der lysierten Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 2 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß eine 60 minütige Hitzeschockbehandlung bei 43°C die Rate radikalinduzierter Zellyse, gemessen am Prozentsatz der Trypanblau positiven Zellen, signifikant erniedrigen kann. Hierbei zeigten sich bei Nitroprussid und bei Xanthinoxidase/Hypoxanthin ähnliche Verbesserungen der Überlebensrate. So waren bei den mit Nitroprussid behandelten Zellen, die zuvor keinem Hitzeschock ausgesetzt waren, 46,6% der Zellen lysiert. Dagegen zeigte sich bei den Zellen nach Hitzeschock eine signifikant ( $p < 0,005$ ) niedrigere Lyserate (29,5%). Die entsprechenden Unterschiede bei den mit Xanthinoxidase behandelten Zellen waren ebenfalls signifikant ( $p < 0,005$ ), die Raten betragen 51,8% bzw. 29,8%. Die spontane Lyserate war bei den Zellen nach einer Hitzeschockbehandlung nicht signifikant erhöht.



**Abb. 2:** Reduzierte Lyse von RIN-Zellen nach Hitzeschockbehandlung und Inkubation mit Nitroprussid (NP) und Xanthinoxidase (XO). Die RIN-Zellen blieben unbehandelt (37°C, offene Balken) oder erhielten eine Hitzeschockbehandlung für 60 min (43°C, schraffierte Balken). Danach wurden die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 18 h in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Gegenwart von NP oder HX/XO inkubiert. Die Zellyse wurde mittels der Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 Messungen (+ SD).\*\* 0,005 im Vergleich zu den Ansätzen ohne Hitzeschock.

### 3.2 Western-Blot-Analysen zum Nachweis von HSP 70

Um die Induktion von Hitzeschockproteinen durch einen Hitzeschock von 60 min bei 43° C nachzuweisen wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$  RIN-Zellen in 10 ml Medium in Petrischalen ausgesät und für einen Tag bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 60 min bei 43° C und für 4 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Petrischale gelöst und wie in „Methoden“ beschrieben aufgearbeitet, eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt und schließlich die so gewonnenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bei der Immundetektion wurde der Primärantikörper  $\alpha$ HSP 70 mit einer Verdünnung von 1:1.000, der entsprechende Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1: 20.000 eingesetzt. Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Western-Blot Analyse.



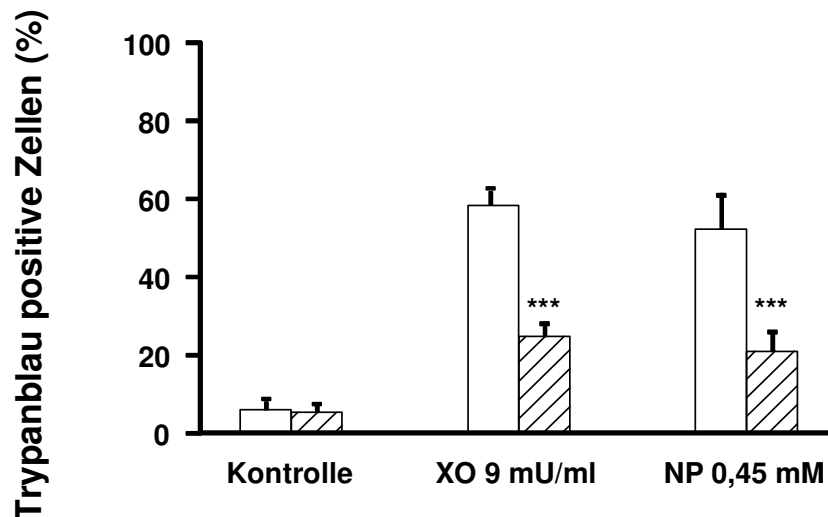


**Abb. 3:** Induktion von HSP 70 durch Hitzeschockbehandlung. Darstellung des Chemilumineszenzfilms nach Western-Blot Analyse. In jeder Spur wurden Zellysate aus  $0,5 \times 10^5$  RIN-Zellen aufgetrennt. Spuren 1-3: RIN-Zellen nach 60 min Hitzeschock bei  $43^\circ\text{C}$  und 4 stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ .; Spuren 4-5: Unbehandelte RIN-Zellen als Kontrolle.

Die Western-Blot Analysen zeigten, daß RIN-Zellen nach einem Hitzeschock von 60 min bei  $43^\circ\text{C}$  mit einer Expression von HSP 70 Protein reagieren (Abb. 3, Spur 1-3). In unbehandelten RIN-Zellen war mit diesem Verfahren keine HSP 70 Expression nachweisbar (Abb. 3, Spur 4,5).

### **3.3            Protektive Effekte einer Transfektion von RIN-Zellen mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor**

Um nachzuweisen, daß auch der alleinige Einfluß von HSP 70 eine erhöhte Überlebensrate in Gegenwart von Radikalen bewirkt, wurden Zellen der HSP 70 überexprimierenden RIN-Zelllinie R 70/3 und Zellen der entsprechenden Kontrolllinie RK/1 ebenfalls mit Sauerstoffradikalen oder mit Nitroprussid behandelt. Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit 9 mU/ml Xanthinoxidase (Hypoxanthinkonzentration: 0,1 mM) oder 0,45 mM Nitroprussid inkubiert. Gemessen wurde die Zellyse mittels der Trypanblaufärbung. Das Ergebnis ist in der Abb. 4 dargestellt.



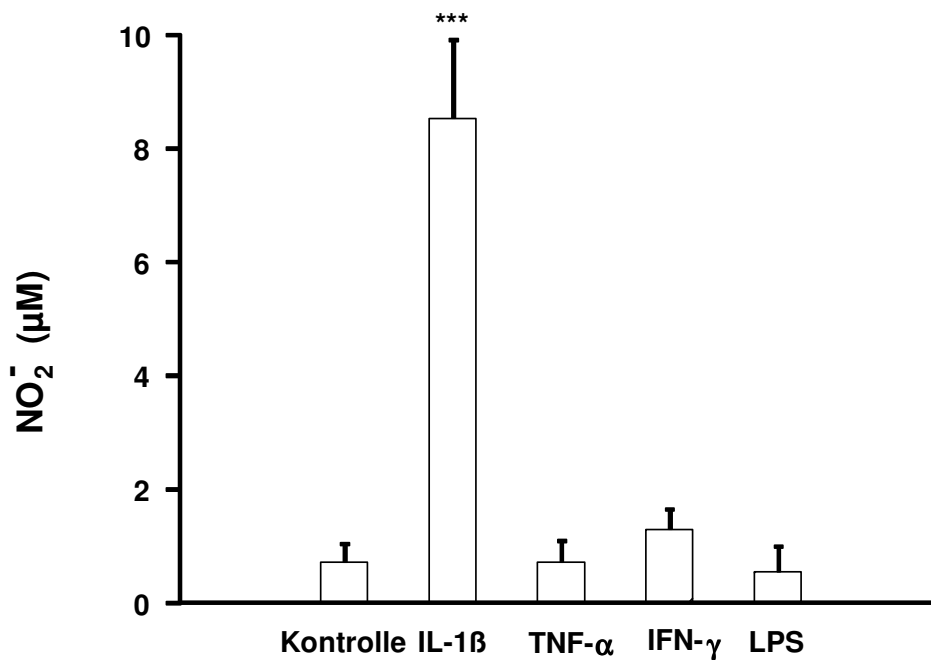
**Abb. 4:** Erhöhte Überlebensrate von HSP70 überexprimierenden R 70/3-Zellen (schraffierte Balken) gegenüber der RK/1-Zelllinie mit normaler HSP70 Expression (offene Balken) nach 24 stündiger Inkubation mit Xanthinoxidase bzw. Nitroprussid. Dargestellt ist die Lyserate in Prozent gemessen nach der Trypanblaufärbung. Die Abb. zeigt den Mittelwert von sechs Ansätzen. \*\*\*  $p < 0,0001$  im Vergleich zwischen den beiden Zelllinien.

Die Abb. zeigt eine erniedrigte Lyserate bei den mit HSP 70 transfizierten Zellen (R70/3) gegenüber den mit einem Kontrollvektor transfizierten RK/1-Zellen, und das sowohl nach einer Behandlung mit Sauerstoffradikalen, als auch mit dem NO-Donor Nitroprussid. Bei einer Konzentration von 10 U/ml Xanthinoxidase zeigt sich, daß die Lyserate der R 70/3-Zelllinie (24,6%) weniger als die Hälfte der Lyserate der Kontrollzelllinie RK/1 (58,2%) beträgt ( $p < 0,0001$ ). Auch bei der Inkubation dieser Zelllinien mit Nitroprussid in einer Konzentration von 0,45 mM zeigten sich ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Lyseraten. Hier waren 52,1% der RK/1-Zellen lysiert gegenüber 20,8% der R70/3-Zellen ( $p < 0,0001$ ).

### 3.4 Induktion der NO-Produktion in RIN-Zellen durch Zytokine

Nachdem der protektive Einfluß der HSP 70 Expression auf die radikalinduzierte Lyse von RIN-Zellen gezeigt werden konnte, sollte die Wirkung der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  sowie LPS auf diese Zelllinie untersucht werden. Hierzu wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung in eine

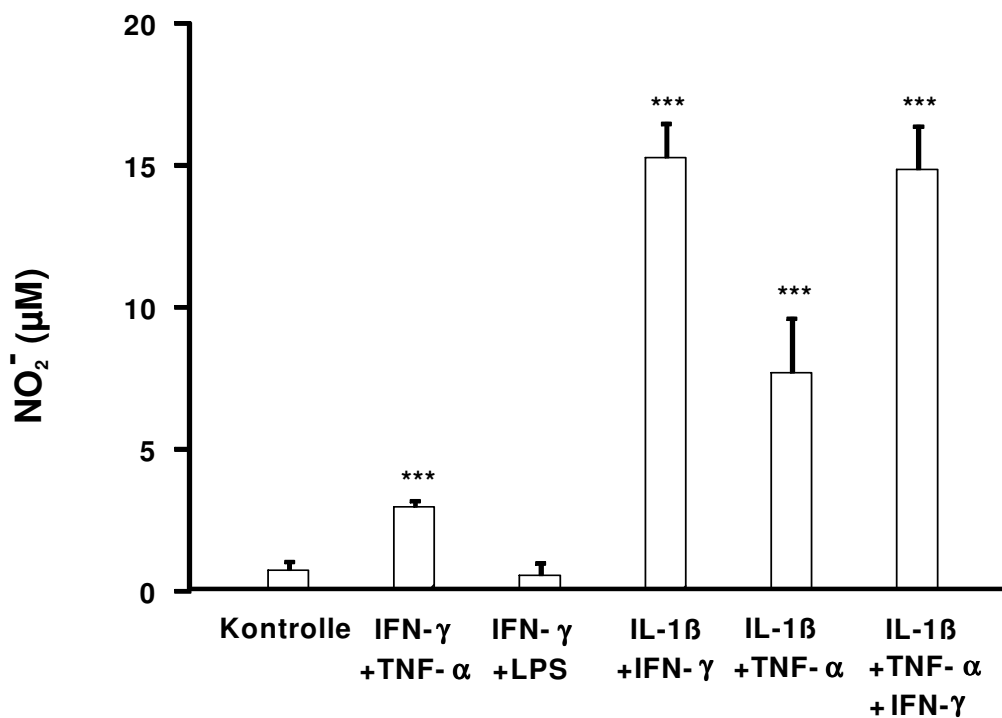
Flachbodenmikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und für 24 h mit den oben genannten Zytokinen inkubiert. Danach wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion die Menge des im Kulturüberstand akkumulierten  $\text{NO}_2^-$  als Maß für das von den Zellen gebildete NO bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt:



**Abb. 5:** Effekt von inflammatorischen Mediatoren auf die NO-Produktion von RIN-Zellen. Es wurden  $0,2 \times 10^6$  RIN-Zellen/ml für 24 h mit 10 U/ml IL1- $\beta$ , 2500 U/ml TNF- $\alpha$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  oder 10 ng/ml LPS inkubiert. Abgebildet ist der Nitritgehalt des Zellüberstandes gemessen nach der Griess-Reaktion. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei Ansätzen + SD. \*\*\*  $p < 0,0001$  im Vergleich zur Kontrolle.

Die Abb. zeigt die deutliche Induktion der NO-Produktion von RIN-Zellen bei IL1- $\beta$ -Exposition ( $8,51 \mu\text{M NO}_2^-$ ). IFN- $\gamma$  bewirkt nur eine minimal größere Nitritakkumulation ( $1,29 \mu\text{M NO}_2^-$ ) als in den Kontrollansätzen ( $0,8 \mu\text{M NO}_2^-$ ). TNF- $\alpha$  und LPS bewirken in den angegebenen Konzentrationen keine erhöhte Nitritbildung.

Im Anschluß hieran wurde untersucht, mit welchen Zytokinkombinationen eine Steigerung der Nitritakkumulation zu erzielen ist. Die Versuchsanordnung glich der des vorher dargestellten Versuches, jedoch wurden die Zellen jetzt mit Kombinationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie LPS inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt:

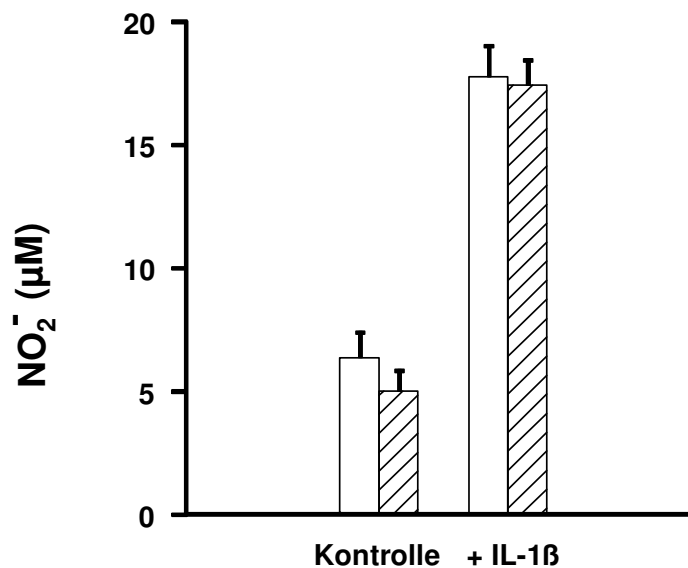


**Abb. 6:** Induktion von NO-Bildung in RIN-Zellen (vgl. Abb. 5). Inkubation mit Kombinationen von IFN- $\gamma$  (50 U/ml), TNF- $\alpha$  (2500 U/ml), IL-1 $\beta$  (10 U/ml) und LPS (100 ng/ml) für 24 h. Die Abb. zeigt die Mittelwerte + SD der Nitritakkumulation aus drei Messungen nach der Griess-Methode. \*\*\*  $p < 0,0001$  gegenüber Kontrolle.

Die Abb. zeigt, daß sich eine maximale Nitritfreisetzung von 15,3  $\mu\text{M}$  durch die Kombination von IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  erzielen läßt. Die Induktion der Nitritbildung ist jedoch auch bei der Kombination von IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  nicht signifikant geringer (14,8  $\mu\text{M}$ ). Es zeigte sich weiterhin, daß die Kombination von IL-1 $\beta$  mit IFN- $\gamma$  eine ca. zweimal so hohe Nitritbildung auslöst wie dessen Kombination mit TNF- $\alpha$  (7,7  $\mu\text{M}$ ). Die Kombination von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induziert nur eine sehr geringe NO-Freisetzung (3,0  $\mu\text{M}$ ). LPS und IFN- $\gamma$  sind nicht in der Lage, eine größere NO-Freisetzung als in der Mediumkontrolle zu provozieren.

### 3.5 Einfluß der Glukosekonzentration auf die NO-Produktion

Um einen möglichen Einfluß der relativ hohen Glukosekonzentration des RPMI-Mediums (11mM) auf die NO-Produktion von RIN-Zellen zu untersuchen wurde eine Behandlung mit IL-1 $\beta$  sowohl in RPMI-Medium, als auch im Testmedium, das eine Glukosekonzentration von 4 mM besitzt, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt.



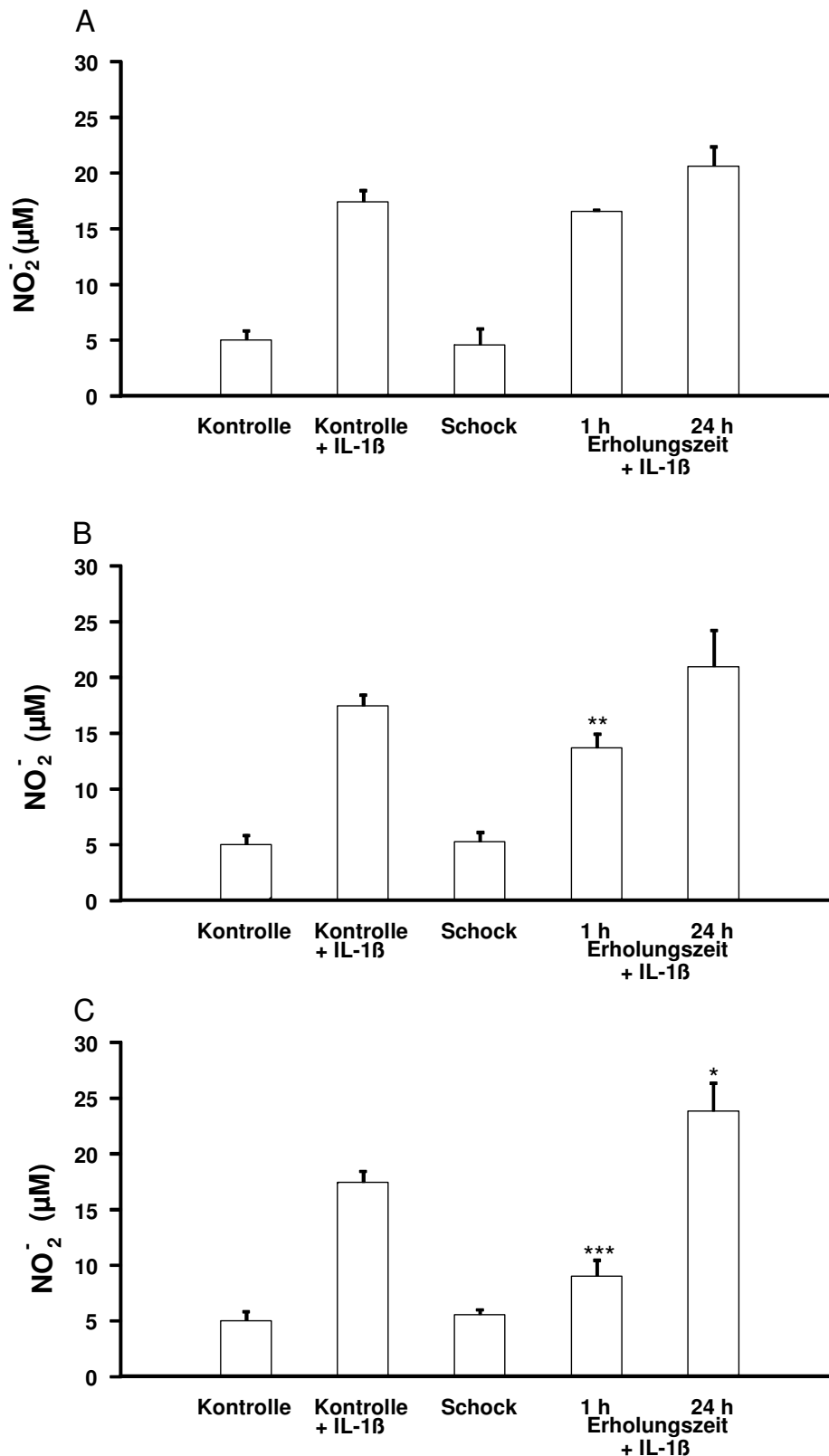
**Abb. 7:** Einfluß des Glukosegehaltes im Medium auf die NO-Produktion von RIN-Zellen. Abgebildet ist die Konzentration des akkumulierten Nitrits nach einer 24-stündigen Inkubation mit IL-1 $\beta$  (50 U/ml) im Testmedium (offene Balken) bzw. RPMI-Medium (schraffierte Balken). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Ansätzen (+SD).

Es konnte gezeigt werden, daß sich RPMI- und Test-Medium in Bezug auf die Nitritakkumulation von RIN-Zellen nicht signifikant unterscheiden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß der hohe Glukosegehalt von 11 mM des RPMI-Mediums die zytokininduzierte NO-Produktion von RIN-Zellen beeinflusst.

---

### **3.6 Einfluß von Hitzeschock auf die NO-Produktion von RIN-Zellen**

Um die Zusammenhänge zwischen der Expression von Hitzeschockproteinen und der NO-Produktion zu untersuchen, wurden  $0,5 \times 10^6$  RIN-Zellen pro Vertiefung in einer Flachbodenmikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät, einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend mit IL-1 $\beta$  behandelt. Die Länge des Hitzeschocks betrug dabei 30, 60 und 90 min, die Dauer zwischen Ende des Hitzeschocks und Beginn der Behandlung mit IL-1 $\beta$  betrug 1 h oder 24 h. Für die Zeit des Hitzeschocks wurden die Zellen einer Temperatur von 43° C ausgesetzt; die Dauer der IL-1 $\beta$ -Behandlung betrug 24 h. Anschließend wurde der Überstand der Zellen auf Nitrit untersucht und die Zellzahl der Proben bestimmt. Weiterhin wurde zu Kontrollzwecken eine Probe bei 37°C inkubiert und nicht mit IL-1 $\beta$  stimuliert, eine Probe bei 37°C inkubiert aber mit IL-1 $\beta$  stimuliert und eine dritte Kontrolle direkt nach dem Hitzeschock, jedoch ohne IL-1 $\beta$ -Stimulation untersucht. Abb. 8 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Messungen.



**Abb. 8:** Einfluß eines Hitzeschocks von 30 (A), 60 (B) und 90 (C) min auf die induzierte NO-Produktion von RIN-Zellen. Dargestellt ist die Nitritakkumulation nach einer Erholungszeit von einer oder 24 h und einer Behandlung mit IL-1 $\beta$  (50 U/ml) für 24 h. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei Ansätzen + SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,02$  und \*\*\*  $p < 0,002$  bezogen auf die Kontrolle mit IL-1 $\beta$ -Behandlung.

---

Es konnte gezeigt werden, daß die NO-Produktion von RIN-Zellen nach einem Hitzeschock, einer nur kurzen Erholungszeit von einer Stunde und anschließender Behandlung mit IL-1 $\beta$  niedriger ist, als die NO-Produktion von RIN-Zellen die zur Kontrolle keinem Hitzeschock ausgesetzt wurden, jedoch auch mit IL-1 $\beta$  behandelt wurden (17,4  $\mu$ M). Diese beobachtete Reduktion der IL-1 $\beta$  induzierten Nitritakkumulation war um so stärker, je länger der Hitzeschock andauerte. Während sich nach 30 minütigen Hitzeschock noch ein Nitratwert von 16,5  $\mu$ M zeigte, reduzierte sich die Konzentration nach einem 60 minütigen Hitzeschock verglichen mit der entsprechenden Kontrolle signifikant: auf 13,6  $\mu$ M ( $p < 0,02$ ) und nach einem 90 minütigen Hitzeschock auf 9,0  $\mu$ M ( $p < 0,002$ ).

Im Gegensatz hierzu stieg die Nitritproduktion bei einer Erholungszeit von 24 h ebenfalls mit der Dauer des Hitzeschocks und verzeichnete bei einer Hitzeschockdauer von 90 min den höchsten Anstieg (23,8  $\mu$ M), diese war gegenüber der Kontrolle signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei einer 30 minütigen Hitzeschockbehandlung ergab sich einen Nitritkonzentration von 20,6  $\mu$ M und nach 60 minütigem Hitzeschock eine Konzentration von 20,9  $\mu$ M (nicht signifikant).

Die Bestimmung der Zellzahl zeigte, daß sich trotz einer 24 stündigen Erholungszeit die Zellzahl nicht signifikant erhöht hatte.

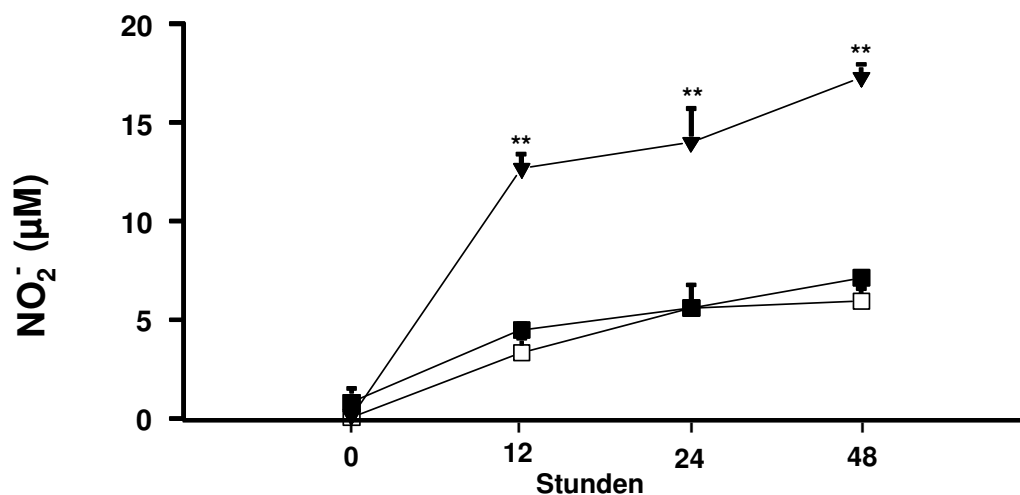


### 3.7 Erhöhung der NO-Produktion durch Transfektion von RIN-Zellen mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor

Um zu prüfen, ob HSP 70 an der erhöhten NO-Produktion in den zuvor dargestellten Untersuchungen beteiligt ist, wurde der Einfluß einer HSP 70-Überexpression auf die NO-Produktion der Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen Zytokinen behandelt und anschließend der Zellüberstand auf Nitrit untersucht.

In den Experimenten wurden R70/3-, die eine erhöhte HSP 70-Expression aufweisen, RIN- und RK/1-Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Die Zellzahl betrug  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml; die Petrischalen wurden mit 10 ml RPMI 1640 Medium gefüllt.

Da RIN-Zellen, wie bereits beschrieben, sehr empfindlich auf IL-1 $\beta$  reagieren, wurden die Zellen zunächst mit 4 U/ml IL-1 $\beta$  für 48 h inkubiert. Nach 12h, 24h und 48 h wurden jeweils dreimal 50  $\mu$ l des Zellüberstandes abgenommen und die Nitritkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.



**Abb 9:** NO-Produktion von RIN- (offene Quadrate); RK/1- (geschlossene Quadrate); und R70/3-Zellen (Dreiecke) nach Behandlung mit 4 U/ml IL-1 $\beta$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus jeweils drei Ansätzen. Die Bestimmung des Nitritgehaltes erfolgte mittels der Griess-Reaktion. \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu RK/1 und RIN.

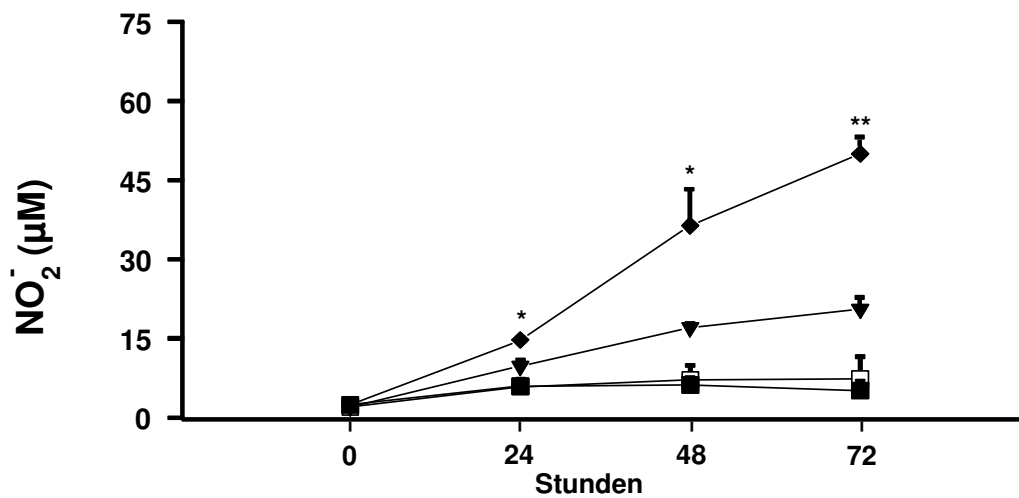
---

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die mit einem Kontrollvektor transfizierten RK/1-Zellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in der Nitritproduktion nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  von „Wildtyp“-RIN-Zellen signifikant unterscheiden.

Demgegenüber zeigten sich in den Überständen der, mit einem HSP 70-überexprimierendem Vektor transfizierten, R70/3-Zellen zu allen Meßzeitpunkten signifikant höhere Nitritkonzentrationen. So betrug die Nitritkonzentration nach 12 h im Überstand der RK/1-Zellen 4,4  $\mu$ M (RIN 3,3  $\mu$ M) und im Überstand der R70/3-Zellen 12,6  $\mu$ M. Auch im weiteren Zeitverlauf blieb die Nitritkonzentration im Überstand der R70/3-Zellen signifikant erhöht. Nach 48 h betrug der Meßwert bei RK/1-Zellen 7,1  $\mu$ M (RIN 5, 9  $\mu$ M), bei R70/3-Zellen jedoch 17,2  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Behandlung mit IL-1 $\beta$  zu einer erhöhten Rate von lysierten Zellen führt. Es stellte sich jedoch heraus, daß sich bei einer Behandlung mit 4 U/ml IL-1 $\beta$  die Lyserate gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe nicht signifikant erhöhte. Bei Anwendung der Trypanblau-Methode fanden sich in beiden Fällen Raten von drei bis fünf Prozent lysierter Zellen.

Um eine mögliche Dosisabhängigkeit des IL-1 $\beta$ -Effektes zu untersuchen wurde im Folgenden die Konzentration des auf die Zellen einwirkenden IL-1 $\beta$  auf 50 U/ml erhöht und Proben der Kulturüberstände zur Nitritbestimmung nach 24 h, 48 h und 72 h genommen. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10:** NO-Produktion von R70/3- (Raute) und RK/1-Zellen (Dreiecke) nach Behandlung mit 50 U/ml IL-1 $\beta$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei Messungen. Die Mediumkontrollen sind als Quadrate dargestellt (RK/1 geschlossene Quadrate, R 70/3 offene Quadrate). Die Bestimmung des Nitritgehaltes erfolgte mittels der Griess-Reaktion. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0001$  im Vergleich zu RK/1 + IL-1 $\beta$ .

Ohne Behandlung mit IL-1 $\beta$  zeigten sich zwischen beiden Zelllinien zu keinem Meßzeitpunkt signifikante Unterschiede in der Nitritkonzentration des Kulturüberstandes.

Nach Behandlung mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  zeigte sich bereits nach 24 h eine Erhöhung der Nitritkonzentration in den mit dem HSP 70 überexprimierenden Vektor transfizierten R70/3-Zellen (14,2  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrollzelllinie RK/1: 9,6  $\mu$ M). Im zeitlichen Verlauf erhöhte sich die Differenz in der Nitritkonzentration zwischen beiden Zelllinien weiter. Nach 72 h fand sich bei den R70/3-Zellen ein Mittelwert der Nitritkonzentration im Kulturüberstand von 49,9  $\mu$ M gegenüber einem Mittelwert von 20,4 bei den RK/1-Zellen ( $p < 0,0001$ ).

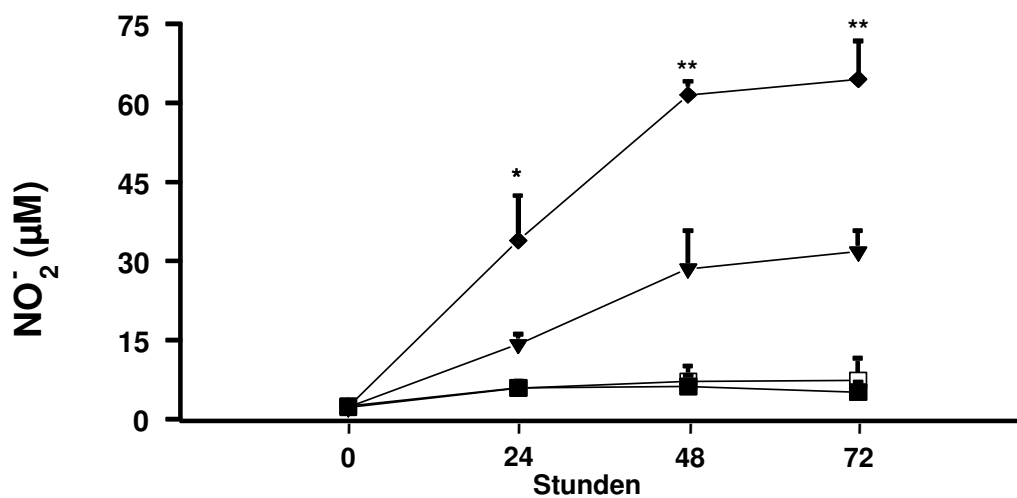
Um einen möglichen, schädigenden Einfluß der Inkubation mit IL-1 $\beta$  auf die Vitalität der Zellen zu testen, wurde eine Trypanblau Färbung durchgeführt und der Prozentsatz der toten Zellen bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab.1 dargestellt:

Inkubationsdauer	Trypanblau-positive Zellen (%)			
	24 h		48 h	
	Kontrolle	50U/ml IL-1 $\beta$	Kontrolle	50U/ml IL-1 $\beta$
RK/1-Zellen	8,2 $\pm$ 0,9	6,0 $\pm$ 1,3	7,3 $\pm$ 2,5	6,9 $\pm$ 0,6
R70/3-Zellen	6,1 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 2,0	8,7 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 1,7*

**Tabelle 1:** Anteil Trypanblau-positiver RK/1- und R70/3-Zellen nach 24 und 48 stündiger Behandlung mit 50 U/ml IL-1 $\beta$ . Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Ansätzen  $\pm$  SD.\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu unbehandelten R70/3-Zellen und zu mit IL-1 $\beta$  behandelten RK/1-Zellen nach 48 h.

Bei den RK/1-Zellen zeigten sich zu allen Meßzeitpunkten ähnliche Lyseraten, die sich nicht signifikant unterschieden. Bei R70/3-Zellen fand sich nach 24 stündiger Inkubation ohne oder mit IL-1 $\beta$  keine signifikant höhere Lyserate. Erst nach 48 stündiger Behandlung mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  stieg der Anteil Trypanblau-positiver Zellen auf 15,1% an und lag somit signifikant über der unbehandelten Kontrolle mit einem Anteil von 8,7% ( $p < 0,01$ ), und über den ebenfalls mit 50 U/ml IL-1 $\beta$  behandelten RK/1-Zellen (6,9%,  $p < 0,01$ ).

Um eine maximale Nitritfreisetzung zu erreichen wurden die Zellen im Folgenden mit einer Kombination aus drei Zytokinen behandelt. Dabei wurde eine Kombination von IL-1 $\beta$  (50 U/ml), IFN- $\gamma$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (2.500 U/ml) gewählt, da sich hiermit in Vorexperimenten die größte Nitritbildung erzielen ließ. RK/1- und R70/3-Zellen wurden in vier Flachbodenmikrotiterplatten in einer Konzentration von  $0,2 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung ausgesät, für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für weitere 72 h mit den oben genannten Zytokinen inkubiert. Der Kulturüberstand wurde vor Zytokinzugabe, sowie 24 h, 48 h und 72 h nach der Zytokinzugabe auf Nitrit untersucht und die Lyserate der Zellen bestimmt. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der Nitritkonzentrationsmessungen.



**Abb. 11:** NO-Produktion von R70/3- (Raute) und RK/1-Zellen (Dreiecke) nach Inkubation für 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ohne (Kontrolle) und mit einer Zytokinkombination von IL-1 $\beta$  (50 U/ml), IFN- $\gamma$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (2.500 U/ml). Die Mediumkontrollen sind als Quadrate dargestellt (RK/1 geschlossene Quadrate, R70/3 offene Quadrate). Die Abb. zeigt die Mittelwerte (+ SD) aus drei Ansätzen. Dargestellt ist die Nitritkonzentration gemessen nach der Griess-Methode.\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu RK/1 + Zytokine.

R70/3-Zellen zeigten nach 24 h eine 2,4-fach höhere NO-Produktion als RK/1-Zellen (RK/1: 14,1  $\mu\text{M}$ ; R70/3: 33,8  $\mu\text{M}$ ). Auch nach 48 h und 72 h war die NO-Produktion der R70/3-Zellen noch mehr als doppelt so hoch wie bei den RK/1-Zellen ( $p < 0,01$ ). Die Kontrollen ohne Zytokinbehandlung unterschieden sich bei keiner Messung signifikant.

Die Ergebnisse aus der parallel durchgeführten Auswertung nach dem Trypanblau-Verfahren sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Zelllinie	RK/1		R70/3	
	Kontrolle	Zytokine	Kontrolle	Zytokine
0 h	< 5	--	< 5	--
24 h	< 5	8,4 ± 1,2	< 5	8,3 ± 1,5
48 h	7,3 ± 2,5	53,3 ± 2,8*	8,7 ± 0,6	57,8 ± 5,3*
72 h	10,4 ± 2,3	55,6 ± 3,1*	8,1 ± 1,0	97,1 ± 1,0***

**Tab. 2:** Prozentualer Anteil der Trypanblau-positiven RK/1- und R70/3-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung mit einer Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$  (50 U/ml), IFN- $\gamma$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (2.500 U/ml). \* p<0,0001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; \*\* p<0,0001 im Vergleich zu mit Zytokinkombination behandelten RK/1-Zellen.

Es zeigte sich ein beschleunigter Anstieg des Anteils Trypanblau-positiver Zellen nach Zytokinbehandlung bei R70/3-Zellen gegenüber RK/1-Zellen. Dieser Unterschied deutete sich erstmals nach 48 h an und war nach 72 h signifikant. Zu diesem Zeitpunkt waren fast alle R70/3-Zellen lysiert.

Parallel zu den in Tab. 2 dargestellten Messungen wurde auch die absolute Zahl der Trypanblau-negativen Zellen bestimmt. Diese ist ein Maß für die Zahl der nicht geschädigten Zellen. Hierzu wurden in der Trypanblau-Färbung die Zahl der nicht Trypanblau-gefärbten Zellen in einem repräsentativen Teil der Wachstumsfläche je Vertiefung ausgezählt und auf die gesamte Wachstumsfläche hochgerechnet. Da in diesen Versuchen eine homogene Zelldichte auf der gesamten Wachstumsfläche vorzufinden war, konnte nach dieser Methode vorgegangen werden.

Die Entwicklung der Trypanblau-negativen Zellzahl ist in Tab. 3 dargestellt:

Behandlungsdauer	Zelllinie	
	RK/1	R70/3
0 h	9.000	9.000
24 h	12.298 ± 545	15.732 ± 898**
48 h	4.447 ± 276	3.732 ± 227 *
72 h	2.746 ± 258	600 ± 172 ***

**Tabelle 3:** Anzahl der Trypanblau-negativen RK/1- und R70/3-Zellen nach 0, 24, 48 und 72 stündiger Behandlung mit IL-1 $\beta$  (50 U/ml), IFN- $\gamma$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (2.500 U/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei Ansätzen. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , jeweils im Vergleich zu RK/1-Zellen.

Es zeigte sich bei beiden Zelllinien bis zu den 48 h Meßwerten eine ähnliche Entwicklung der Anzahl der nicht-geschädigten, Trypanblau-negativen Zellen, wobei nach 24 h bereits signifikant weniger RK/1-Zellen nachzuweisen waren. Nach einem anfänglichen Anstieg der Zellzahlen von 9.000 auf 12.300 (RK/1) bzw. 15.700 (R70/3) nach 24 h konnte nach 48 h ein Abfall bei beiden Zelllinien auf etwa 4.000 festgestellt werden.

Nach 72 h waren mehr als 3,5 mal so viele RK/1-Zellen Trypanblau-negativ wie R70/3-Zellen ( $p < 0,001$ ), wobei aber die absolute Zahl der nicht-geschädigten Zellen bei beiden Zelllinien sank.

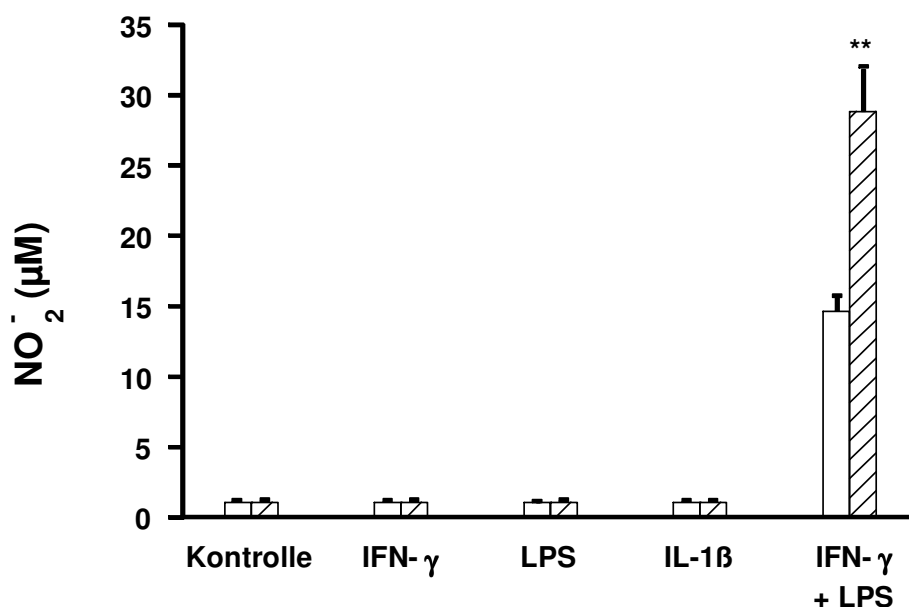
Um auszuschließen, daß RK/1-Zellen und R70/3-Zellen eine unterschiedliche Zellvermehrung unter Kontrollbedingungen aufweisen, wurde auch die Wachstumsgeschwindigkeit im o. g. Experiment mitbestimmt. Hier ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (siehe 2.2.5).

### 3.8 Erhöhung der NO-Produktion durch Transfektion von WEHI-Zellen mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor

Um zu zeigen, daß eine Erhöhung der NO-Produktion durch Transfektion mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor nicht nur auf RIN-Zellen beschränkt ist, sondern auch bei anderen Zelltypen möglich ist, wurden Versuche mit WEHI-Zellen durchgeführt, einer Mäusefibrosarkomzelllinie aus BALB/c Mäusen.

Um zu prüfen, auf welche Zytokine WEHI-Zellen mit einer NO-Freisetzung reagieren, wurden die Zellen zunächst mit IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , LPS sowie einer Kombination von IFN- $\gamma$  und LPS behandelt. Die Konzentrationen betragen für IFN- $\gamma$  100 U/ml, für LPS 100 ng/ml und für IL-1 $\beta$  100 U/ml.

Für die Experimente wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen der mit einem Kontrollvektor transfizierten Linie Wn 10x und HSP 70 überexprimierende Wn 113-5-Zellen pro Vertiefung in Flachbodenmikrotiterplatten ausgesät, für 24 h bei 37° C inkubiert und anschließend mit den oben genannten Zytokinen für weitere 24 h behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.



**Abb. 12:** Nitritkonzentrationen im Kulturüberstand von Wn 10x- (offene Balken) und Wn 113-5-Zellen (schraffierte Balken) nach 24-stündiger Behandlung mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und LPS (100 ng/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte + SD aus drei Ansätzen. \*\*,  $p < 0,005$  im Vergleich zu Wn-10x + IFN- $\gamma$  + LPS.



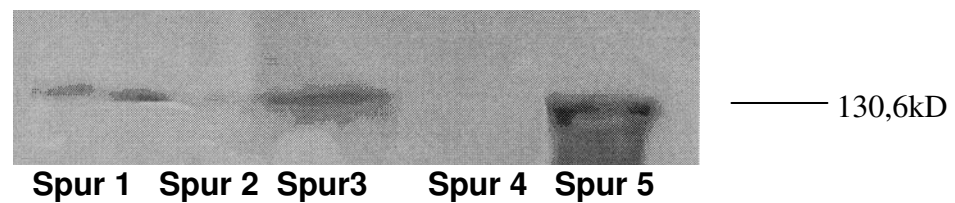
Es zeigte sich, daß die Induktion einer NO-Freisetzung weder durch alleinige Behandlung mit IFN- $\gamma$  noch durch LPS mit den angegebenen Konzentrationen möglich war. Auch IL-1 $\beta$  konnte alleine keine NO-Freisetzung bewirken. Die Kombination von IFN- $\gamma$  und LPS führte zu einer deutlichen NO-Freisetzung, die bei den mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor transfizierten Wn 113-5-Zellen fast doppelt so hoch (28,8  $\mu$ M) war wie bei den mit einem Kontrollvektor transfizierten Wn 10x-Zellen (14,6  $\mu$ M).

Parallel zur Bestimmung der Nitritkonzentrationen im Zellüberstand wurde auch eine Trypanblau-Färbung durchgeführt, um die Lyserate zu bestimmen. Hier fanden sich jedoch gegenüber nicht mit Zytokinen behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede. Die Lyseraten lagen bei allen Gruppen unter 5 Prozent.

### **3.9 Expression von iNOS-Protein in Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen**

Um zu zeigen, daß die Erhöhung der Nitritfreisetzung auf eine verstärkte Proteinexpression der induzierbaren NO-Synthase zurückzuführen ist, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$  Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen/ml in RPMI 1640 Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie für weitere 24 h mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS inkubiert. Nachdem Zellysate hergestellt worden waren, wurden Western-Blot-Analysen auf das iNOS-Protein durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

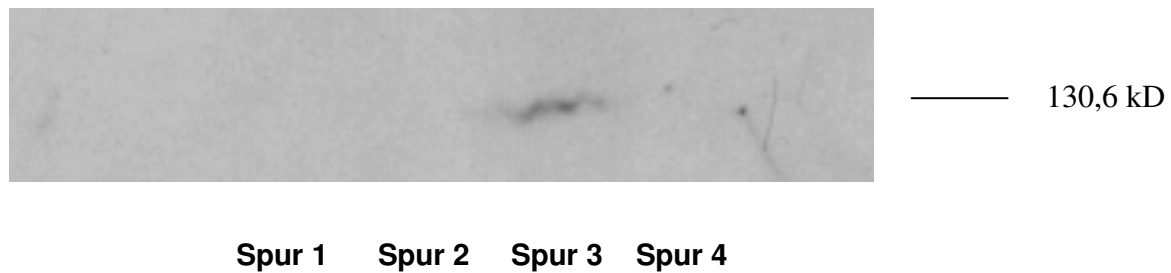


**Abb. 13:** Expression von iNOS in mit inflammatorischen Mediatoren behandelten WN-10x- und WN113-5-Zellen. Darstellung des Chemilumineszenz-empfindlichen Films nach Western-Blot-Analyse. Die Zellysate wurden wie folgt aufgetragen: Spur 1: Wn 10x nach Behandlung mit der u.g. Kombination, Spur 2: Wn 10x unbehandelt, Spur 3: Wn 113-5 nach Behandlung mit der u.g. Kombination, Spur 4: Wn 113-5 unbehandelt. Spur 5: Molekulargewichtsmarker. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS für 24 h.

Durch die Western-Blot Analysen konnten sowohl bei Wn 10x-, als auch bei Wn 113-5-Zellen iNOS-Proteine nachgewiesen werden. Die Stärke der Banden von zytokinbehandelten Zellen weist darauf hin, daß bei Wn 113-5-Zellen wesentlich mehr iNOS-Protein gebildet wurde als bei Wn 10x-Zellen. Bei unbehandelten Wn 10x-, und Wn 113-5-Zellen ließ sich kein iNOS-Protein nachweisen.

### 3.10 Expression von iNOS-Protein in RK/1- und R70/3-Zellen

Um nachzuweisen, daß auch in RK/1- und R70/3-Zellen iNOS für die Nitritfreisetzung nach Stimulation mit den oben genannten Zytokinen verantwortlich ist, wurden auch mit diesen Zellen Western-Blot Analysen durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, daß die mit einem HSP70 exprimierenden Vektor transfizierten R70/3-Zellen gegenüber den mit einem Kontrollvektor transfizierten RK/1-Zellen ebenfalls eine größere iNOS-Proteinmenge bilden. Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$  RK/1- und R70/3-Zellen/ml in 10 ml RPMI 1640 Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zytokinkombination aus 10 U/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  und 2.500 U/ml TNF- $\alpha$  für weitere 24 h inkubiert. Danach wurden Zellysate hergestellt und Western-Blot Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14:** Expression von iNOS-Protein in zytokinbehandelten RK/1- und R70/3-Zellen. Darstellung des Chemilumineszenz-empfindlichen Films nach Western-Blot Analyse. Die Zellysate wurden wie folgt aufgetragen: Spur 1: R70/3 unbehandelt, Spur 2: RK/1 unbehandelt, Spur 3: R70/3 nach 24 stündiger Behandlung mit u.g. Zytokinkombination, Spur 4: RK/1 nach 24 stündiger Behandlung mit u.g. Zytokinkombination. Die Zytokinkombination beinhaltete 10 U/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  und 2.500 U/ml TNF- $\alpha$ .

Mit Hilfe der Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß R70/3-Zellen auf eine Behandlung mit den oben genannten Zytokinen mit einer Bildung von iNOS-Protein reagieren. Bei RK/1-Zellen ließ sich eine Expression von iNOS-Protein mit dieser Methode nicht nachweisen.

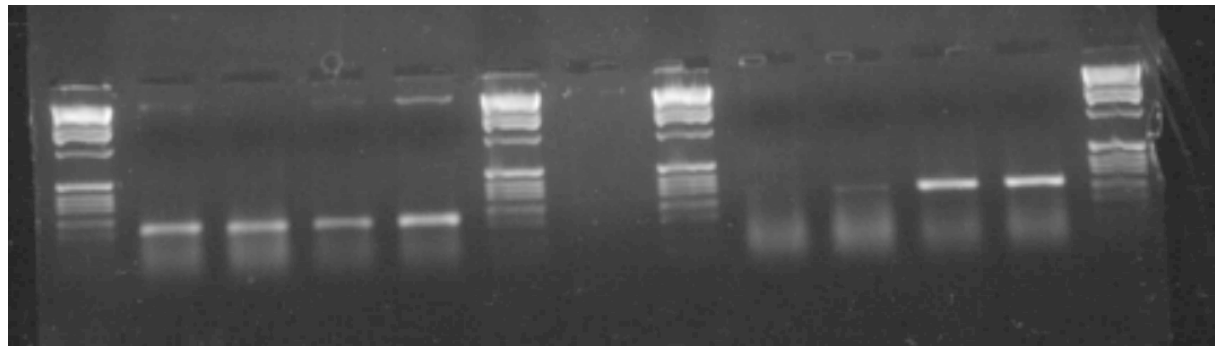
### 3.11 Expression von iNOS-mRNA in RIN- und WEHI-Zellen

Um zu untersuchen, warum RIN und WEHI-Zellen, die mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor transfiziert wurden, mehr iNOS-Protein bilden als die mit einem Kontrollvektor transfizierten Zellen, wurde die iNOS mRNA-Expression in diesen Zellen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht.

#### 3.11.1 Expression von iNOS mRNA in RK/1- und R70/3-Zellen

Zum Nachweis von iNOS mRNA wurden  $0,5 \times 10^6$  RK/1- und R70/3-Zellen/ml in 10 ml RPMI 1640 Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 U/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  und 2.500 U/ml TNF- $\alpha$  für weitere 6 Stunden inkubiert. Im Anschluß hieran wurde die RNA isoliert. Danach wurde eine reverse Transkription mit direkt anschließender Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse nach der DNA-Gelelektrophorese. Dargestellt ist ein repräsentatives

Experiment. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle 3 dargestellt.



**β-Actin** **iNOS**

Spuren: 1 2 3 4 1 2 3 4

**Abb. 15:** Expression von iNOS-mRNA in zytokinbehandelten RK/1- und R70/3-Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis der DNA-Gelelektrophorese. Die Zellysate wurden wie folgt aufgetragen: Spur 1: RK/1 unbehandelt; Spur 2: R70/3 unbehandelt; Spur 3: RK/1 nach 6 stündiger Behandlung mit u.g. Zytokinkombination; Spur 4: R70/3 nach 6 stündiger Behandlung mit u.g. Zytokinkombination. Die Zytokinkombination beinhaltete 10 U/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  und 2.500 U/ml TNF- $\alpha$ .

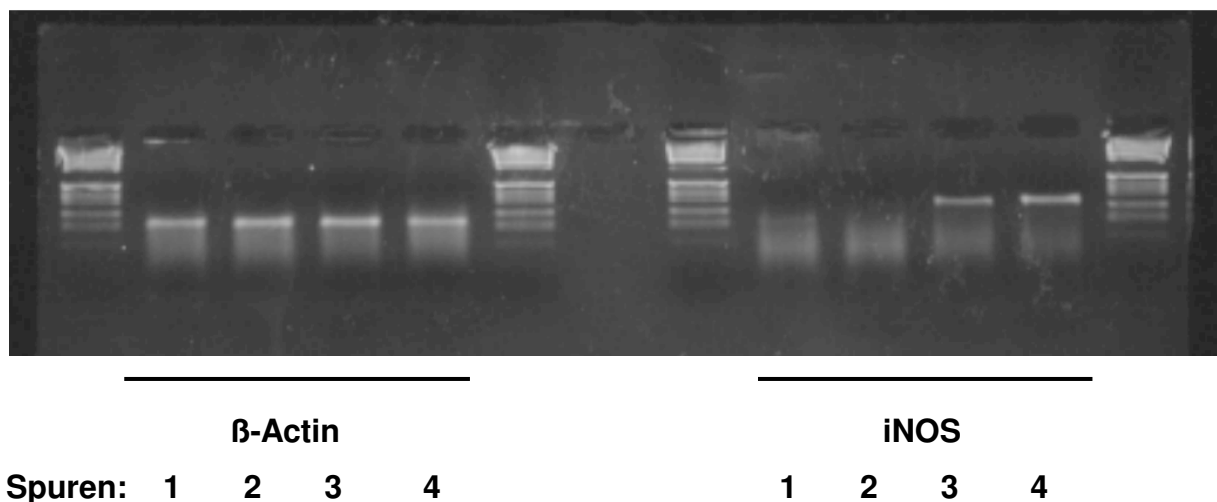
	RIN-Zelllinie	
Behandlung	RK/1	R70/3
unbehandelt	4,5	3,0
Zytokine	5,6	5,6

**Tabelle 3:** Quantitative Darstellung der Ergebnisse der iNOS-mRNA Analysen. Angegeben sind die Verhältnisse der Werte des iNOS-Signals gegen die Werte des  $\beta$ -Actin-Signals als PSL (Phosphor stimulated luminescence) in cpm (counts per minute). Die Behandlung wurde mit 10 U/ml IL-1 $\beta$ , 50 U/ml IFN- $\gamma$  und 2.500 U/ml TNF- $\alpha$  für 6 h durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Stimulation mit den oben genannten Zytokinen sowohl bei RK/1-, als auch bei R70/3-Zellen zu einem Anstieg der iNOS-mRNA-Menge führte. Die mit einem HSP 70 exprimierenden Vektor transfizierten R70/3-Zellen zeigten dabei, bezogen auf die nicht stimulierten Kontrollen einen Anstieg der iNOS-mRNA um den Faktor 1,9, wohingegen die mit einem Kontrollvektor transfizierten RK/1-Zellen lediglich eine 1,25-fache Erhöhung zeigten.

### 3.11.2 Nachweis von iNOS mRNA-Expression in Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen

Um nachzuweisen, daß es bei einer Zytokinbehandlung von Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen zu einer Erhöhung der iNOS mRNA kommt, wurden beide Zelllinien in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml RPMI-Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie für 6 h mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS behandelt. Im Anschluß wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription mit direkt anschließender Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Abb. 16 zeigt die Photographie nach der DNA-Gelelektrophorese. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tab. 4 dargestellt.



**Abb. 16:** Expression von iNOS-mRNA in mit inflammatorischen Mediatoren behandelten Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis der DNA-Gelelektrophorese. Die Zellysate wurden wie folgt aufgetragen: Spur 1: Wn 10x unbehandelt; Spur 2: Wn 113-5 unbehandelt; Spur 3: Wn 10x nach 6 stündiger Behandlung mit u.g. Kombination stimulierender Mediatoren; Spur 4: Wn113-5 nach 6 stündiger Behandlung mit u.g. Kombination stimulierender Mediatoren. Die Kombination stimulierender Mediatoren beinhaltete 100 U/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS für 6 h.

Behandlung	WEHI-Zell-Linie	
	Wn 10x	Wn 113-5
unbehandelt	0,3	0,5
Zytokine	13,5	19,4

**Tabelle 4:** Quantitative Darstellung der Ergebnisse der iNOS-mRNA Analysen. Angegeben sind die Verhältnisse der Werte des iNOS-Signals gegen die Werte des  $\beta$ -Actin-Signals als PSL (Phosphor stimulated luminescence) in cpm (counts per minute). Die Behandlung wurde mit 100 u/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS für 6 h durchgeführt.

Auch Wn 10x- und Wn 113-5-Zellen reagieren nach Stimulation mit einer deutlichen Induktion der iNOS-mRNA. Bei den mit einem HSP70 exprimierenden Vektor transfizierten Wn 113-5-Zellen zeigte sich ein gleicher Anstieg wie bei den mit einem Kontrollvektor transfizierten Wn 10x-Zellen. In den Absolutwerten ergab sich bei Wn 113-5-Zellen ein etwa 1,5 mal höherer Wert als bei Wn 10x-Zellen.

---

## **4. Diskussion**

### **4.1 Einleitung**

Für die Erforschung der Pathogenese des Typ 1 Diabetes steht eine Reihe von Modellsystemen zur Verfügung, durch die man Rückschlüsse auf die Genese der Erkrankung beim Menschen ziehen kann. In diesen Modellen zeigt sich, daß es in einer frühen Phase der Erkrankung zu einer Infiltration der Inselzellen durch Immunzellen kommt. Bei den inselinfiltierenden Zellen handelt es sich initial vor allem um Makrophagen. Neben verschiedenen anderen Mediatoren gilt das durch die iNOS produzierte NO als das bedeutendste von Makrophagen freigesetzte betazelltoxische Agens. Durch Inhibitoren der NO-Synthese läßt sich in Tiermodellen des humanen Typ 1 Diabetes der Krankheitsbeginn verzögern und das Ausmaß der Insulitis reduzieren.

Bereits seit Anfang der achtziger Jahre ist die zellprotektive Wirkung von HSP gegenüber thermischen Reizen bekannt. Später zeigte sich, daß HSP und insbesondere HSP 70, aber auch vor inflammatorischen Mediatoren, wie reaktive Radikale und Zytokinen schützen. Ihre protektive Wirkung entfalten HSP vor allem, in dem sie die Zellen vor einer Akkumulation von nicht korrekt gefalteten Proteinen schützen.

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen von HSP 70 mit der iNOS untersucht, über die bisher nur wenig bekannt waren. HSP 70 wird, wie anderen HSP bei immunmedierten Erkrankungen, wie dem Typ 1 Diabetes, eine Rolle in der Krankheitsgenese zugeschrieben (Kawagushi et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß es durch eine erhöhte HSP 70 Expression zu einer vermehrten iNOS mRNA- und Protein Synthese kommt und hieraus eine vermehrte NO-Produktion resultiert.

## **4.2 Schützende Effekte von Hitzeschock sowie Hitzeschockprotein 70 vor Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid bei RINm5F-Zellen**

Die protektive Wirkung eines subletalen Hitzeschocks auf Zellen ist bereits seit 1982 bekannt (Li und Werb, 1982, Landry et al., 1982). Hauptverantwortlich für diesen Effekt, der auch gegenüber ROI, NO und Streptozotizin nachweisbar ist, ist HSP 70. Durch stabile Transfektion eines HSP 70-Gens in eine Ratteninsulinomzelllinie (RINm5F) konnten diese Effekte auch in Betazellen bestätigt werden (Bellmann et al., 1996).

Die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten zunächst die bekannten Ergebnisse bestätigen und das experimentelle System etablieren. Es konnte gezeigt werden, daß bei RIN-Zellen ein 60 minütiger Hitzeschock ausreicht um eine signifikant höhere Resistenz gegenüber durch Nitroprussid produziertes NO und durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase synthetisierte ROI zu erzielen. Der Verlauf der Kinetik zeigt, daß dieser Effekt bereits nach einer nur vierstündigen Erholungsphase nach der Hitzeschockbehandlung auftritt. Mittels Western-Blot Analysen konnte wie erwartet gezeigt werden, daß hierbei eine Induktion der HSP 70 Expression stattfindet. Um nachzuweisen, daß der beobachtete protektive Effekt auf HSP 70 zurückzuführen ist, wurden HSP 70 überexprimierende R70/3-Zellen in ihrer Vulnerabilität gegenüber ROI und NO mit der Kontrollzelllinie RK/1 verglichen. RK/1-Zellen beinhalten bis auf das humane HSP 70 Gen einen identischen Vektor wie R70/3-Zellen und eignen sich somit als Kontrollzelllinie mit normaler HSP 70 Expression. Auch bei diesem Vergleich zeigte sich eine entsprechend erhöhte Resistenz der HSP 70 überexprimierenden Zellen, ähnlich wie bei RIN-Zellen nach einem Hitzeschock. Es ergaben sich somit mit den Ergebnissen von Bellmann et al. (1996) vergleichbare Resultate.

In Inselzellen läßt sich durch IL-1 $\beta$  eine Expression von iNOS induzieren (Welsh (a) und Sandler, 1992), wenngleich sich eine maximale iNOS-Aktivierung erst durch die Kombination von IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  erzielen läßt (Corbett und McDaniel, 1993). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen mit RIN-Zellen ergaben sich ähnliche Befunde, wobei sich allerdings durch die zusätzliche Behandlung mit TNF- $\alpha$  zur Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  keine weitere Erhöhung der NO-Freisetzung erzielen ließ.



### **4.3 Einfluß von Hitzeschock und HSP70 auf die iNOS-Expression, NO-Produktion und Lyserate von RIN-Zellen**

Durch einen Hitzeschock kommt es zunächst in Abhängigkeit von der Intensität zu einer fortschreitenden Denaturierung von Proteinen und in der Folge zu weiteren Zellschäden. Diese Veränderungen stellen einen Auslöser für die Produktion von Hitzeschockproteinen dar, mit deren Hilfe es wieder zu einer Rückfaltung geschädigter Proteine und einer Stabilisierung noch nicht geschädigter Protein kommt. Man vermutet, daß diese initialen Schäden dazu führen, daß Zellen, wie beispielsweise Lungen-, Leber-, glatte Muskel- oder Gliazellen, die unmittelbar nach einem Hitzeschock mit Zytokinen behandelt wurden, eine erniedrigte NO-Produktion und iNOS-Expression gegenüber nicht hitzegeschockten Zellen aufweisen (De Vera et al., 1996; Feinstein et al., 1996; Wong et al., 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit ließen sich diese Befunde bestätigen. Die Reduktion der NO-Produktion zeigte dabei eine Abhängigkeit von der Dauer des Hitzeschocks und somit von der zu erwartenden Zellschädigung. So konnte nach einem 30 minütigen Hitzeschock bei 43°C noch kein Rückgang der NO-Produktion nach entsprechender Behandlung festgestellt werden, wohingegen sich nach einem Hitzeschock von 60 min Dauer bereits ein signifikanter Rückgang der NO-Freisetzung nachweisen ließ. Durch länger anhaltende Hitzeeinwirkung ließ sich dieser Effekt noch steigern. Der Mechanismus für die erniedrigte NO-Produktion nach einem Hitzeschock scheint sowohl bei menschlichen Betazellen, als auch bei Betazellen von Ratten, zumindest bei IL-1 $\beta$  induzierter NO-Produktion, in einer passageren Aktivierungshemmung des für die iNOS Expression notwendigen nukleären Transkriptionsfaktors  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) zu liegen (Scarim et al., 1998).

Dahingegen zeigten Zellen, die zum einen nach einem Hitzeschock eine ausreichende Erholungszeit hatten und bei denen die Hitzeschockdauer zum anderen ausreichte, um eine genügende Menge von Hitzeschockproteinen zu produzieren, nach Zytokinexposition eine signifikant erhöhte NO-Produktion. In diesen Zellen ließ sich HSP 70 mittels Western-blot Analyse bereits vier Stunden nach einem 60 minütigen Hitzeschock in signifikanten Mengen nachweisen.

Hauptverantwortlich für den Effekt der erhöhten NO-Produktion scheint HSP 70 zu sein. Dies konnte durch eine stabile Transfektion mit einem Vektor gezeigt werden,

---

der zu einer HSP 70 Überexpression sowohl bei RIN- als auch bei WEHi-Zellen führt. Bei beiden Zellarten fand sich nach entsprechender Zytokinexposition eine hochsignifikant erhöhte NO-Produktion. So zeigte sich bei HSP 70 überexprimierenden RIN-Zellen (R70/3) nach einer Zytokinbehandlung mit lediglich 4 U/ml bereits eine im Vergleich zur Kontrolllinie RK/1 um etwa den Faktor drei erhöhte NO-Produktion. Durch Erhöhung der Zytokinkonzentrationen und Kombination verschiedener Zytokine ließ sich im weiteren zwar die absolute Nitritkonzentration sowohl im Zellkulturüberstand von R70/3- als auch von RK/1- Zellen steigern, die Relationen zwischen den beiden Zelllinien blieben hiervon jedoch im wesentlichen unberührt.

Bekanntermaßen sind HSP unter anderem an der Proteinfaltung und am Proteintransport beteiligt, was zur Bezeichnung Chaperone geführt hat (Fink, 1999). Durch hohe intrazelluläre Proteinkonzentrationen kann es z.B. durch hydrophobe Wechselwirkungen zu unerwünschten Aggregationen kommen. Dies kann durch HSP verhindert werden, in dem diese an hydrophoben Teilen der Proteine binden (Morimoto et al., 1994).

Mittels Western-blot Analysen ließ sich in HSP 70 überexprimierenden Zellen nach Zytokinbehandlung eine Steigerung der Gesamt-iNOS-Proteinmenge nachweisen, so daß offenbar die Erhöhung der NO-Konzentration bei HSP 70 überexprimierenden Zellen auf eine erhöhte Konzentration von iNOS-Protein und nicht beispielsweise auf eine Stabilisierung oder Aktivierung von konstitutiv exprimierten NO-Synthasen zurückzuführen ist. Der Mechanismus, über den HSP 70 zu einer erhöhten iNOS-Proteinmenge führt ist offenbar nicht allein in seiner Chaperonfunktion begründet. D.h. es kommt nicht nur zu einer iNOS-Proteinstabilisierung oder vermehrten Rückfaltung von nicht korrekt gefaltetem iNOS-Protein. Vielmehr zeigten sich in mittels RT-PCR durchgeführten Analysen sowohl bei R70/3-, als auch bei Wn 113-5-Zellen relativ bzw. absolut erhöhte mRNA-Mengen. Somit liegt die Vermutung nahe, daß HSP 70 zu einer erhöhten Transkription des iNOS-Gens führt und sich somit im Weiteren eine erhöhte iNOS-Expression und schließlich eine vermehrte NO-Produktion nachweisen läßt.

Eine Assoziation zwischen HSP 70 und iNOS-Expression zeigt sich in der Tat auch im Tiermodell. So weisen Ratten mit einer erhöhten HSP 70-Expression auch eine erhöhte iNOS Expression auf, wengleich hier ein kausaler Zusammenhang noch nicht bewiesen werden konnte (Johannesen et al., 2001).

---

Befunde aus Modellsystemen humaner Erkrankungen weisen auf eine wichtige Rolle von NO als Mediator sowohl in Entzündungsprozessen als auch bei Autoimmunerkrankungen (McCartney-Francis et al., 1993), im besonderen beim Typ 1 Diabetes hin (Kröncke et al., 1991). In hohen Konzentrationen wirkt NO zytotoxisch. Es gilt als das von aktivierten Makrophagen für die Betazellschädigung hauptsächlich verantwortliche Agens (Hibbs et al., 1988) und ist in der Lage den Untergang von humanen Inselzellen zu bewirken (Eizirik et al., 1996). In niedrigen Konzentrationen wirkt NO immunmodulierend. Einerseits wirkt es supprimierend auf Zytokine, die mit Th1-Reaktionen assoziiert sind, wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , andererseits fördert es die Produktion von Th2 assoziierten Zytokinen wie IL-4 (Kolb und Kolb-Bachofen, 1998).

In den hier durchgeführten Untersuchungen fiel auf, daß es sowohl bei HSP 70 überexprimierenden RIN-, als auch bei WEHI-Zellen unter 48-stündiger und längerer Einwirkung von inflammatorischen Zytokinen zu einer erhöhten Lyserate gegenüber den entsprechenden Kontrollzellen kam. Es war jedoch zu erwarten, daß sich hier erniedrigte Lyseraten einstellen, da eine HSP 70 Überexpression vor exogenen Einflüssen, wie beispielsweise ROI oder NO, schützt. Gleichzeitig gemessene NO-Konzentrationen zeigten jedoch im Medium der HSP 70 überexprimierenden Zellen mehr als doppelt so hohe Konzentrationen wie im Medium der entsprechenden Kontrollzellen. Dieser Effekt war um so stärker ausgeprägt, je höher die Konzentrationen der auf die Zellen einwirkenden Zytokine war. Bei Behandlung von R70/3- bzw. RK/1-Zellen mit 4 U/ml IL-1 $\beta$  kam es zu keinen signifikanten Unterschieden in der Lyserate, obwohl sich auch hier bei den HSP 70 überexprimierender R70/3-Zellen, gegenüber der Kontrollzelllinie, eine prozentual ähnliche Erhöhung der NO-Produktion wie bei höheren Zytokinkonzentrationen nachweisen ließ. Es ist daher anzunehmen, daß es durch HSP 70 über eine erhöhte iNOS-Expression zu einer vermehrten NO-Produktion kam, die für die Zellen, trotz des durch HSP 70 erhöhten Schutzes, letal waren. Da Hitzeschockproteine u.a. die Aufgabe haben, Zellen vor schädigenden exogenen Einflüssen zu schützen, ist anzunehmen, daß die hier gefundenen, von den Zellen selbst produzierten und für sie zum Teil letalen, NO-Konzentrationen unphysiologisch hoch sind und sich lediglich in vitro durch langwirksame, hochkonzentrierte Zytokinzugaben erreichen lassen. Unter kürzerer einwirkenden bzw. niedriger konzentrierter Zytokingabe

---

zeigten sich schließlich keine erhöhten Lyseraten. Der physiologische Sinn der HSP 70 vermittelten iNOS-Aktivierung könnte somit in der oben bereits skizzierten Immunmodulation liegen. Dies betont die Wichtigkeit der Funktion von Hitzeschockproteinen, die über eine Immunmodulation eine bedeutende Rolle in Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen spielen könnten. Daß es über HSP 70 zu einer iNOS-Aktivierung kommen kann, wurde mittlerweile auch in anderen Arbeiten gezeigt. So zeigte sich, daß Makrophagen und dendritische Zellen, die mit HSP 70 oder einem weiteren HSP, gp 96, stimuliert wurden ebenfalls eine erhöhte, iNOS-vermittelte, NO-Produktion aufweisen (Panjwani et al., 2002). Diese Interaktion scheint aber nicht für alle Zelllinien zu gelten. So zeigte sich bei Rattenfibroblasten, die stabil humanes HSP 70 produzieren eine niedrigere iNOS-Expression als bei nicht HSP 70 exprimierenden Zellen. Hier konnte dieser Effekt auf eine verminderte NFkB-Aktivierung zurückgeführt werden (Feinstein et al., 1996).

Neuere Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, daß es in Inselzellen nicht nur über HSP 70 zu einer iNOS-Aktivitätserhöhung kommt, sondern daß auch eine, durch IL-1 $\beta$  gesteigerte iNOS-Aktivität zu einer Erhöhung der HSP 70 Produktion führt. Daß dieser Effekt nicht unmittelbar durch IL-1 $\beta$  verursacht ist, konnte dadurch belegt werden, daß nach Inhibition der enzymatischen Aktivität der iNOS dieser Effekt nicht mehr nachweisbar war (Hao et al., 1999).

#### 4.4 Die Erhöhung der iNOS Genexpression ist MAP-Kinase vermittelt

Die Kinase p38 gehört zusammen mit der jun N-terminal kinase (JNK) und der extracellular signal-regulated kinase (ERK) zu der Familie der mitogen activated protein (MAP)-Kinasen, die eine Rolle in der zellulären Antwort auf die meisten externen Stimuli spielen. Die stärkste Aktivierung von p38 läßt sich durch physikalischen Streß oder durch inflammatorische Zytokine erzielen (Widmann et al., 1999). Bekannt ist, daß p38 durch einer Reihe von anti-inflammatorischen Stoffen inhibiert werden kann, die in Monozyten einer Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  entgegenwirken (Lee et al., 1994; Han et al., 1994). So führt auch die pharmakologische oder molekulare Inhibition von p38 zu einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Fibroblasten und Makrophagen und zu einer erniedrigten Syntheserate von IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen (Lee et al., 1994; Beyaert et al., 1996; Rincon et al., 1998; Lu et al., 1999; Wysk et al., 1999). Es stellt sich somit die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit gefundene Erhöhung der iNOS-Expression auf eine Modulation von MAP-Kinaseaktivitäten zurückzuführen ist.

In weiterführenden Arbeiten konnte bestätigt werden, daß es in RIN- und WEHI-Zellen durch HSP 70 zu einer vermehrten iNOS-Expression kommt. Dabei stellte sich heraus, daß HSP 70 tatsächlich zu einer Aktivierung der Streß-abhängigen Proteinkinase p38 führt und es so in weiteren Schritten schließlich zu einer vermehrten iNOS Transkription kommt. Bei zusätzlicher Gabe eines p38 Inhibitors zeigte sich, nach entsprechender Stimulation, kein iNOS mRNA Anstieg mehr. Der Effekt von HSP 70 auf p38 war jedoch abhängig davon, auf welche Art p38 aktiviert wurde. Bei Behandlung mit inflammatorischen Mediatoren, die auch in der vorliegenden Arbeit verwandt wurden, zeigte sich die oben genannte erhöhte iNOS mRNA Synthese, bei Aktivierung durch physikalische Reize blieb sie jedoch aus. Der hierfür verantwortliche Mechanismus blieb jedoch leider unklar. HSP 70 scheint jedoch nicht direkt mit p38, sondern eher in einer übergeordneten Ebene der Signaltransduktion zu interagieren (Bellmann et al., 2000).

Der Einfluß von p38 auf die iNOS Expression wurde bereits in mehreren Arbeiten untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch sehr unterschiedlich und zeigten eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien. Eine eindeutige Interpretation

der Befunde wird zusätzlich erschwert durch die Komplexität der iNOS-Regulationsmechanismen und die Vielzahl der Einflüsse von p38 auf weitere Signaltransduktionswege (Bellmann et al., 2000).

Dennoch zeigen die bisher vorliegenden Ergebnisse, daß Hitzeschockproteine neben ihrer bekannten Chaperonfunktion und Wirkung als Immunogene, auf die noch später eingegangen wird, in der Lage sind, die Signalkaskaden nach Streßaktivierung zu beeinflussen.

#### **4.5 Rolle von HSP in Entzündungsprozessen und bei Autoimmunreaktionen**

Aufgrund der Rolle von HSP als molekulare Chaperone wird verständlich, daß sich die Expression von HSP bei bestimmten pathologischen Zuständen wie Fieber, Hypoxie, Infektionen oder Gewebstraumata verändert, wobei eine Entzündungsreaktion in der Regel die gemeinsame Komponente dieser Zustände darstellt. Man geht davon aus, daß auch Arachidonsäurederivate, die an der Auslösung von Entzündungsprozessen beteiligt sind, über eine Aktivierung von Hitzeschutzfaktoren (HSF) zu einer vermehrten HSP-Synthese führen (Jurivich et al., 1994). Mittlerweile sind vier HSF bekannt (HSF 1-4), wobei HSF 1 und 2 ubiquitär exprimiert werden (Nakai und Morimoto, 1993). HSF 1 und 2 unterscheiden sich zum einen durch die Kinetik ihrer Expression, so daß es zu einer adaptierten Antwort durch Streßproteine je nach Art, Dauer und Stärke des Stresses kommen kann; zum anderen hat HSF 1 für HSP 70 eine im Vergleich zu HSF 2 etwa zehnfach höhere Potenz in Bezug auf die Stimulation der Transkriptionsrate (Yoshima et al., 1998 (a) u. (b)). Nach Aktivierung bilden die HSF Trimere, akkumulieren in der Nähe des Nukleus und werden phosphoryliert, wobei die Einzelheiten dieser Vorgänge noch nicht letztlich geklärt sind. Anschließend erfolgt die Bindung an sogenannte Hitzeschockelemente, die die Hitzeschockgenexpression regulieren (Baler et al., 1993; Zuo et al., 1994).

Neben den oben beschriebenen Funktionen von HSP bei Entzündungsreaktionen wird ihnen aber auch eine Rolle als Immunogen zugeschrieben. So stellen von den HSP vor allem HSP 60 und HSP 70 Ziele für T-Zellen und Antikörper bei Infektionen

dar (Morimoto et al., 1994). Insbesondere HSP 60 spielt anscheinend aber auch eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen, bei denen sich Antikörper gegen HSP finden, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder dem Typ 1 Diabetes (Gause et al., 1992). So gilt HSP 60 als wichtiges Autoantigen bei chronischen Entzündungen und Atherosklerose (Kaufmann, 1990; Nomoto und Yoshikai, 1991; Res et al., 1991; Feige und Cohen, 1991). Es wird in Stresssituationen vermehrt gebildet und zum Teil auch auf der Zelloberfläche exprimiert. Es gibt somit dem nicht-adaptiven Immunsystem ein Warnsignal. Humane Makrophagen, die mit HSP 60 in Kontakt kommen, reagieren mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-12 (Chen et al., 1999). Mittlerweile wurde auch der, auf den Makrophagen befindliche, hierfür verantwortliche Rezeptor identifiziert. Es zeigte sich, daß dieser unabhängig von den, für die Bindung weiterer Hitzeschockproteine verantwortlichen Rezeptoren ist, wodurch HSP 60 eine unabhängige Rolle in der Immunregulation zugeschrieben wird (Habich et al., 2002).

#### **4.6 Klinische Relevanz von HSP**

Aufgrund der zunehmenden Kenntnisse zur Rolle von HSP bei pathologischen Zuständen versucht man mittlerweile auch, sich HSP bei therapeutischen Ansätzen zu Nutze zu machen. Durch die Chaperonfunktion der HSP bilden sie Komplexe mit einer Vielzahl von intrazellulären Peptiden und Proteinen, so daß diese HSP-Peptid-Komplexe einen Fingerabdruck dieser Zellen darstellen. So beinhalten auch HSP-Peptid-Komplexe, die aus Tumoren oder beispielsweise virusbelasteten Zellen isoliert werden zum einen Peptide, die von physiologischen Proteinen abstammen, zum anderen aber auch Peptide, die von pathogenen Proteinen abstammen. Durch Immunisierung von Säugetieren mit HSP-Peptid-Komplexen erzielt man eine starke CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Antwort gegen die von den HSP dargestellten fremden oder entfremdeten Peptiden, wohingegen normale, körpereigene Peptide keine Immunantwort hervorrufen. Eine besondere Bedeutung scheint hierbei das HSP gp96 zu haben. Es bindet an die CD 91 Struktur, einen HSP-Rezeptor, der sich auf antigenpräsentierenden Zellen befindet. Hierdurch gelangen Peptide, die aufgrund der Chaperonwirkung an HSP gebunden sind, in Makrophagen und dendritische

---

Zellen. Durch Präsentation in Kontext mit MHC-Klasse 1 und 2 Molekülen erfolgt die Stimulierung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen. Zur gleichen Zeit erfolgt auch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch die antigenpräsentierenden Zellen.

Durch diese Chaperonfähigkeit der HSP in Bezug auf antigene Peptide ergeben sich neue therapeutische Möglichkeiten zur Prophylaxe und Bekämpfung sowohl maligner, als auch infektiöser Erkrankungen (Srivastava, 2002).

Inzwischen versucht man die protektiven Effekte von HSP 70 auch klinisch anzuwenden. Bimoclolmol (N-[2-hydroxy-3-(1-piperidinyl) propoxy]-3 pyridine-carboximidoyl-chloride), ein oral verfügbares Medikament, ist in der Lage selektiv die Transkription, Translation und Expression von HSP 70 in Zellen, in denen eine Stressantwort vonstatten geht, zu erhöhen und diese Zellen somit vor einem Zelluntergang zu bewahren (Nanasi und Jednakovits, 2001). Klinisch befindet sich dieses Medikament zur Zeit in Phase II Studien, bisherige Anwendungen im Rahmen zur Prävention von diabetischen Folgeerkrankungen sowie in der Therapie des Myokardinfarktes erscheinen jedoch vielversprechend (Lubbers et al., 2002).



## 5. Zusammenfassung

Der Pathogenese des humanen Typ 1 Diabetes liegt eine chronisch fortschreitende Immunreaktion zugrunde, die zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas führt. In Tiermodellen der Erkrankung konnte gezeigt werden, dass inselinfiltrierende Makrophagen und das von ihnen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle bei der Betazellschädigung spielen. Ein deutlicher Schutz vor der schädigenden Wirkung von NO und anderen inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Sauerstoffradikalen (ROI) kann durch das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) vermittelt werden. Mögliche wechselseitige Beeinflussung von HSP70 und NO sind bisher nur unvollständig charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Interaktionen zwischen der HSP 70 Expression und der NO-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) untersucht werden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen einer Ratteninsulinomlinie nach einem Hitzeschock eine vermehrte Resistenz vor einer Schädigung durch exogenes NO und durch ROI zeigen. Ein vergleichbarer Grad der Protektion konnte durch Transfektion dieser Zellen mit einem HSP70 exprimierenden Vektor erzielt werden. Eine nach Hitzeschockbehandlung oder Transfektion erhöhte HSP70 Expression war mit einer vermehrten NO Produktion assoziiert, die, wie Western-Blot Analysen belegten, durch eine erhöhte iNOS-Proteinmenge zustande kommt. Mittels RT-PCR konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass zur höheren iNOS-Proteinmenge vermutlich eine gesteigerte iNOS Genexpression beiträgt. Die zusätzliche Verwendung einer Mäusefibrosarkomzelllinie zeigte, dass dieser Zusammenhang zwischen HSP70- und iNOS-Expression nicht nur auf Insulinomzellen begrenzt ist, sondern offenbar ein allgemeines Regulationsprinzip in Zellen darstellt.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigt sich ein neuer, wichtiger Aspekt der HSP 70 Wirkung. HSP 70 greift regulierend in die iNOS-Expression ein, die einen zentralen Mediator der Betazellschädigung im Verlauf der Inselentzündung darstellt. HSP70 wirkt somit nicht nur direkt zellprotektiv sondern kann offenbar durch Beeinflussung der NO-Freisetzung auch zur Modulation einer inflammatorischen Reaktion beitragen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

**Baler, R.,** G. Dahl, R. Voellmy. 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2486 – 2496.

**Bellmann, K.,** M. Jaatella, D. Wissing, V. Burkhart, H. Kolb. 1996. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391 (1-2): 185 – 188.

**Bellmann, K.,** L. Hui, J. Radons, V. Burkhart, H. Kolb. 1997. Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 46: 232 – 236.

**Bellmann, K.,** V. Burkart, J. Bruckhoff, H. Kolb, J. Landry. 2000. P38-dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 275: 18172 – 18179.

**Beyaert, R.,** A. Cuenda, W. van den Berghe, S. Plaisance, J.C. Lee, G. Haegeman, P. Cohen, W. Fiers. 1996. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 15: 1914-1923.

**Bond, U.,** M.J. Schlesinger. 1986. Posttranslation associations of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in non-secreting hybridomas. *J. Cell. Biol.* 102: 1558 – 1566.

**Boorstein, W.R.,** T. Ziegelhoffer, E.A. Craig. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 38: 1 – 17.

---

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

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

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

**Burkart, V (b),** H. Liu , K. Bellmann , D. Wissing, M. Jaattela, M.G. Cavallo , P. Pozzilli, K. Briviba, H. Kolb. 2000. Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 26: 19521 – 19528.

**Byrne, B.C.,** J.J. Li, J. Sninsky, B.J. Poiesz. 1988. Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 4165 – 4170.

**Calabrese, V.,** A. Copani, D. Testa, A. Ravagna, F. Spadaro, E. Tendi, V.G. Nicoletti, A.M. Giuffrida Stella. 2000. Nitric oxide synthase induction in astroglia cell cultures: effects on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J. Neurosci. Res.* 60(5): 613 – 622.

**Chelly, J.,** J.C. Kaplan, S. Gautron, A. Kahn. 1988. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333: 858 – 860.

**Chen, W.,** U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart V, H. Kolb. 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol.* 162: 3212-3219.

**Chick, W.,** S. Warren, R.N. Chute, A.A. Like, V. Lauris, K.C. Kitchen. 1977. A transplantable insulinoma in rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 628 – 632.

---

**Colle, E.** 1990. Genetic susceptibility to the development of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in rat. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57: 1-9.

**Corbett, J.A., M.L. McDaniel.** 1992. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$ -cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes.* 41:897 – 903.

**Corbett, J.A., M.A. Sweetland, J.L. Wang, J.R. Lancaster Jr., M.L. McDaniel.** 1993. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1731 – 1735.

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

**De Vera M.E., Y.M. Kim, H.R. Wong, Q. Wang, T.R. Billiar, D.A. Geller.** 1996. Heat shock response inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 24: 1238 – 1245.

**Eizirik, D.L., C.A. Delaney, M.H. Green, J.M. Cunningham, J.R. Thorpe, D.G. Pipeleers, C. Hellerstrom, I.C. Green.** 1996. Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 118: 71 – 83.

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

**Feige, U., I.R. Cohen.** 1991. The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. Springer. *Semin. Immunopathol.* 13: 99 – 113.

**Feinberg, A.P., B. Vogelstein.** 1982. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6 – 13.

---

**Feinstein, D.L.**, E. Galea, D.A: Aquino, G.C. Li, H. Xu, D.J. Reis. 1996. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J. Biol. Chem.* 271:17724 – 17732.

**Fink, A.L.** 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79: 425 – 449.

**Freydman, J.**, E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, F.U. Hartl. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370: 111 – 117.

**Furchgott, R.F.**, J.V. Zawadski. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373 – 376.

**Gause, A.**, U. Sahin, M. Pfreundschuh. 1992. Neue Perspektiven in der Immuntherapie: Adhäsionsmoleküle, Superantigene, Hitzeschockproteine und Zytokinantagonisten. *Dtsch. Med. Wschr.* 117: 1764 – 1773.

**Gerling, I.**, A.E. Karlsen, H.D. Chapman, H.U. Andersen, E. Boel, J.M. Cunningham, J. Nerup, E.H. Leiter. 1994. The inducible nitric oxide gene, NOS 2, maps to mouse chromosome 11. *Mammal genome* 5: 318 – 320.

**Granger, D.L.**, R.R. Taintor, J.L.Cook, J.B. Hibbs. 1980. Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *J. Clin. Invest.* 65: 357 – 370.

**Habich, C.**, K. Baumgart, H. Kolb, V. Burkart. 2002. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J. Immunol.* 168: 569 - 576.

**Hao, W.**, A.P. Myhre, J.P. Palmer. 1999. Nitric oxide mediates IL-1beta stimulation of heat shock protein but not IL-1beta inhibition of glutamic acid decarboxylase. *Autoimmunity* 1999. 29: 93 - 101.

---

**Han, J.**, J.D. Lee, L. Bibbs, R.J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811.

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

**Heitmeier, M.R.**, A.L. Scarim, J.A. Corbett. 1997. Interferon-gamma increases the sensitivity of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 272: 13697 – 13704.

**Herold, G.** 2000. Innere Medizin. Gerd Herold (Hrsg.), Köln.

**Hibbs Jr., J.B.**, R.R. Taintor, Z. Vavrin, E.M. Rachlin. 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:87 – 94.

**Jäättelä, M.**, D. Wissing, P.A. Bauer, G.C. Li. 1992. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 11: 3507 – 3512.

**Jäättelä, M.**, D. Wissing. 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Annu. Med.* 24: 249 – 258.

**Jacquier-Sarlin, M.R.**, K. Fuller, A.T. Dinh-Xuan, M.-J. Richard B.S. Polla. 1994. Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia.* 50: 1031 – 1038.

**Johannesen, J.**, F. Pociot, A.E. Karlsen, T. Mandrup-Poulsen, J. Nerup. 2001. Strain-dependent differences in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in rat pancreatic islets correlates with interferon regulating factor 1 (IRF-1) and heat shock protein 70 (HSP70) expression. *Eur. Cytokine Netw.* 12: 501 – 509.

---

**Jurivich D.A.**, L. Sistonen, K.D.Sarge, R.I. Morimoto. 1994. Arachidonate is a potent modulator of human heat shock gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*91: 2280 – 2284.

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

**Kaufmann, S.H.E.** 1990. Heat shock protein and the immun response. *Immunol. Today*: 11: 129.

**Kawaguchi, Y.**, H. Ikegami, M. Fukuda, Y. Fujioka, K. Shima, T. Ogihara. 1993. Polymorphism of HSP 70 gene is not associated with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japan. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2-3: 103 – 107.

**Kawasaki, E.S.** 1991. Amplification of RNA. In: Innis et al. (Hrsg.): PCR Protocols, a guide to methods and applications. Academic press, Inc. 21 – 27.

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

**Klöppel, G.**, A. Clemens. 1996. Insulinabhängiger Diabetes mellitus. Aktuelle Aspekte zur Morphologie, Ätiologie und Pathogenese. *Pathologe.* 17: 269 – 275.

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

**Kolb, H.** (b), U. Kiesel, K.-D. Kröncke, V. Kolb-Bachofen. 1991. Supression of low dose streptozotocin-induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor. *Life Sci.* 25: PL-213.

---

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

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

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

**Kolb, H., V. Kolb-Bachofen.** 1998. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol. Today*. 19: 556 – 561.

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

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

**Lampeter, E.F., M. Homberg, K. Quabeck, U.W. Schäfer, P. Wernet, J. Bertrams, H. Grosse Wilde, F.A. Griess, H. Kolb.** 1993. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 341: 1243 – 1244.

**Landry, J., D. Bernier, P. Chretien, L.M: Nicole, R.M. Tanguay, N. Marceau.** 1982. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.* 42: 2457 – 2461.

**Lee, K.-U., K. Amano, J.-W- Yoon.** 1988. Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37:989 – 991.



---

**Lee, J.C.**, J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746.

**Li, G.C.**, Z. Werb. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3218 – 3222.

**Li, G.C.**, L. Li, Y.-K. Liu, J.Y. Mak, L. Chen, W.M.F. Lee. 1991. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1681 – 1685.

**Li, G.C.**, L. Li, R.Y. Liu M. Rehmman, W.M.F. Lee. 1992. Protection from thermal stress by human hsp 70 with or without ist ATP-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 2036 – 2040.

**Lindsay, R.M.**, W. Smith, S.P. Rossiter, M.A. McIntyre, B.C. Williams, J.D. Baird. 1995. N omega-nitro-L-arginine methyl ester reduces the incidence of IDDM in BB/E rats. *Diabetes.* 44: 365 - 368.

**Liu, D.**, D. Pavlovic, M.C. Chen, M. Flodstrom, S. Sandler, D.L. Eizirik. 2000. Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS *-/-*). *Diabetes.* 49(7): 1116 – 1122.

**Lowenstein, C.J.**, J.L. Dinerman, S.H. Snyder. 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annu. Intern. Med.* 120: 227 – 237.

**Lu, H.T.**, D.D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R.J. Davis, R.A. Flavell. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 18:1845-1857.

---

**Lubbers, N.L.**, J.S. Polakowski, C.D. Wegner, S.E. Burke, G.J. Diaz, K.M. Daniell, B.F. Cox. 2002. Oral bimeclomol elevates heat shock protein 70 and reduces myocardial infarct size in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1: 79 – 83.

**Lukic, M.L.**, S. Stosic-Grujicic, N. Ostojic, W.L. Chan, F.Y. Liew. 1991. Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 913 - 920.

**McCartney-Francis N.**, J.B. Allen, D.E. Mizel, J.E. Albina, Q.W. Xie, C.F. Nathan, S.M. Wahl. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749 – 754.

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

**Marletta, M.A.**, P.S. Yoon, R. Iyengar, C.D. Leaf, J.S. Wishnok. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706 – 8711.

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

Von **Meyenburg, H.** 1940. Über Insulitis bei Diabetes. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 21: 554.

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

**Milarski, K.L.** und R. I. Morimoto. 1989. Mutational analysis of the human hsp70 protein: Distinct domains for nuclear localization and adenosine triphosphate binding. *J. Cell. Biol.* 109: 1947-1962.

---

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

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

**Morimoto, R.I.,** A. Tissieres, C. Geogopoulos. 1994. The biology of heat shock roteins and molecular chaperons. Cold spring harbor laboratory. Cold spring harbor, NY.

**Nakai, A.,** R. I. Morimoto. 1993. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* 13:1983-1997.

**Nanasi, P.P.,** A. Jednakovits. 2001. Multilateral in vivo and in vitro protective effects of the novel heat shock protein coinducer, bimoclomol: results of preclinical studies. *Cardiovasc. Drug. Rev.* 2: 133 – 151.

**Nerup, J.,** T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig. 1986. Effector mechanism in type 1 diabetes mellitus. *Annu. Inst. Pasteur.* 137 D: 463 – 468.

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

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

**Nomoto, K.,** Yoshikai Y. 1991. Heat-shock proteins and immunopathology: regulatory role of heat-shock protein-specific T cells. Springer Semin. Immunopathol. 13: 63 - 80.

---

**Palmer, J.P.**, C.M. Asplin, P. Clemons, K. Lyen, O. Tatpati, P.K. Raghu, T.L. Paquette. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222: 1337 – 1339.

**Palmer, R.M.J.**, A.G. Ferrige, S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524 – 526.

**Palmer, R.M.J.**, D.S. Ashton, S. Moncada. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664 – 666.

**Panjwani N.N.** , L. Popova, P.K. Srivastava. 2002. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* 168: 2997 - 3003.

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

**Pociot, F.**, K.S. Ronningen , J. Nerup. 1993. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand. J. Immunol.* 5: 491 – 495.

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

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

- 
- Radons, J.**, B. Heller, A. Bürkle, B. Hartmann, M.-L. Rodriguez, K.-D. Kröncke, V. Burkart, H. Kolb. 1994. Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose)polymerase activation and concomitant NAD<sup>+</sup> depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 1270 – 1277.
- Res, P.**, J. Thole, R. de Vries. 1991. Heat-shock proteins and autoimmunity in humans. *Springer Semin. Immunopathol.* 13: 81 – 98.
- Richter, C.**, V. Gogvadze, R. Schlapbach, M. Schweizer, J. Schlegel. 1994. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1143 – 1150.
- Rincon, M.**, H. Enslin, J. Raingeaud, M. Recht, T. Zapton, M.S. Su, L.A. Penix, R.J. Davis, R.A. Flavell. 1998. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.* 17: 2817-2829.
- Ritossa, F.M.** 1962. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571 – 573.
- Rossini, A.A.**, D.L. Greiner, H.P. Friedmann, J.P. Mordes. 1993. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diab. Rev.* 1: 43 – 75.
- Rothe, H.**, K. Fehsel, H. Kolb. 1990. Tumor necrosis factor alpha production is upregulated in diabetes prone BB rat. *Diabetologia.* 33:573 – 575.
- Sambrook, J.**, E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbour university press, New York.
- Saiki, R.K.**, S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Ehrlich, N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin. *Science* 230: 1350 – 1354.

---

**Scarim, A.L.**, M.R. Heitmeier, J.A. Corbett. 1998. Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology* 139: 5050 – 5057.

**Seissler, J.**, J.J. de Sonnaville, N.G. Morgenthaler, H. Steinbrenner, D. Glawe, U.Y. Khoo-Morgenthaler, M.S. Lan, A.L. Notkins, R.J. Heine, W.A. Scherbaum. 1998. Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct antibody patterns in patients with acute onset and slow progressive disease. *Diabetologia* 8: 891 – 897.

**Sibley, R.K.**, D. Sutherland, F.C. Goetz, A.F. Michael. 1985. Recurrent diabetes mellitus in the pancreatic iso- and allograft period. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab. Invest.* 53: 132 – 144.

**Srivastava, P.** 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol.* 2: 185 – 194.

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

**Stiefelhagen, P.** 1998. Präventionsstrategien in der Diabetologie. *Der Internist* 11: 1192 – 1195.

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

**Tissieres, A.**, H.K. Mitchell, U.M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389 – 398.

---

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

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

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

**Welch, W.J.(b).** 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063 – 1081.

**Welsh, N.,** B. Margulis, L.A. Borg, H.J. Wiklund, J. Saldeen, M. Flodstrom, M.A. Mello, A. Andersson, D.G. Pipeleers, C. Hellerstrom, et al. 1995. Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: Implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol. Med.* 7: 806 – 820.

**White, C.R.,** U.V. Darley, W.R. Berrington, M. McAdams, J.Z. Gore, J.A. Thompson, D.A. Parks, M.M. Tarpey, B.A. Freeman. 1996. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8745 – 8749.

**Whitehead, T.P.,** L.J. Kricka, T.J.N. Carter und G.H.G Thorpe. 1979. Analytical Luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25: 1531 – 1546.

**Widmann C.,** S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79: 143 - 180.

---

**Williams, R.S.**, J.A. Thomas, M. Fina, Z. German, I.J. Benjamin. 1993. Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J. Clin. Invest.* 92: 503 – 508.

**Wong, H.R.**, J.D. Funder, K. Wasserloos, B.R. Pitt. 1995. Expression of iNOS in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells is inhibited by the heat shock response. *Am. J. Physiol.* 269: 843 – 848.

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

**Wysk, M.**, D.D. Yang, H.T. Lu, R.A. Flavell, R.J. Davis. 1999. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 3763-3768.

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

**Xu, Q.**, SY. Hu, R. Kleindienst, G. Wick. 1997. Nitric oxide induces heat-shock 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J. Clin. Invest.* 100: 1089 – 1097.

**Yoshima, T. (a)**, T. Yura, H. Yanagi. 1998. Function of the C-terminal transactivation domain of human heat shock factor 2 is modulated by the adjacent negative regulatory segment. *Nucleic. Acids. Res.* 26: 2580 - 2585.

**Yoshima, T. (b)**, T. Yura, H. Yanagi. 1998. Heat shock factor 1 mediates hemin-induced hsp70 gene transcription in K562 erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 273: 25466 – 25471.

**Zielasek, J.**, R.A. Jackson, G.S. Eisenbarth. 1989. The potentially simple mathematics of type 1 diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52: 347 – 365.



---

**Zuo, J.**, R. Baler, G. Dahl, R. Voellmy. 1994. Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7447 - 7468.

---

## **7. Anhang**

### **7.1 Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. med. W.A. Scherbaum, Leiter der klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes, danke ich herzlich für die Möglichkeit der Promotion am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Kolb danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, der Bereitstellung der Arbeitsmittel sowie für die vielen interessanten und nützlichen Diskussionen im Rahmen meiner Arbeit am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut.

Für die Hilfen während der Versuche, die Einarbeitung in die verschiedenen experimentellen Techniken und vielen Anregungen möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. K. Bellmann bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. V. Burkart, der durch zahlreiche Diskussionen die Fertigstellung der Arbeit ermöglichte und mich mit außerordentlichem Engagement während der gesamten Zeit betreute.

Frau W. Fingberg danke ich für die Hilfen während der Experimente und insbesondere für die Unterstützung während der Arbeiten mit den Zellkulturen.

Meinen Eltern möchte ich für die unzähligen Hilfen während dieser Arbeit und des gesamten Studiums danken.

Besonderer Dank gilt meiner Frau für die pausenlose Motivation und Unterstützung.

---

## 7.2 Lebenslauf

Name:	Jörg Bruckhoff
Wohnort:	Westpreußenstr. 6 40822 Mettmann
Geburtstag und –ort:	27. Januar 1971 in Duisburg
Familienstand:	verheiratet
1977 – 1981	Grundschule am Lierberg in Mülheim an der Ruhr
1981 – 1990	Karl-Ziegler-Gymnasium in Mülheim an der Ruhr
05.1990	Abitur
1991 – 1992	Zivildienst
1992 – 1994	Vorklinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09.1994	Ärztliche Vorprüfung
1994 – 1998	Klinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09.1995	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04.1998	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1998 – 1999	Praktisches Jahr an den Kliniken St. Antonius Wuppertal, Wahlfach: Radiologie
05.1999	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1999 – 2001	Arzt im Praktikum in der internistischen Abteilung des Ev. Krankenhaus Mettmann
seit 2001	Assistenzarzt in der internistischen Abteilung des Ev. Krankenhaus Mettmann

---

### **7.3            Veröffentlichung**

Bellmann, K., V. Burkart, J. Bruckhoff, H. Kolb, J. Landry. 2000. P38-dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 275: 18172 – 18179.

---

## **Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Hitzeschockprotein 70 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase an einer Ratteninsulinomzelllinie**

**von: Jörg Bruckhoff**

Der Pathogenese des humanen Typ 1 Diabetes liegt eine chronisch fortschreitende Immunreaktion zugrunde, die zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas führt. In Tiermodellen der Erkrankung konnte gezeigt werden, dass inselinfiltrierende Makrophagen und das von ihnen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle bei der Betazellschädigung spielen. Ein deutlicher Schutz vor der schädigenden Wirkung von NO und anderen inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Sauerstoffradikalen (ROI) kann durch das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) vermittelt werden. Mögliche wechselseitige Beeinflussung von HSP70 und NO sind bisher nur unvollständig charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Interaktionen zwischen der HSP 70 Expression und der NO-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) untersucht werden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen einer Ratteninsulinomlinie nach einem Hitzeschock eine vermehrte Resistenz vor einer Schädigung durch exogenes NO und durch ROI zeigen. Ein vergleichbarer Grad der Protektion konnte durch Transfektion dieser Zellen mit einem HSP70 exprimierenden Vektor erzielt werden. Eine nach Hitzeschockbehandlung oder Transfektion erhöhte HSP70 Expression war mit einer vermehrten NO Produktion assoziiert, die, wie Western-Blot Analysen belegten, durch eine erhöhte iNOS-Proteinmenge zustande kommt. Mittels RT-PCR konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass zur höheren iNOS-Proteinmenge vermutlich eine gesteigerte iNOS Genexpression beiträgt. Die zusätzliche Verwendung einer Mäusefibrosarkomzelllinie zeigte, dass dieser Zusammenhang zwischen HSP70- und iNOS-Expression nicht nur auf Insulinomzellen begrenzt ist, sondern offenbar ein allgemeines Regulationsprinzip in Zellen darstellt.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigt sich ein neuer, wichtiger Aspekt der HSP 70 Wirkung. HSP 70 greift regulierend in die iNOS-Expression ein, die einen zentralen Mediator der Betazellschädigung im Verlauf der Inselentzündung darstellt. HSP70 wirkt somit nicht nur direkt zellprotektiv sondern kann offenbar durch Beeinflussung der NO-Freisetzung auch zur Modulation einer inflammatorischen Reaktion beitragen.