

Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

Deutsche Diabetes-Klinik

Arbeitsgruppe Immun-Pathologie und Immun-Toxikologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Helga Gleichmann

**Die Generierung von Wasserstoffperoxid und die Reduktion der  
Glutathionperoxidase-Aktivität ist assoziiert mit Diabetes, induziert mit  
multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin in männlichen C57BL/6-Mäusen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadira T.E. Friesen

Düsseldorf 2004

<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. rer. nat. Gerd Fischer</b>
<b>Prodekan:</b>	<b>Prof. Dr. rer. nat. Peter Westhoff</b>
<b>1. Berichterstatter:</b>	<b>Prof. Dr. med. Helga Gleichmann</b>
<b>2. Berichterstatter:</b>	<b>Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich</b>
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>06.05.2004</b>

## **Danksagung**

Meinen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann aussprechen, die mich freundlich in ihren Arbeitskreis aufgenommen hat und mir ermöglichte, diese vorliegende Dissertation anzufertigen. Insbesondere möchte ich mich bei ihr für die zahlreichen gemeinsamen Diskussionen und Ausarbeitungen neuer Fragestellungen, aber auch für ihr grosses Interesse an dieser Arbeit, die ich mit großem Freiraum bearbeiten konnte, danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu übernehmen.

Für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann durchführen zu können, danke ich als Leiter der klinischen Abteilung Herrn Prof. Dr. med. Werner Scherbaum.

Meinen Kollegen gilt ein ganz herzliches Dankeschön für eine tolle Zusammenarbeit und ein gutes Arbeitsklima: Frau Patricia Schott-Ohly für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihr grosses Interesse, ihre Unterstützung und die vielen Diskussionen, die wir im Rahmen dieser Arbeit geführt haben. Frau Amanda Büchau und Herrn Abdelhakim Lgssiar, die durch ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. Helmut Sies und Herrn PD Lars-Oliver Klotz für die Zusammenarbeit im Sonderforschungsbereich 503 „Molekulare und zelluläre Mediatoren exogener Noxen“ und die Bereitstellung der Geräte danken, die es mir ermöglicht haben, meine Arbeit erfolgreich durchzuführen.

Herrn Dr. Holger Steinbrenner möchte ich für seine Anregung und seine Diskussionsbereitschaft danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dietrich Behne, Herrn Dr. Antonios Kyriakopoulos und der gesamten Arbeitsgruppe des Hahn-Meitner-Instituts in Berlin für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, den Anregungen und den Diskussionen.

Vor allem danke ich von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch ihre tatkräftige Unterstützung, ihr uneingeschränktes Vertrauen und ihr Interesse an meiner Arbeit gestärkt und mir den Halt gegeben haben, mein Ziel der Dissertation zu erreichen.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Typ-1-Diabetes mellitus .....	1
1.2 Streptozotocin (STZ) .....	1
1.2.1 Struktur und Vorkommen .....	1
1.2.2 Hoch-Dosis (HD)-STZ-Diabetes-Modell .....	2
1.2.3 Multiple-Niedrig-Dosis (MLD)-STZ-Modell .....	3
1.2.4 Mechanismen von STZ-induzierten Aktivitäten .....	3
1.3 Reaktive Sauerstoffe (ROS) .....	7
1.3.1 Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	7
1.3.2 Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) .....	8
1.3.3 Hydroxyradikal ( $\bullet OH$ ) .....	8
1.4 Reaktive Stickstoffe .....	9
1.4.1 Stickstoffmonoxid ( $NO\bullet$ ) .....	9
1.4.2 Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) .....	9
1.5 Vorkommen von ROS im Organismus.....	10
1.5.1 Funktionen und biologische Bedeutung. ....	10
1.6 Schutzmechanismen gegen ROS .....	14
1.6.1 Nicht-enzymatische Schutzsysteme .....	14
1.6.2 Enzymatische Schutzsysteme .....	15
1.6.2.1 Superoxiddismutase (SOD) .....	15
1.6.2.2 Katalase (CAT) .....	15
1.6.2.3 Glutathionperoxidase (GPX).....	16
1.7 Zink ( $Zn^{2+}$ ) .....	17
1.8 Selen (Se) .....	18
<b>2. Fragestellung</b> .....	21

	Seite
<b>3. Material und Methoden</b> .....	22
3.1 Versuchstiere .....	22
3.1.1 Mäuse .....	22
3.2 Material .....	22
3.2.1 Geräte .....	22
3.2.2 Verbrauchsmaterial .....	24
3.2.3 Reagenzien .....	25
3.2.4 Lösungen und Zellkulturmedien .....	27
3.3 Methoden .....	30
3.3.1 Behandlung der Mäuse .....	30
3.3.1.1 Behandlung mit MLD-STZ .....	30
3.3.1.2 Behandlung mit Se-angereicherterem, Se-defizientem oder regulärem Futter .....	30
3.3.1.3 Bestimmung der Blutglucosekonzentration .....	32
3.3.2 Isolierung pankreatischer Inseln .....	33
3.3.3 In-vitro-Behandlung pankreatischer Inseln mit STZ und Zn <sup>2+</sup> Sulphat (ZnSO <sub>4</sub> ) .....	34
3.3.4 Bestimmung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
3.3.5 In-vitro-β-Zellfunktionstest .....	35
3.3.6 Bestimmung von Insulin .....	36
3.3.7 Messung der enzymatischen Aktivität von GPX .....	38
3.3.8 Proteinbestimmung .....	39
3.3.9 Histologische Untersuchungen .....	39
3.3.10 Statistische Analysen .....	40
<b>4. Ergebnisse</b> .....	41
4.1 Ex-vivo-Befunde .....	41
4.1.1 MLD-STZ stimuliert die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung nur in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse .....	41
4.1.2 MLD-STZ reduziert die GPX-Aktivität in Inseln männlicher, stimuliert sie dagegen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse.....	42

	Seite
4.2 In-vitro-Befunde .....	43
4.2.1 STZ stimuliert die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse .....	43
4.2.2 STZ reduziert die GPX-Aktivität in isolierten Inseln männlicher, steigert sie dagegen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse.....	44
4.2.3 SOD verändert nicht die STZ-stimulierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse .....	45
4.2.4 Nach Inkubation von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse mit STZ ist im homogenisierten Cytosol keine gesteigerte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung nachweisbar .....	46
4.2.5 ZnSO <sub>4</sub> verändert nicht die STZ-stimulierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse .....	47
4.2.6 Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) und D-Glucose (D-G) regen keine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in isolierten pankreatischen Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse an .....	48
4.2.7 Alloxan (ALX) stimuliert dosisabhängig die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse .....	50
4.2.8 STZ stimuliert die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung in Inseln männlicher BALB/c-Mäuse .....	51
4.2.9 STZ regt in zellfreiem Kulturmedium keine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung an .....	52
4.2.10 MNU und nicht D-G stimuliert die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung im Kulturmedium .....	52
4.2.11 ALX stimuliert die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in zellfreiem Kulturmedium .....	54
4.2.12 Inkubation von Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oder STZ schädigt die β-Zellfunktion anhand der basalen und D-G-stimulierten Freisetzung von immun-reaktivem Insulin (IRI) .....	55

	Seite
4.3 In-vivo-Befunde mit Selen-modifizierten Diäten .....	62
4.3.1 Eine Se-Mangelernährung über 3 Generationen steigert die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen C57BL/6-Mäuse .....	62
4.3.2 Weder Se-angereichertes noch Se-defizientes Futter verändern das Körpergewicht MLD-STZ-behandelter männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse .....	64
4.3.3 Effekte von Se-angereichertem und Se-defizientem Futter auf die Infiltrationen mit mononukleären Zellen in Inseln von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen.....	66
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungen

5-T-G <sup>125</sup> J	5-Thio-D-Glucose radiomarkiertes Jod
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
aqua bidest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	„sniff-Mäusediät“
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Katalase
cGPX	cytosolische GPX
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	Counts pro Minute
Cu	Kupfer
d	Tag
Da	Dalton
D-G	D-Glucose
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FBS	Foetales Rinder Serum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 kg x m/s <sup>2</sup> )
GI-GPX	gastro-intestinale GPX
GLUT2	Glucosetransporter 2
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSH-R	Glutathionreduktase
GSSG	oxidiertes GSH
h	Stunde
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HD	Hoch-Dosis
HE	Hämatoxilin-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hv	Licht

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitrit oxide synthase
ip	intraperitoneal
IRI	immunreaktives Insulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRB	Krebs Ringer Bicarbonat HEPES
L	Liter
MLD	Multiple-Niedrig-Dosis
m	milli-( $10^{-3}$ )
m	Meter
Mg	Magnesium
min	Minute
Mn	Mangan
MNU	Methyl-N-Nitrosoharnstoff
mol	molar
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
N <sup>7</sup>	Stickstoffatom an Position 7
n	nano ( $10^{-9}$ )
NaCit	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	nukleärer Transkriptionsfaktor B
NO•	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidanionradikal
O <sup>6</sup>	Sauerstoffatom an Position 6
•OH	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
p	statistisches Signifikanzniveau
PARP	poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
pGPX	plasmatische GPX
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
PHGPX	Phospholipid GPX

RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Kulturmedium
s	Sekunde
Se	Selen
Se(+)	Selen-angereichertes Futter
Se(-)	Selen-defizientes Futter
SEM	Standard error of the mean
snGPX	Sperma Nuclei GPX
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
Tab	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
x	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

## 1. Einleitung

### 1.1 Typ-1-Diabetes mellitus

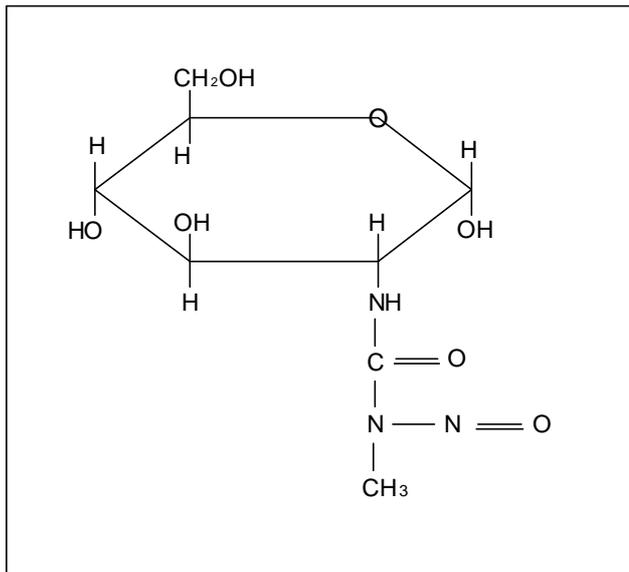
Der humane Typ-1-Diabetes ist eine multifaktorielle Autoimmunkrankheit, die sich meist in der Pubertät manifestiert und über mehrere pathogenetische Prozesse zur selektiven Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Inseln führt (Eisenbarth, 1986). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass auf dem Boden einer bestimmten genetischen Prädisposition exogene Faktoren, wie z.B. Viren und Toxine den Krankheitsprozess auslösen und Immunreaktionen stimulieren (Tisch und McDevitt, 1996; Luppi und Trucco, 2000). Es entwickelt sich eine Insulitis, d.h. Infiltration der Inseln mit mononuklearen Zellen (Bach, 1994) mit nachfolgender Zerstörung der  $\beta$ -Zellen, und schließlich eine Hyperglykämie als Folge eines Insulinmangels. An der Pathogenese des Diabetes mellitus sind freie Radikale als oxidativer Stress beteiligt (Wilson et al., 1988; Wolff, 1993; Verge et al., 1995).

Um den molekularen Mechanismus der  $\beta$ -Zellzerstörung näher untersuchen zu können, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt. Dazu zählen sowohl die BB (biobreeding)-Ratte und die NOD (non-obese diabetic)-Maus (Eisenbarth, 1986), welche spontan einen Typ-1-Diabetes entwickeln als auch Modelle mit einem induzierten Diabetes, wie z.B. mit Streptozotocin (STZ) und Alloxan (ALX). Diese Modelle sind unerlässlich, da Untersuchungen zur Pathogenese der  $\beta$ -Zellzerstörung bei Menschen ethisch nicht vertretbar sind.

### 1.2 Streptozotocin (STZ)

#### 1.2.1 Struktur und Vorkommen

STZ ist eine in der Natur vorkommende Substanz, die aus *Streptomyces achromogenes* isoliert wurde. Biologisch ist STZ ein Breitspektrum-Antibiotikum und hat Anti-Tumor-Aktivitäten. In Labortieren kann mit STZ ein Diabetes ausgelöst werden (Rerup, 1970). Chemisch hat STZ ein Molekulargewicht von 265 Da und besteht aus Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) gebunden an D-Glucose (D-G) (Abb.1).



**Abbildung 1:** Strukturformel von STZ ([2-Deoxy-2(3-Methyl-3-Nitrosourea)]-1-D-Glucopyranose)

Ursprünglich sollte STZ in der Krebstherapie eingesetzt werden, aber vorklinische Studien an Nagetieren zeigten das diabetogene Potential an (Bell et al., 1989). STZ besitzt die Fähigkeit, relativ selektiv die  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas zu zerstören. STZ wird durch seinen Glucoseanteil (Wilson und Leiter, 1990) über den Glucosetransporter 2 (GLUT2) von der  $\beta$ -Zelle aufgenommen (Schnedl et al., 1994; Wang und Gleichmann, 1998). Mit STZ kann in Mäusen über 2 unterschiedliche Protokolle ein Diabetes induziert werden, die jeweils einen unterschiedlichen pathogenen Mechanismus auslösen.

### 1.2.2 Hoch-Dosis (HD)-STZ-Diabetes-Modell

Im HD-STZ-Diabetes-Modell wird einmalig eine hohe Dosis STZ von 180-200 mg/kg Körpergewicht (KG) injiziert. In diesem Modell wirkt STZ direkt  $\beta$ -zelltoxisch und die Versuchstiere entwickeln innerhalb von 48-72 h eine ausgeprägte Nekrose der  $\beta$ -Zellen mit nachfolgender permanenter Hyperglykämie ohne Insulitis (Rossini et al., 1977).

### 1.2.3 Multiple-Niedrig-Dosis (MLD)-STZ-Modell

Der MLD-STZ-induzierte Diabetes wurde erstmals von Like und Rossini (1976) beschrieben und entwickelt sich nur in männlichen Mäusen empfänglicher Stämme. Hierbei werden durch intraperitoneale (ip) Injektionen an 5 aufeinander folgenden Tagen je 40 mg/kg KG STZ verabreicht. Dabei werden zunächst subtoxische Effekte auf die  $\beta$ -Zellen (Wang und Gleichmann, 1998) und anschließend T-zellabhängige, inflammatorische Immunreaktionen mit Insulinitis induziert (Klinkhammer et al., 1988; Wilson und Leiter, 1990; Elias et al., 1994). Die Immunreaktionen zeichnen sich durch STZ-spezifische, T-zellabhängige Reaktionen (Klinkhammer et al., 1988) und unspezifische inflammatorische Prozesse mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Mendola et al., 1989) und Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\bullet$ ) (Corbett et al., 1993; Halliwell, 1994) aus. Weiterhin wurde gezeigt, dass der MLD-STZ-Diabetes mit der Aktivierung T-Helferzell (Th)-1-typischer, proinflammatorischer und der Reduktion Th2-typischer anti-inflammatorischer Zytokine im Mikromilieu der pankreatischen Inseln assoziiert ist (Müller et al., 2002). Aufgrund des immunologisch-medierten Mechanismus, der durch ein exogenes Agens angeregt wird, ist das MLD-STZ-Modell mit der Pathogenese des menschlichen Typ-1-Diabetes vergleichbar, da - wie bereits erwähnt - auch hier exogene Faktoren als Zündung für T-zellabhängige, immunologische Reaktionen mit daraus resultierender  $\beta$ -Zellzerstörung generell angenommen werden (Verge et al., 1995).

### 1.2.4 Mechanismen von STZ-induzierten Aktivitäten

Um den Mechanismus der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch STZ aufzuklären, wurden chemische, biochemische, immunologische und molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen. Diese ergaben, dass STZ ein kurzlebiges Molekül ist, welches spontan in ein Methyldiazohydroxid und ein Isocyanat zerfällt, ohne vorher metabolisiert zu werden. Isocyanate können zelluläre und intramolekulare Komponenten carbamylieren. Das Methyldiazohydroxid hingegen zerfällt weiter in ein hochreaktives Carboniumion, welches Zellkomponenten wie die DNA oder auch Proteine zu alkylieren vermag. Die bevorzugten Positionen der Alkylierungsreaktion im DNA-Molekül sind die  $\text{N}^7$ - oder  $\text{O}^6$ -Positionen am Guanin. Diese DNA-Läsionen können nur durch Reparaturmechanismen beh-

ben werden. Es wird angenommen, dass eine Alkylierung von glykolytischen oder mitochondrialen Bestandteilen der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Synthese durch toxische Dosen von STZ Inselzellen zerstören kann (Wilson and Leiter, 1990). Weiterhin wurde gezeigt, dass STZ in vitro dosisabhängig und im HD-STZ-Modell ex vivo in Inseln die ROS-Bildung anregt und die DNA fragmentiert (Takasu et al., 1991). Die DNA-Fragmentierung ist in diesem System Folge ausschließlicher Toxizität. Im MLD-STZ-Modell hingegen werden die zwei oben genannten unterschiedlichen Effekte, nämlich toxische und immunologische, induziert. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Mechanismen der  $\beta$ -Zellzerstörung durch STZ dargestellt.

Die Voraussetzung der zwei unterschiedlichen MLD-STZ-Effekte für die Diabetes-Pathogenese wurde in verschiedenen Versuchsansätzen belegt. So wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Anti-Lymphocyten-Serum, welches inflammatorische Immunreaktionen hemmt, den Diabetes in CD-1-Mäusen verhindert (Rossini et al., 1978). Die Vorbehandlung mit 5-Thio-D-Glucose (5-T-D-G) schützt BALB/c- und C57BL/6-Mäuse sowohl vor einem HD- als auch einem MLD-STZ-Diabetes (Wang et al., 1993). Es wurde geschlossen, dass 5-T-D-G an den GLUT2 bindet und dort kompetitiv die Aufnahme von STZ über den D-G-Anteil in die  $\beta$ -Zelle verhindert.

In weiteren Untersuchungen zeigten Wang und Gleichmann (1998), dass der GLUT2 eine präferenzielle, wenn nicht gar selektive Zielstruktur der  $\beta$ -Zelle im MLD-STZ-Modell in männlichen C57BL/6-Mäusen ist. Hier ist anzumerken, dass der GLUT2 eine essentielle Zellstruktur für die physiologische Funktion der  $\beta$ -Zelle ist. Über den GLUT2 wird extrazelluläre Glucose in die  $\beta$ -Zelle transportiert und über eine Signalkaskade eine adäquate Insulin-Inkretion stimuliert, um die Homeostase des Kohlenhydratstoffwechsels zu gewährleisten. Zahlreiche Experimente berechtigen zu der Annahme, dass ROS und  $\text{NO}\bullet$  als Mediatoren der  $\beta$ -Zellzerstörung eine wichtige Rolle spielen (Oberley, 1988; Corbett et al., 1993; Halliwell, 1994; Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998).

Weiterhin wurde die Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in pankreatischen Inseln von Ratten durch eine einmalige toxische Dosis STZ nachgewiesen (Takasu et al., 1991). Kürzlich wurde die Bildung der hochtoxischen Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ) mittels der aufwendigen und sehr sensitiven Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) -Spektroskopie sowie die  $H_2O_2$ -Bildung in Inseln durch STZ in vitro gezeigt (Gille et al., 2002).

Basierend auf diesen Befunden sollte die Bedeutung von  $H_2O_2$  im MLD-STZ-Modell analysiert werden.

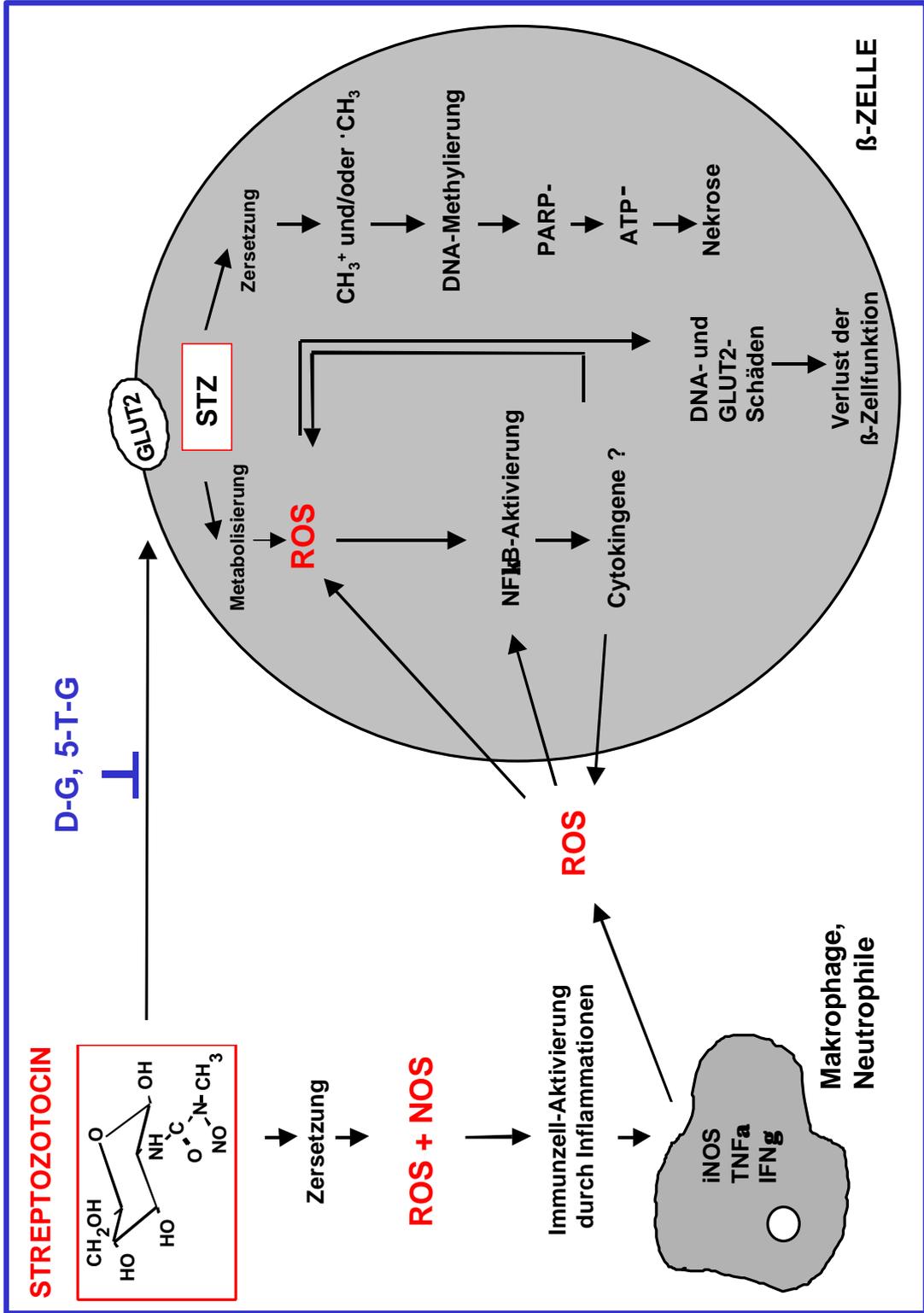


Abbildung 2. Schema der STZ-induzierten β-Zelltoxizität

### 1.3 Reaktive Sauerstoffe (ROS)

Als ROS bezeichnet man freie Sauerstoffradikale und nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies. Freie Radikale besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und erhalten dadurch besondere chemische und physikalische Eigenschaften (Boveris, 1998). ROS besitzen eine hohe chemische Reaktivität und können entweder aus neutralen Molekülen durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons gebildet werden oder auch durch homolytische Spaltung einer kovalenten Bindung. Freie Radikale können aus diesem Grund anionisch, kationisch oder auch neutrale Spezies sein. Die Interaktion freier Radikale mit zellulären Kompartimenten kann zur Bildung von sekundären Radikalen aus Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren führen, die wiederum mit weiteren Zellbestandteilen reagieren können. Somit beginnt eine Kettenreaktion, die eine deutliche Zellschädigung zur Folge hat. Direkte Folgen sind z.B. Nekrosen oder Fibrosen, eine mögliche Spätfolge kann die Tumorgenese sein. Das Ausmaß und die Manifestation der Zellschädigung hängt von der Art der ROS, vom Ort der ROS-Generierung und der chemischen Interaktion mit Zellbestandteilen ab (Marquard und Schäfer, 1994).

Zu den ROS zählen:

#### 1.3.1 Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ )

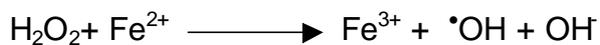
Das Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) wird durch die Aufnahme eines Elektrons des Sauerstoffmoleküls gebildet und hat eine Halbwertszeit von Millisekunden. Das  $O_2^{\bullet-}$  ist eine starke Base und kann Protonen aus Verbindungen abspalten. Als Reduktionsmittel kann es außerdem Übergangsmetallionen wie Kupfer ( $Cu^{2+}$ ) oder Eisen ( $Fe^{3+}$ ) in ihre reduzierte Formen ( $Cu^+$  und  $Fe^{2+}$ ) überführen und Chinone zu Semichinonen reduzieren. Als Nukleophil reagiert es mit elektrophilen Gruppen. Da es ferner ein schwaches Oxidationsmittel ist, kann es z.B. Ascorbinsäure oxidieren.  $O_2^{\bullet-}$  wird in fast allen aeroben Zellen gebildet. Die Bildung findet hauptsächlich in der Elektronentransportkette des Ubichinon-Cytochrom-C-Komplexes in den Mitochondrien statt (Nukatsuka et al., 1988). Ebenso sind phagozytierende Zellen des Immunsystems wie Monocyten, Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen an der Entstehung von  $O_2^{\bullet-}$  beteiligt. In Anwesen-

heit von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\bullet$ ) kann es mit  $\text{O}_2\bullet^-$  zur Bildung von Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) kommen (Beckmann, 1996; Halliwell, 1996).

### 1.3.2 Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

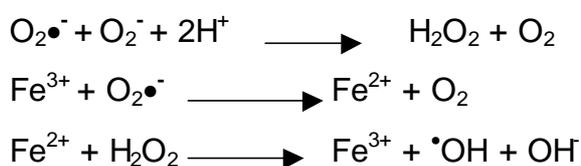
$\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein Zwischenprodukt der schrittweisen Oxidation des molekularen Sauerstoffs über  $\text{O}_2\bullet^-$ . Es kann aber auch durch eine direkte Zwei-Elektronenübertragung entstehen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist eine stabile Verbindung mit einer Halbwertszeit bis zu etwa 10 Minuten, die auch in vielen lebenden Zellen ein Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen ist. Es kann sowohl als Oxidations- als auch als Reduktionsmittel reagieren.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird zum Schutz vor Bakterien und Viren im Cytosol und in den Peroxisomen gebildet (Chance et al., 1979).  $\text{H}_2\text{O}_2$  selber ist kein freies Radikal, aber durch eine Reaktion vom Fenton-Typ mit Übergangsmetallen, z.B.  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$ , eine Quelle der sehr reaktiven  $\bullet\text{OH}$ .

Fenton-Reaktion (hier:  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) (Cohen, 1993):

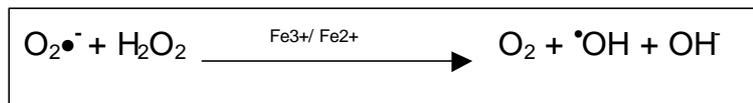


### 1.3.3 Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ )

$\bullet\text{OH}$  ist ein besonders starkes Oxidationsmolekül mit einer Halbwertszeit von etwa 1 Nanosekunde, welches mit organischen Molekülen - wie Proteinen, Aminosäuren, DNA-Basen, Phospholipiden - und organischen Säuren sehr schnell reagieren kann. Es kann Wasserstoffatome aus jeder Kohlen-Wasserstoff (C-H)-Bindung abstrahieren und an aromatischen Verbindungen mit hoher Geschwindigkeit Additionsreaktionen eingehen.  $\bullet\text{OH}$  entsteht über die Fenton-Reaktion (siehe 1.3.2), aber auch durch Übergangsreaktionen zwischen den verschiedenen ROS mit Übergangsmetallen (hier mit  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ), die zur Bildung reaktiver  $\bullet\text{OH}$  führen (Gutteridge, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1992):



Die durch Übergangsmetallionen katalysierte Reaktion wird „Haber-Weiss-Reaktion“ genannt (Kehrer, 2000):



## 1.4 Reaktive Stickstoffe

### 1.4.1 Stickstoffmonoxid (NO•)

NO• ist ein wasser- und fettlösliches freies Radikal, das durch die Aktivität der induzierbaren Nitritoxid-Synthase (inducible nitrite oxide synthase = iNOS) aus der Aminosäure L-Arginin vor allem im Endothel gebildet wird. Ein Anstieg der iNOS1 z.B. in Epithelien führt zu einer Aktivierung der iNOS2 in infiltrierenden Neutrophilen und Makrophagen (Bolanos und Almeida, 1999). Auf Grund der NO•-Bildung in Blutgefäßen durch die iNOS oder das Xanthinoxidase-System wird in der Elektronentransportkette  $\text{O}_2\bullet^-$  gebildet.

### 1.4.2 Peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>)

ONOO<sup>-</sup> (Oxoperoxonitrat (1-)), ist ein potentes Oxidations- und Nitrierungsprodukt, welches über eine Reaktion aus  $\text{O}_2\bullet^-$  und NO• gebildet wird. Die beiden Reaktionspartner entstehen während entzündlicher Prozesse durch erhöhte Aktivität der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase und iNOS (Beckmann, 1996; Radi et al., 2001). Die Halbwertszeit von ONOO<sup>-</sup> beträgt etwa eine Sekunde. Im Organismus entsteht ONOO<sup>-</sup> vor allem intravasal unter Beteiligung von Phagocyten, die ROS bilden, und Endothelialzellen, die NO• generieren (Beckmann et al., 1994; Arteel, 1998). ONOO<sup>-</sup> verursacht möglicherweise durch anschließende •OH-Bildung, ebenso wie das •OH, Strangbrüche an der DNA (Burkhard et al., 1999). Die physiologische Bedeutung des ONOO<sup>-</sup> liegt vor allem, wie die der ROS, in der Abwehr von Mikroorganismen. Aber auch körpereigene Zellen können von den Auswirkungen des ONOO<sup>-</sup> betroffen sein, da es mit allen Biomolekülen, z.B. der DNA (Salgo et al., 1995) mit Proteinen (Grune et al., 2001) und Lipiden (Radi et al., 1991) reagiert. Eine Prävention von Zellschäden wäre eine Verringerung von NO• und/oder  $\text{O}_2\bullet^-$  (Hooper et al., 1997) oder eine Hemmung der iNOS (Matheis et al., 1992). Eine

weiterer Schutz wäre der Abbau des gebildeten  $O_2^{\bullet-}$  durch die Superoxiddismutase (SOD) (White et al., 1994). Neben seiner Beteiligung an Zellschäden hat  $ONOO^-$  aber auch Einfluß auf die zellulären Signalwege (Klotz, 2002), indem es die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen= MAPK) sowie die extrazelluläre regulierte Kinase (ERK)-1 reguliert.

## 1.5 Vorkommen von ROS im Organismus

Sauerstoffradikale und nicht-radikalische Sauerstoffe, wie das  $O_2^{\bullet-}$  und das  $H_2O_2$ , werden bei biologischen Reaktionen gebildet (Storey, 1996). Lösliche Zellkompartimente, wie z.B. Thiole, Flavin und Hämproteine, aktivieren bei Autooxidationsprozessen Sauerstoff; verschiedene lösliche Enzyme setzen im Rahmen ihres katalytischen Kreislaufs  $O_2^{\bullet-}$  frei. Membrangebundene Enzym- und Elektronentransportsysteme bilden ROS, so z.B. produziert das mitochondriale Elektronentransportsystem  $O_2^{\bullet-}$  und induziert somit auch die Bildung von  $H_2O_2$  (Marquard und Schäfer, 1994).

### 1.5.1 Funktionen und biologische Bedeutung

In der normalen Zellfunktion sind ROS ein wesentlicher Bestandteil. So ist z.B. die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle mit ROS assoziiert (Pieper et al., 1995). Untersuchungen im Homogenat von unbehandelten männlichen Wistar-Ratten haben eine basale  $\cdot OH$  Generierung gezeigt. Durch Messungen im ESR-Spektrum konnte das  $\cdot OH$ -spezifische Quartett-Signal (1:2:2:1) der  $\cdot OH$ -Radikale erstmals gezeigt werden (Pieper et al., 1995). ROS sind auch für weitere Zellfunktionen essentiell (Mattson, 1997). So spielen sie eine wichtige Rolle in der Kaskade von Signaltransduktionen (Ho und Bray, 1999; Kaltschmidt et al., 1999; Grilli und Memo 1999). So aktivieren ROS den nukleären Transkriptionsfaktor (NF)- $\kappa B$ , der seinerseits für die Regulation der Expression folgender Proteine verantwortlich ist: Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , iNOS sowie Makrophagen Chemotaktisches Protein (MCP)-1. Dadurch wird die Immunantwort z.B. durch Inflammation initiiert (Baeuerle und Henkel, 1994). Neben biologischen Prozessen, wie Alterungsvorgänge und Entzündungsreaktionen, spielen ROS auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese vieler Krankheiten, so z.B. der Pankreatitis, dem Postischämiesyndrom,

der Tumorgenese, der Arteriosklerose, der diabetischen Angiopathie sowie bei nekrotischen (Mattson et al., 1995) und apoptotischen Zellschäden (Ratan et al., 1994). Die Interaktion der ROS mit beispielsweise der Hyaluronsäure, einem wesentlichen Bestandteil der Extrazellulärflüssigkeit, führt zu dessen Depolarisation. Dieser Abbau spielt bei der rheumatoiden Arthritis eine wesentliche Rolle, da dadurch die Mucopolysaccharide der Synovialflüssigkeit zerstört werden (Myint et al., 1987).

Eine zentrale Bedeutung haben ROS auch bei der Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten, wie der Parkinson'schen Krankheit (Halliwell, 1994; Owen et al., 1996), der Alzheimer-Erkrankung (Subbarao et al., 1990; Lovell et al., 1995) oder der entzündlichen, chronischen Darmerkrankung Morbus-Crohn (Dijkstra et al., 1998). Die Empfindlichkeit von Proteinen gegenüber ROS hängt von ihrer Aminosäurezusammensetzung ab. Eine besondere Reaktivität haben die ROS gegenüber ungesättigten und schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Methionin und Cystein. ROS reagieren auch mit Nucleinsäuren, bzw. den Nucleobasen, vor allem Thymin und Guanin. Das Resultat der oxidativen Zerstörung sind DNA-Schäden, die entweder zum Zelltod führen oder einen Einfluss auf die Tumorentstehung haben. Durch die Behandlung mit STZ und ALX konnte eine Fragmentierung der DNA nachgewiesen werden. Da die induzierten Strangbrüche das DNA-Reparaturprotein poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) aktivieren (Pieper et al., 1995; Lipton, 1999), wird  $\text{NAD}^+$ , eine Energiequelle für zelluläre Prozesse, abgebaut. Die starke PARP-Aktivität resultiert in der Abnahme von  $\text{NAD}^+$ , welches nicht mehr in genügendem Maß nachgeliefert werden kann.

Dieser Prozess führt zu einer Akkumulation der poly-(ADP-Ribose), einem Endprodukt der PARP-Aktivität, und somit zum Zelltod. Okamoto (1985) vermutete, dass die Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $^{\bullet}\text{OH}$  die Ursache für die Fragmentierung in pankreatischen Inseln sein könnte. ROS können ebenfalls mit Lipiden reagieren, die auf diese Weise oxidativ zerstört werden. Membranphospholipide der Zellmembran oder der Organellmembran können durch peroxidative Schädigung in ihrer Funktion so stark beeinträchtigt werden, dass sie zum Zelltod führen.

Dazu gehören z.B. ATP-abhängige Calciumtransportproteine, die gehemmt werden. Als Folge wird intrazelluläres Calcium angereichert und der Zelltod-

gang hervorgerufen. Physiologische antioxidative Schutzmechanismen kontrollieren die Bildung von ROS. Ihre antioxidative Kapazität kann jedoch durch die Bildungsrate der ROS übertroffen werden, sodass zelluläre Bestandteile oxidativ zerstört werden. Demzufolge entsteht der sogenannte „oxidative Stress“ (Sies, 1997). Ein Schema zur Kettenreaktion von ROS in biologischen Systemen ist in Abbildung 3 dargestellt.

Nachdem die pathogene Wirkung von ROS in zahlreichen Krankheiten gezeigt wurde, war es von großem Interesse zu untersuchen, ob den ROS bei der chronisch immunologischen Pathogenese des Diabetes eine wesentliche Bedeutung zuzuordnen ist. Ob speziell die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung in Inseln durch STZ-Behandlung stimuliert wird, bleibt zu klären.

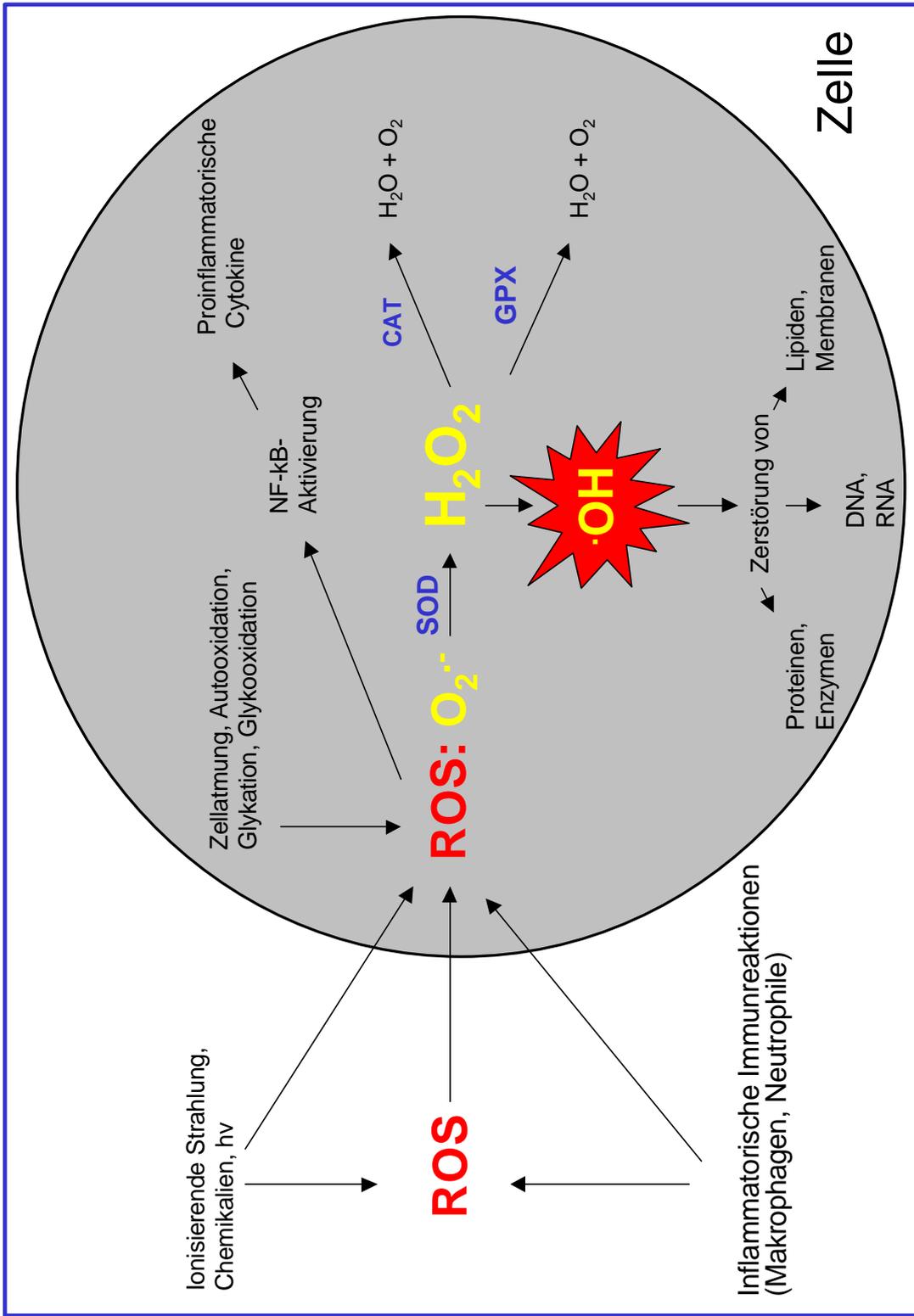


Abbildung 3. Kettenreaktion von ROS in biologischen Systemen

## 1.6 Schutzmechanismen gegen ROS

In der Zelle existieren verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen gegenüber Schäden durch ROS. Diese protektiven Systeme fangen entweder direkt ROS ab oder reparieren die eingetretenen Schäden. Eine weitere wichtige Rolle für den antioxidativen Status der Zelle spielen Spurenelemente, wie z.B. Zink ( $Zn^{2+}$ ) und Selen (Se).

### 1.6.1 Nicht-enzymatische Schutzsysteme

Zu den nicht-enzymatischen Schutzsystemen gehört u.a. die Ascorbinsäure (Vitamin C), die als wasserlöslicher Radikalfänger mit ROS unter Bildung von Semidehydroascorbat reagiert. Zu dieser Gruppe gehört auch  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), ein Lipid-lösliches Antioxidanz. Das Molekül besitzt eine Chromanolgruppe, die mit Peroxyl- und Alkoxyradikalen reagiert und somit die Lipidperoxidation verhindert (Sies, 1989). Zusätzlich wird durch  $\alpha$ -Tocopherol das nicht-enzymatische Se bereit gehalten. Die Aufrechterhaltung des Se-Spiegels ist für die Se-abhängige Glutathionperoxidase von größter Bedeutung (Behne und Kyriakopoulos, 2001). Peroxylradikale, aber auch Singulett-Sauerstoff werden durch  $\beta$ -Carotin (Provitamin A) detoxifiziert.  $\beta$ -Carotin spielt in Membranen bestimmter Gewebe, so z.B. der Retina, eine wichtige Rolle und ist dort in großen Mengen zu finden. Nicht-enzymatische Schutzsysteme wirken protektiv gegen Krankheiten (Cross et al., 1987), so z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen (Aviram et al., 2000), haben aber auch für ein intaktes Immunsystem (Biesalski, 1995) eine große Bedeutung. So zeigten Kinalsky et al. (1999), dass trächtige Wistar-Ratten, die eine Dosis STZ (40 mg/kg KG) erhalten hatten und zusätzlich mit Vitamin E supplementiert wurden, erhöhte SOD-Aktivitäten sowie einen erhöhten Glutathion (GSH)-Spiegel haben. Diese Erhöhung konnte ebenso in den Nachkommen gemessen werden. Daraus wurde geschlossen, dass eine Imbalance zwischen ROS und ihrer unkontrollierten Bildung durch schützende Enzyme und deren Aktivitäten reduziert wird.

## 1.6.2 Enzymatische Schutzsysteme

### 1.6.2.1 Superoxiddismutase (SOD)

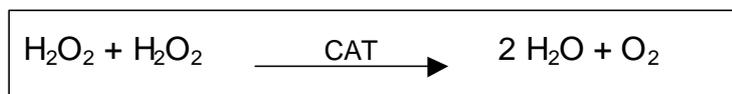
SOD ist ein Metallenzym, welches die Disproportionierung („Dismutation“) von  $O_2\bullet^-$  katalysiert (McCord und Fridovich, 1969).



In Eukaryonten existieren verschiedene Formen der SOD: 1) eine intrazelluläre cytosolische Cu- und Zn-haltige SOD mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, die auch in nukleären Bereichen und in Lysosomen zu finden ist (Chang et al., 1988); 2) eine extrazelluläre Cu/ZnSOD, die im Plasma, in der Lymphe und der Cerebrospinalflüssigkeit enthalten ist (Marklund, 1997), als Homotetramer vorliegt und ein Molekulargewicht von 135 kDa besitzt; 3) eine mitochondriale, Mangan (Mn)-haltige SOD-Form mit Tetraederstruktur und einem Molekulargewicht von 96 kDa (Keller et al., 1991; Liou und Baltimore, 1993).

### 1.6.2.2 Katalase (CAT)

Von den verschiedenen Enzymen, die  $H_2O_2$  abfangen (Fridovich, 1986), gehört CAT zu den Hydroperoxidasen, die ein tetrameres Hämprotein ist mit je einem Häm als prosthetische Gruppe und einem Molekulargewicht von 230 kDa. CAT katalysiert z.B. in den Peroxisomen oder den Erythrocyten die Disproportionierung von  $H_2O_2$ :



Während der Umwandlung von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  wird  $H_2O_2$  oxidiert, und das Eisenmolekül der prosthetischen Gruppe wird dabei reduziert.

### 1.6.2.3 Glutathionperoxidase (GPX)

Ein weiteres Enzym – welches die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das Tripeptid Glutathion (GSH), bestehend aus Glutamat, Glycin und Cystein, katalysiert – ist die GPX.

GPXs katalysieren die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu organischen Hydroperoxiden, einschließlich Lipidhydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen. Oxidiertes (GSSG) und reduziertes GSH bilden ein Redoxsystem, bei dem die reduzierte Form (GSH) überwiegt. Durch die GSH-Reduktase wird mit Hilfe von NADPH aus GSSG GSH regeneriert (Abb. 4), der Zyklus kann demzufolge von neuem beginnen (Flohe, 1982; Epp et al., 1983; Tappel, 1984; Köhrle et al., 2000; Behne et al., 2001).

Neben  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Ethylhydroperoxiden und tert.-Butylhydroperoxiden werden auch Linol- und Linolensäurehydroperoxide sowie Hydroperoxide von Steroiden und Nukleinsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Lediglich zyklische Dialkylperoxide und zyklische Peroxide werden nicht umgesetzt. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt jeweils nahe der Oberfläche und ermöglicht somit die Umwandlung jedes Hydroperoxids. Die katalytische Triade des Enzyms besteht aus Selenocystein, Glutamin und Tryptophan.

Die GPX ist Se-haltig und Se-abhängig und kommt in fünf verschiedenen Isoformen vor: cytosolische GPX (cGPX), gastro-intestinale GPX (GI-GPX), plasmatische GPX (pGPX), Phospholipid GPX (PH-GPX) und Sperma Nuclei GPX (snGPX) (Behne und Kyriakopoulos, 2001). Die Umsatzgeschwindigkeiten der verschiedenen Isoformen besitzen folgende Reihenfolge: cGPX > GI-GPX < pGPX > PH-GPX.

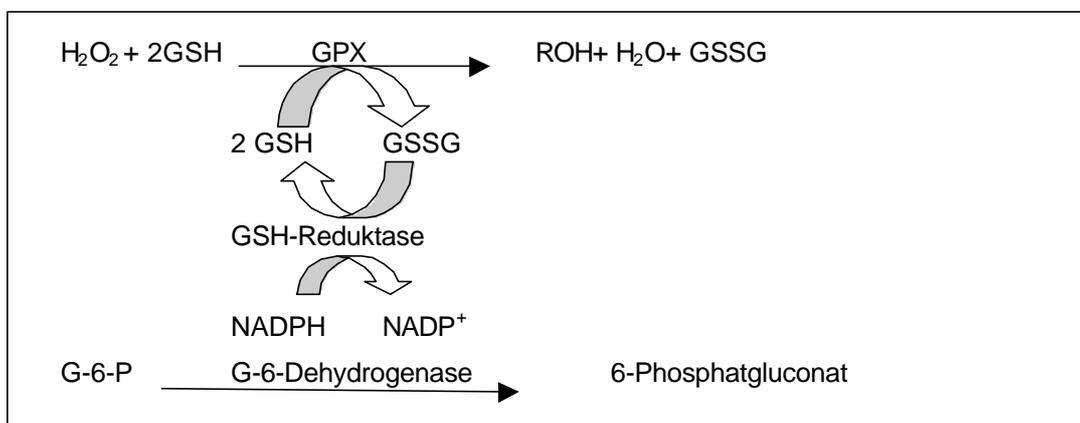


Abbildung 4:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Katalyse (nach: Flohe, 1982)

Demzufolge kann der Schaden für eine Zelle, der durch ROS entsteht, durch antioxidative Abwehrsysteme abgewendet werden. Jedoch sind Zellen bzw. Organe mit unterschiedlichem Gehalt an antioxidativen Systemen ausgestattet. So zeigten bereits Grankvist et al. (1981) an normalgewichtigen und fettleibigen Mäusen deutlich niedrigere Spiegel in  $\beta$ -Zellen im Vergleich zu anderen Organen wie Leber, Niere und Lunge.

Diese Befunde haben Lenzen et al. (1996) bestätigt und erweitert. Sie zeigten, dass in pankreatischen Inseln der Ratte und in Insulin-produzierenden RINm5F-Zellen eine sehr geringe Expression der Enzyme SOD, CAT und GPX im Vergleich zu elf anderen Organen vorliegt (Tiedge et al., 1997). Diese geringe Ausstattung der pankreatischen Inseln scheint mit der ausgeprägten Sensibilität der pankreatischen Inseln gegenüber Diabetogenen wie STZ oder ALX assoziiert zu sein, die potente ROS-Bildner sind.

Darüber hinaus sind Insulin-produzierende Zellen, im Gegensatz zu anderen Gewebetypen, nicht in der Lage auf eine Stresssituation mit der Hochregulierung ihres antioxidativen Systems zu antworten (Tiedge et al., 1997). Durch Genmodulation kann jedoch ein Schutz vor ROS erzielt werden. So bewirkt in RINm5F-Zellen die Überexpression von CAT und GPX eine erhöhte Resistenz gegenüber der Schädigung durch ROS (Tiedge et al., 1997). Auch sind transgene Mäuse mit Überexpression der Cu/Zn SOD vor Diabetes durch STZ und ALX geschützt (Kubisch et al., 1994).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass durch gezielte Überexpression der Cu/Zn SOD in den  $\beta$ -Zellen der Maus die Aktivität der SOD um 50% ansteigt und vor ALX-induzierter Hyperglykämie schützt (Kubisch et al., 1997). Weiterhin sind transgene Mäuse mit gezielter CAT-Überexpression in  $\beta$ -Zellen weniger empfänglich für den diabetogenen Effekt von STZ (Xu et al., 1999). In Abbildung 3 sind die katalytischen Wege der antioxidativen Enzyme in biologischen Systemen kurz illustriert.

### 1.7 Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ )

Das Spurenelement  $\text{Zn}^{2+}$ , als Sulphat ( $\text{ZnSO}_4$ ) verabreicht, induziert das zelluläre Antioxidanz Metallothionein (MT) und schützt als Scavenger die Zellen vor den hochtoxischen  $\cdot\text{OH}$  (Mello-Filho et al., 1988; Chubatsu und Meneghini, 1993). Eine MT-Induktion durch  $\text{ZnSO}_4$  wird auch in den pankreatischen Inseln

der Maus in vivo (Zimny et al., 1993) und in vitro (Ohly und Gleichmann, 1995) erzielt. Durch Vorbehandlung mit  $ZnSO_4$  wird in Ratten die HD-STZ-induzierte Hyperglykämie signifikant reduziert (Yang und Cherian, 1994).  $ZnSO_4$  hatte jedoch keinen Einfluß auf die Aktivität der SOD im Pankreas. Durch  $ZnSO_4$ -angereichertes Trinkwasser wird in Mäusen MT in pankreatischen Inseln induziert und Diabetes verhindert (Ohly et al., 2000). Von den Autoren wird angenommen, dass MT als Scavenger vor STZ-induzierten  $\beta$ -Zellschäden durch  $\cdot OH$  schützt.

### 1.8 Selen (Se)

In Proteinen wird Se in Form von Selenocystein gebunden. Diese Proteine werden als Selenoproteine (SeP) bezeichnet und sind strikt Se-abhängig. Die meisten SeP enthalten ein Atom Se pro Molekül als Selenocystein im aktiven Zentrum der Enzyme (Schrauzer, 1983; Combs et al., 1986; Riedel 1999). SeP dienen sowohl als Se-Transporter, als auch als Antioxidanz gegen freie Radikale, wie z.B. Phospholipid-Peroxide und  $ONOO^-$  (Saito et al., 1999). Die spezifischen SeP werden genetisch codiert, physiologisch reguliert und unterliegen einer Spezifität. Das erste SeP, welches in Säugetieren gefunden wurde, war die GPX (Saito et al., 1999).

Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen niedriger Se-Aufnahme und erhöhtem Risiko für Kardiomyopathien, kardiovaskuläre Erkrankungen, Karzinogenese und akuter und chronischer Pankreatitis (Lankisch et al., 1998; Zimmermann et al., 2000), aber auch auf den Einfluss auf das Immunsystem, wie der Se-Abhängigkeit der zellulären Immunität, hin. Untersuchungen zeigen, dass die Wirkung von Se auch über die Regulation der Genexpression durch Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren bei systemischen Inflammationssyndromen und Sepsis vermittelt wird (Behne et al., 1998; Zimmermann et al., 2000). Bisher sind über 25 Selenoenzyme und SeP beschrieben worden, dazu zählen die fünf Subtypen der GPX sowie SeP P und SeP W (Mostert, 2000). SeP P fungiert als Transportprotein im Plasma, das SeP W und noch mindestens 16 weitere, noch nicht vollständig charakterisierte SeP, kommen besonders in endokrinen Organen vor (Behne und Kyriakopoulos, 1995).

Im Zentrum des Pathomechanismus vieler Erkrankungen stehen freie Radikale. Viele Krankheiten und die damit verbundenen Folgeerkrankungen sind auf eine Überforderung des antioxidativen Schutzsystems zurück zu führen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem SeP P-Level im Blut. Außerdem bieten SeP Schutz gegenüber ONOO<sup>-</sup>-mediierter Oxidation und Nitrifizierung (Arteel et al., 1998). Als essentielles Spurenelement ist Se notwendig, um eine Vielzahl an Erkrankungen zu verhindern (Schwartz und Foltz, 1957).

Se-Gaben in Form von Selenit 0,05 mg/kg in Kombination mit Vitamin E führte in Kaninchen zu einer vermehrten Antikörperbildung nach Vakzinierung mit Typhuserregern. Der erhöhte Immunglobulin-Titer bleibt auch über Monate erhöht. In Ratten gelingt mit zusätzlicher Se-Gabe eine Immunisierung gegen Malaria-toxine (Desowitz und Barnwell, 1980).

Demnach scheint Se eine Steigerung der Immunkompetenz zu ermöglichen. Eine Studie an Sepsispatienten, die zusätzlich Se-Gaben von 1.000 µg/d als Dauerinfusion erhielten, zeigt einen starken Anstieg der GPX-Aktivität im Blut (Zimmermann et al., 1997). Die Absorption von Se erfolgt in Säugetieren hauptsächlich im Duodenum, Caecum und Colon. Alle Verbindungen des Se werden absorbiert, jedoch ist die Aufnahme an organisch gebundenem Se in Form von Selenomethionin und Selenocystein deutlich effektiver als die des anorganischen Se (Reilly, 1996). Inkorporiertes Selenomethionin spielt eine Rolle bei der Überbrückung kurzzeitiger Se-Mangelzustände (Reilly, 1996; Behne und Kyriakopoulos, 2001).

Mit Hilfe von radioaktiver Markierung können SeP nachgewiesen werden, indem Se-defizient ernährten Mäusen oder Ratten radioaktiv markiertes Se (<sup>75</sup>Se) in Form von Selenit oder Selenat verabreicht (Trinkwasser oder Injektion) wird. Durch die Se-Mangelernährung wird über 80% des zugeführten <sup>75</sup>Se in Selenocystein-haltige Enzyme eingebaut.

Durch weitere Untersuchungen konnte man mehr als zehn Proteinen eine definitive enzymatische Funktion zuordnen (Sunde, 1999; Behne und Kyriakopoulos, 2001).

In Bezug auf die Expression der verschiedenen SeP existiert im Organismus eine strikte Hierarchie (Kyriakopoulos und Behne, 2002). Diese gewährleistet bei Unterversorgung, dass der Se-Gehalt in bestimmten Geweben und Organen aufrecht erhalten wird und somit deren Funktion unbeeinträchtigt bleibt. In Rat-

ten wurde nachgewiesen, dass ein Se-Mangel über sechs Generationen hinweg die Se-Konzentration in Leber, Skelettmuskeln und Blut zwar unter 1% des Normalwertes senkt, dagegen im Gehirn noch 60% des Se-Gehalts, verglichen mit Kontrolltieren, vorrätig sind (Behne und Kyriakopoulos, 2001).

Innerhalb der verschiedenen Gewebe zeigt die PHGPX die stabilste Aktivität, gefolgt von der GIGPX. Hingegen weisen die cGPX, die pGPX sowie die snGPX bei Se-Mangel einen schnellen Aktivitätsverlust (Bauersachs und Kirchgessner et al., 1992) auf.

Zu klären bleibt, ob eine Se-Diät einen Effekt auf die antioxidative Aktivität der GPX und somit den MLD-STZ-induzierten Diabetes hat.

## 2. Fragestellungen

ROS sind als unspezifische inflammatorische Mediatoren neben T-zell-spezifischen Immunreaktionen an der Pathogenese der  $\beta$ -Zelldestruktion im MLD-STZ-induzierten Diabetes der Maus beteiligt. Da die  $\cdot\text{OH}$ -Generierung nach STZ-Behandlung in pankreatischen Inseln der Maus *in vitro* (Gille et al., 2002) nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Vorläufer der sehr reaktiven  $\cdot\text{OH}$  gebildet werden.

Daraufhin wurden in der vorliegenden Arbeit *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen zur Klärung folgender Fragestellungen durchgeführt:

- in vivo**
- \* Wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach MLD-STZ-Behandlung lokal in Inseln *ex vivo* generiert?
  - \* Wird die Aktivität des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abbauenden antioxidativen Enzyms GPX in Inseln durch MLD-STZ *ex vivo* beeinflusst?
  - \* Kann durch Gabe von Se-angereichertem (+)-Futter eine Protektion vor einem MLD-STZ-Diabetes erreicht werden? Es wird eine antioxidative Wirkung von Se(+)-Futter durch die Erhöhung der GPX-Aktivität und somit eine Erniedrigung der Hyperglykämie angenommen.
  - \* Führt Gabe von Se-defizientem (-)-Futter zu einer erhöhten Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-Diabetes? Dabei wird angenommen, dass durch einen Se-Mangel die Aktivität der GPX reduziert wird.
- in vitro**
- \* Wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pankreatischen Inseln der Maus nach Inkubation mit STZ generiert?
  - \* Wird die Aktivität des antioxidativen Enzyms GPX durch STZ beeinflusst?
  - \* Hat  $\text{H}_2\text{O}_2$  Effekte auf die  $\beta$ -Zellfunktion?
  - \* Kann durch Vorinkubation mit  $\text{ZnSO}_4$  die STZ-stimulierte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung verhindert werden? Es wurde gezeigt, dass  $\text{ZnSO}_4$ -angereichertes Trinkwasser MT in pankreatischen Inseln induziert und vermutlich vor der Toxizität der  $\cdot\text{OH}$  schützt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 Mäuse

Männliche und weibliche C57BL/6- und BALB/c-Mäuse wurden im Alter von 5-6 Wochen von Harlan Winkelmann (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) bezogen. Im Alter von 6-7 Wochen wurden sie für die In-vitro-Untersuchungen und im Alter von 7-8 Wochen für die Ex-vivo-Untersuchungen verwendet. Alle Versuchstiere wurden unter konventionellen Bedingungen in Käfigen mit maximal 5 Tieren gehalten und erhielten reguläres Futter (C; "ssniff-M"-Mäusediät, Versuchstier-Diäten GmbH, Soest, Westfalen, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

Um den Effekt von Se auf die Entwicklung des mit MLD-STZ-induzierten Diabetes zu untersuchen, erhielten die Tiere entweder Se(+) (300 µg Se/kg Trockenmasse) oder Se(-) Futter (> 5-10 µg Se/kg Trockenmasse).

Die Versuche waren von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen, Deutschland, genehmigt (AZ: 50.05-230-88/02 und 50.05-230-16/03).

#### 3.2 Material

##### 3.2.1 Geräte

Gerät	Lieferant
Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa (Italien)
Begasungsbrutschrank	Heraeus Typ B5060 EK/CO <sub>2</sub> (Osteroede, Deutschland)
Binokulares Mikroskop	Wild M8 (Heerburg, Schweiz)
Blutzuckermessgerät	Eppendorf EPOS Analyser 5060 (Hamburg, Deutschland)
Computerprogramme	Microsoft Word for Windows 98, 2000; Graphpad Prism; Soft Pac Protein Assay & Kinetics (Beckman Instruments (CA, Scotland)); Micro Win 3.0
Elektronische Analysewaage	Sartorius Typ 2024 MP (Göttingen, Deutschland)

---

$\gamma$ -Counter	Packard Auto-Gamma 5780; INV 2700 (Frankfurt/Main, Deutschland)
Kühlschränke	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Beckmann GS-6KR Centrifuge (München, Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag RH; IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mikroprozessor pH-Meter	Knick-Klees (Düsseldorf, Deutschland)
Millipore Schlauchpumpe	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Multipipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Photomikroskop Axiophot	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung (Nussloch, Deutschland)
Spektrophotometer	Perkin- Elmer LS-5-Luminiscence Beckmann DU 650 (München, Deutschland)
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air Modell HLB 2472 (Osterode, Deutschland)
Schüttler	Heidolph Polymax (Sydney, NSW); Laborbedarf Behr (Düsseldorf, Deutschland)
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge A (Osterode, Deutschland)
Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus HD 60 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge	Beckmann CS-6KR (München, Deutschland)

**3.2.2 Verbrauchsmaterial**

Material	Lieferant
Combitips (2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Kapillarpipetten (20 µl)	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Einmal-Küvetten (1 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Einmal-Pipetten (1 ml; 5 ml; 10 ml; steril)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Einmal-Pipettenspitzen (51 mm lang; 72 mm lang; autoklaviert)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Spritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml)	Ameba (Kriftel, Deutschland)
Einmal-Insulinspritzen (1 ml)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Einmal- Küvetten (12,5 x 12,5 x 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml; konisch; steril; mit Schraubkappe)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Gewebekulturplatten (6 und 24 Vertiefungen)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Gewebekulturschalen (Petrischale; 60 x 15 mm; 35 x 10 mm 100 x 20 mm; steril)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Kanülen (0,30 mm x 13 mm; 30G x ½steril; 0,33 mm x 13 mm; 29 G x ½steril; 0,45 mm x 13 mm; 26 G x ½steril)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Millex-GS Einwegfilter (0,22 µm Filtereinheit)	Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland)
Quarzküvetten Rotilabo, Spectrosil (10 mm)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Reagierröhrchen (14 ml; 105 x 16 mm und 3,5 ml; 55 x 12 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterivex-GS Filtereinheit (0,22 µm Filtereinheit)	Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland)

### 3.2.3 Reagenzien

Substanz	Lieferant
Alloxan	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Benzylpenicillin/ Streptomycin	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Bio-Rad-Proteinassay-Farbstoffkonzentrat (Dye reagent)	Bio-Rad Laboratorium GmbH (München, Deutschland)
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Katalase	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
D-Glucose	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $N_2HPO_4$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Eisessig	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
FBS: fötales Rinderserum	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Glutathion (reduziert)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Glutathionperoxidase (bovine Erythrocyten)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Glutathion-Reduktase (120 U/ ml)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hämolyserereagenz (Digitonin)	Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
HBSS (10x): Hank's Balanced Salt Solution	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
HCL: Salzsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES: N- (2-hydroxyethyl)-Piperazin- N-2- Ethan Sulfonsäure	Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
Insulin RIA 100	Pharmacia Upjohn (Freiburg, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase Typ V (1,6 U/mg)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Lymphocytentrennmedium Seromed (Ficoll, Dichte 1,077)	Biochrom KG (Berlin, Deutschland)
L-Buthionin [S,R]- Sulfoximin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \times H_2O$ )	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Magnesiumsulfatheptahydrat ( $MgSO_4 \times 7 H_2O$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Maus Insulin ELISA	Mercodia AB (Uppsala, Schweden)
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Methylbenzoat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat (NaCit)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert, NADPH)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
N-Nitroso-N-Methylurea (MNU)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
RPMI 1640 Pulver	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Scopoletin	Sigma (MW 192,2) (Deisenhofen, Deutschland)
Se(-)-Diät ( $< 5-10 \mu g$ Se/kg Trockengewicht)	30% Torulahefe; 57,8% Saccharose; 5% tocopherolarmes Fett; 5% Mineralmischung; 1% Vitaminmischung (in g/kg: Vit A, 1,8; p-Aminobenzoessäure, 5,0; Vit B12, 0,00135; Biotin, 0,02; Ca-Pantothenat, 3,0; Cholin-Chlorid, 75,0; Vit D, 0,125; Glucose, 900,46; Folsäure, 0,09; Inositol, 5,0; Menadion, 2,25; Niacin, 4,25; Pyridoxin-HCl, 1,0; Riboflavin, 1,0; Thiamin-HCl, 1,0), 0,3% D,L-Methionin; 200 mg D,L- $\alpha$ -Tocopherolacetat/kg und 50 mg Zink; ICN, Pharmaceuticals (Cleveland, USA)
Se(+)-Diät (300 $\mu g$ Se/kg Trockengewicht)	Natriumselenit; 57,8% Saccharose 5% tocopherolarmes Fett; 5% Mineralmischung; 1% Vitaminmischung (in g/kg: Vit A, 1,8; p-Aminobenzoessäure, 5,0; Vit B12, 0,00135;

	Biotin, 0,02; Ca-Pantothenat, 3,0; Cholin-Chlorid, 75,0; Vit D, 0,125; Glucose, 900,46; Folsäure, 0,09; Inositol, 5,0; Menadion, 2,25; Niacin, 4,25; Pyridoxin-HCl, 1,0; Riboflavin, 1,0; Thiamin-HCl, 1,0), 0,3% D,L-Methionin; 200 mg D,L- $\alpha$ -Tocopherolacetat/kg und 50 mg Zink; ICN, Pharmaceuticals (Cleveland, USA)
„ssniff-M“-Mäusediät (C)	22% Rohprotein; 4,5% Rohfett; 3,9% Rohfaser; 6,8% Rohasche; 15,0 IE/kg Vit A; 1,0 IE/kg Vit D3; 100 mg/kg Vit E; 5 mg/kg Cu; 0,1 mg/kg Se; ssniff Spezialdiäten (Soest, Deutschland)
Streptozotocin (STZ)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
tert.-Butylhydroperoxid (70%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan (Tris)	Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (30%) (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Zinksulphat (ZnSO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)

### 3.2.4 Lösungen und Zellkulturmedien

Alloxan (ALX)	50 mM (Stocklösung); davon 30 $\mu$ l 0,5 mmol/l 60 $\mu$ l 1,0 mmol/l 120 $\mu$ l 2,0 mmol/l 240 $\mu$ l 3,0 mol/l
BSA Standard (Proteinbestimmung) <sup>+</sup>	50 mg BSA [1 mg/ml]
Bouin-Lösung	225 ml Pikrinsäure; 15 ml Eisessig; 75 ml Formalin
Katalase (CAT)	1.000 U/l in 1 ml aqua bidest.
D-Glucose-Lösung* ( $\beta$ -Zell-Funktionstest) <sup>+</sup>	<i>Stammlösung</i> 0,42 mol/l: 752,5 mg D-Glucose in 10 ml KRBH
Formalinlösung	8% Paraformaldehyd in H <sub>2</sub> O (24 g in 300 ml aqua bidest. lösen) bei 60°C; NaOH zugeben, bis Lösung klar wird
Glutathion (GSH)	7,3 mg GSH in 7 ml Tris+ EDTA

Hämolyse-Lösung (Blutzuckermessung) <sup>+</sup>	Digitonin 0,04 mol/l; Maleinimid > 1,0 mmol/l (1 Reagenztablette in 500 ml aqua bidest. lösen)
HBSS-Medium: Hank`s Balanced Salt Solution* (Inselisolierung) <sup>+</sup>	100 ml HBSS [10x] 50 ml FCS [5%; inaktiviert]; 2,4 g HEPES [10 mmol]; 3,7 g NaHCO <sub>3</sub> ad 1.000 ml aqua bidest., pH 7,2-7,4
Kaliumphosphat-Puffer	<i>Stammlösung A:</i> 0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <i>Stammlösung B:</i> 0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <i>Gebrauchslösung:</i> 39 ml Lösung A; 61 ml Lösung B, pH 7,0
Kollagenase-Lösung* (Pankreasdigestion) <sup>+</sup>	2 ml Kollagenase Typ V (1,6 U/mg)
KRBH-Puffer: Krebs-Ringer Bicarbonat HEPES*	<i>Stammlösung A:</i> 34,62 g/l NaCl [0,9%] 1,77 g/l KCl [1,15%] 1,86 g/l CaCl <sub>2</sub> [1,22%] 0,77 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [2,11%] 1,47 g/l MgSO <sub>4</sub> [3,82%] <i>Stammlösung B:</i> 13,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> [1,3 %] <i>Gebrauchslösung:</i> 200 ml Lösung A; 160 ml Lösung B; 2,4 g HEPES [10 mmol] ad 1.000 ml aqua bidest., pH 7,2-7,4
Meerrettichperoxidase (HRP)	150 U/ml (1 ml aqua bidest.)
NaCit-Puffer (STZ-Lösungsmittel) <sup>+</sup>	4,5 g Tri-Natriumcitrat-5, 5 Hydrat ad 500 ml aqua bidest., pH 4,0
NADPH	3,99 mg NADPH in 7,5 ml Tris+ ED- TA
Pikrinsäure	18-19 g Pikrinsäure ad 1.000 ml aqua bidest.

RPMI 1640-Medium* (+(Inselkulturen)) <sup>+</sup>	10 g RPMI 1640 Pulver L-Glutamin; D-Glucose; 100 ml FBS [10%]; 2 g NaHCO <sub>3</sub> ; 1,01 g D-Glucose [5,6 mmol/l]; 20 ml Benzylpenicillin/Streptomycin [100 U/ml/ 0,1 mg/ ml] ad 1.000 aqua bidest., pH 7,2- 7,4
Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxy-2H- 1-benzopyran-2-on; 6-Methoxyumbelliferon)	3 mM in DMSO
STZ-Lösung (ip Injection) <sup>+</sup>	40 mg STZ; 10 ml NaCit-Puffer
STZ-Lösung* (Behandlung in vitro) <sup>+</sup>	10 mmol/l (33,1 mg/ 1.000 µl NaCit); 6 mmol (19,88 mg/ 1.000 µl NaCit); 3 mmol (9,94 mg/ 1.000 µl NaCit); 1 mmol (3,31 mg/ 1.000 µl NaCit)
tert.-Butylhydroperoxid (70%)	0,22 mmol/l 1:10.000 in aqua bidest.
Tris/ EDTA-Puffer (Puffer für Enzymkinetik)	50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,3; 5 mmol/l EDTA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	10 mol/l Stocklösung Gebrauchslösung: 2,5 µmol/l: 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mmol/l) + 310 µl KRBH; 5,0 mol/l: 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mmol/l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + 150 µl KRBH; 10 µmol/l: 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mmol/l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + 70 µl KRBH; 30 µmol/l: 100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mmol/l) + 160 µl KRBH; 50 µmol/l: 100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mmol/l) + 60 µl KRBH; 100 µmol/l: 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 mmol/l) + 70 µl KRBH
ZnSO <sub>4</sub> -Lösung (Zn-Behandlung in vitro) <sup>+</sup>	10 mmol 3,5 mg ZnSO <sub>4</sub> 2 ml RPMI 1640 Medium

+ = hauptsächlichlicher Verwendungszweck

\* = Lösungen bzw. Zellkultur-Medien wurden mit Millipore-Filtern steril filtriert

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Behandlung der Mäuse**

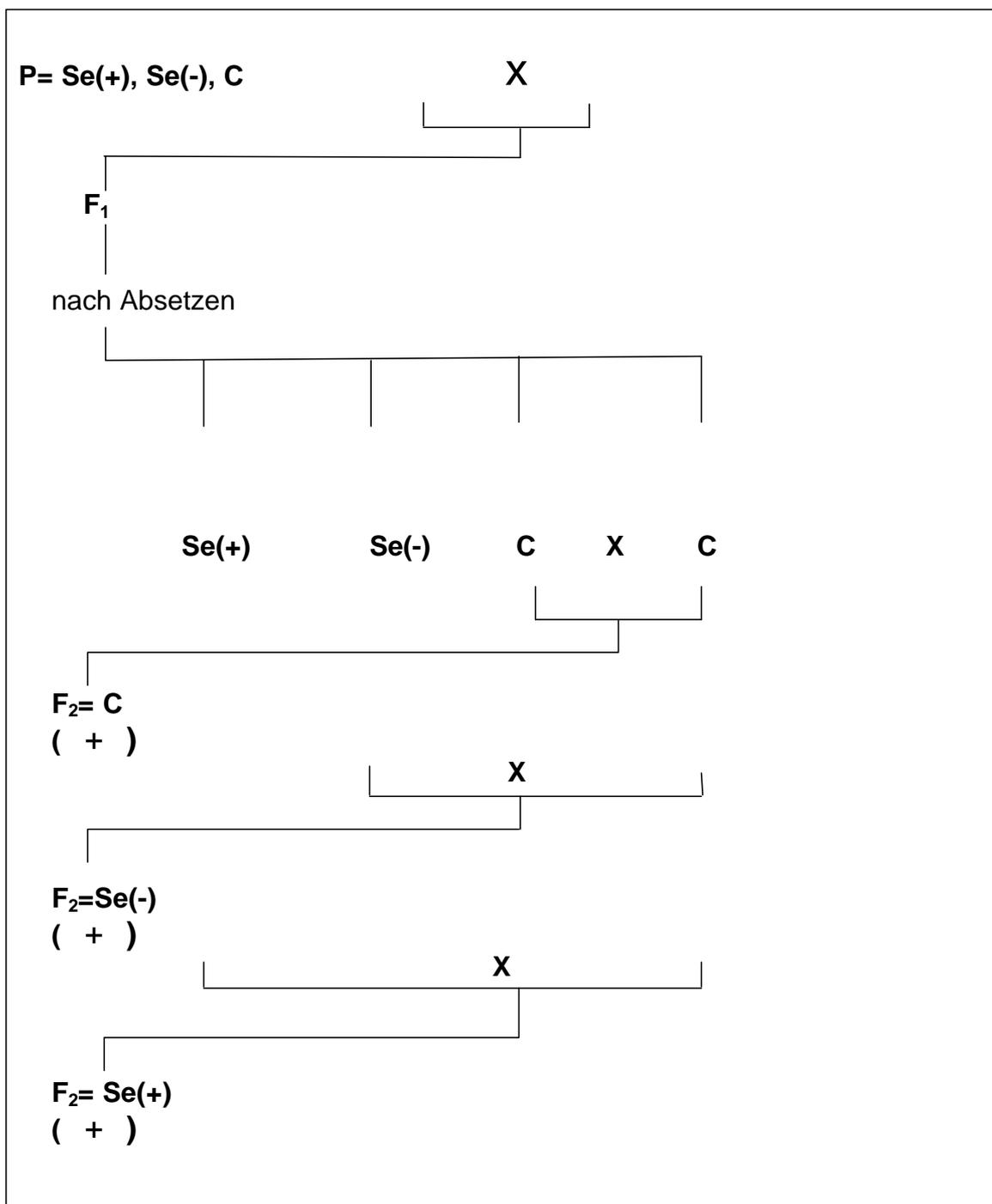
##### **3.3.1.1 Behandlung mit MLD-STZ**

Es wurden Gruppen von jeweils 5 Mäusen gebildet, von denen 4 mit MLD-STZ nach dem Protokoll von Like und Rossini (1976) behandelt wurden. Eine unbehandelte Maus diente als Kontrolle. Die Mäuse erhielten an 5 aufeinander folgenden Tagen eine ip-Injektion von jeweils 40 mg STZ/kg KG. Das in Natriumcitrat (NaCit) gelöste STZ wurde innerhalb von 5 min nach Auflösung injiziert. An Tag 1 und/oder 3 nach der letzten STZ-Injektion wurden die pankreatischen Inseln isoliert und für die Bestimmung von  $H_2O_2$  und für die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten aufgearbeitet.

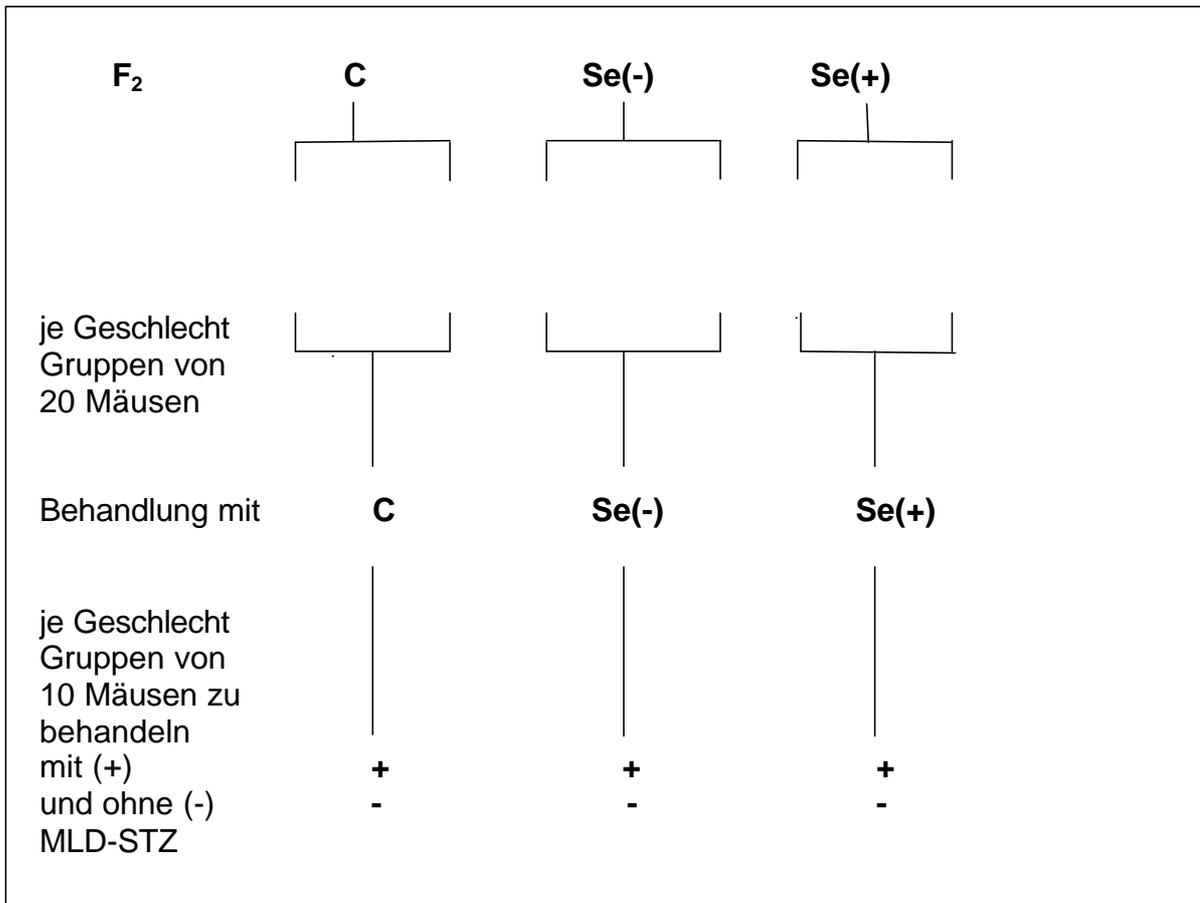
##### **3.3.1.2 Behandlung mit Se-angereichertem, Se-defizientem oder regulärem Futter**

Die Untersuchungen wurden in männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen der  $F_2$ -Generation durchgeführt, die entweder Se(-)-, Se(+)- oder reguläres (C)-Futter erhalten haben.

Zu Beginn des Versuchs wurden 6 Zuchtpaare angesetzt, die Se(-)-, Se(+)- oder C-Futter erhalten haben. Direkt nach dem Absetzen erhielten die weiblichen Mäuse der  $F_1$ -Generation entweder Se(+), Se(-) oder normales (C) Futter. Die Weibchen der  $F_1$ -Generation wurden mit Männchen verpaart, die C-Futter erhalten haben, um die Fertilität zu gewährleisten. Die Mäuse der  $F_2$ -Generation wurden direkt nach dem Absetzen nach Geschlechtern getrennt und erhielten entweder Se(+)-, Se(-)- oder C-Futter (Abb. 5). Jede der 3 Gruppen weiblicher und männlicher Tiere wurde nochmals unterteilt. Die eine Hälfte der Mausgruppe wurde im Alter von 7-8 Wochen mit MLD-STZ behandelt, die andere Hälfte bildete die unbehandelte Kontrollgruppe (Abb. 6). Das Körpergewicht und die Blutglucosekonzentration wurden wöchentlich in allen Tieren über 12 Wochen, beginnend einen Tag vor der ersten STZ-Injektion, gemessen.



**Abbildung 5:** Züchtungsprotokoll einer F<sub>2</sub>-Generation von C57BL/6-Mäusen zur Produktion von Mausgruppen mit Se(+)-, Se(-)- und C-Futter



**Abbildung 6:** Behandlungsprotokoll der F<sub>2</sub>-Generation mit Se(+)-, S(-)- und C-Futter. Anschließend, im Alter von acht Wochen, Behandlung mit (+) und ohne (-) MLD-STZ.

### 3.3.1.3 Bestimmung der Blutglucosekonzentration

Einmal wöchentlich zwischen 9.00 und 11.00 Uhr wurde den Versuchstieren 20 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mit Hilfe einer Einmal-Kapillarpipette entnommen. Die Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt nicht nüchtern. Die Glucosekonzentration wurde enzymatisch über die Reaktion der Hexokinase in einem EPOS 5060 Autoanalysator bestimmt.

Als hyperglykämisch wurden die Mäuse diagnostiziert, die über einen Zeitraum von mindestens 3 Wochen in Folge Blutglucosewerte über 11,1 mmol/l aufwiesen.

### 3.3.2 Isolierung pankreatischer Inseln

Die Isolierung pankreatischer Inseln wurde nach der Methode von Gotoh et al. (1985) und Modifikation von Zimny et al. (1993) durchgeführt. Nach der schmerzlosen Tötung durch cervikale Dislokation wurde jeweils die Bauchhöhle der Maus geöffnet und der Ductus choledochus zwischen Gallenblase und Duodenum vom umgebenden Binde- und Fettgewebe freigelegt. Die Mündungsstelle des D. choledochus in den Dünndarm wurde mit einer Gefäßklemme abgeklemmt. Unter einem Binokular-Mikroskop wurden 2 ml einer frisch angesetzten 4°C kalten Kollagenaselösung mit einer 2 ml Spritze und einer 30 G1/2 Kanüle in den D. choledochus injiziert und über den D. pancreaticus in das Pankreas geleitet.

Das aufgeblähte Pankreas wurde vom umliegenden Gewebe freipräpariert, in eine Petrischale überführt und für 22 min bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> zur Digestion des exokrinen Gewebes inkubiert. Nach der Inkubation wurde durch Zugabe von 10 ml einer kalten HBSS-Lösung die enzymatische Aktivität der Kollagenase unterbrochen. Das angedaute Pankreasgewebe wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und durch kurzes Schütteln mechanisch zerkleinert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation für 10-15 s bei 320 g in einer Beckmann-Kühlzentrifuge wurde der Überstand mit exokrinem Gewebe verworfen und das Sediment mit den angereicherten Inseln in 10 ml HBSS-Medium resuspendiert und ein zweites Mal bei 320 g zentrifugiert, um weitere exokrine Bestandteile zu entfernen.

Das Sediment wurde nach dem Waschprozess in 5 ml RPMI 1640-Medium aufgenommen und zu gleichen Volumina vorsichtig auf je 5 ml Ficoll-Lymphocytentrennmedium mit einer Dichte von 1,077 g/l aufgeschichtet. Die Proben wurden für 20 min bei 4°C und 800 g ungebremst zentrifugiert.

Mit Hilfe einer sterilen Pipette wurden die Inseln, die sich nach der Zentrifugation zwischen der Ficoll-Lösung und dem HBSS-Medium angereichert hatten, handverlesen und in eine mit HBSS gefüllte Petrischale überführt. Die von exokrinem Gewebe befreiten Inseln wurden per Hand zweimal in jeweils neue, mit HBSS gefüllte Petrischalen transferiert, um Kontaminationen mit restlichen exokrinen Fragmenten zu reduzieren. Anschließend wurden die Inseln gezählt und in eine Petrischale mit 2 ml RPMI 1640-Kulturmedium übertragen und dann bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.3.3 In-vitro-Behandlung pankreatischer Inseln mit STZ und Zn<sup>2+</sup> Sulphat (ZnSO<sub>4</sub>)

Um den Effekt von STZ auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in pankreatischen Inseln zu überprüfen, wurden isolierte Inseln für 2 h bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Gruppen von jeweils 150 Inseln wurden in Gewebekulturplatten mit 2.700 µl KRBB überführt. Die Inselkulturen wurden mit 270 µl einer STZ-Lösung versetzt, um die Endkonzentrationen von 1, 3, 6 oder 10 mmol/l zu erhalten. Anschließend wurden sie für 30 min inkubiert (37°C; 5,5% CO<sub>2</sub>). Eine Gruppe von Inseln wurde mit 270 µl Lösungsmittel von STZ behandelt und diente als Kontrolle. Nach Ende der Inkubation wurde der Überstand abpipettiert, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für die Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen aufgearbeitet. Die Untersuchungen zum Effekt von STZ auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in isolierten Inseln wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt: 1) direkt nach der Isolierung, 2) nach 24-stündiger Inkubation in RPMI und 3) nach 72-stündiger Inkubation in RPMI.

Um den Effekt einer ZnSO<sub>4</sub>-Behandlung auf die STZ-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung zu untersuchen, wurden die Inseln nach der Isolierung in Gruppen von je 300 Inseln unterteilt und entweder in 0,1 mmol/l ZnSO<sub>4</sub>, gelöst in RPMI, oder in RPMI 1640 inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden diese Kulturen erneut in 2 Gruppen von jeweils 150 Inseln aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde mit 6 mmol/l STZ für 30 min behandelt, die andere diente als Kontrolle und wurde mit NaCit, dem Lösungsmittel von STZ, behandelt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Überstände abpipettiert, in Falcon-Röhrchen überführt und für die Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen aufgearbeitet.

Um zu untersuchen, welcher der beiden Untereinheiten des STZ-Moleküls für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung verantwortlich ist, wurden zu einer Inselgruppen von je 150 Inseln mit 1, 6, 10 oder 20 mmol/l MNU, und zum anderen mit 1, 3, 6, 10 oder 20 mmol/l D-G behandelt. Beide Komponenten wurden in NaCit gelöst. Nach der Inkubation für 30 min wurden die Überstände für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bestimmung aufgearbeitet.

Um die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Behandlung mit ALX zu überprüfen, wurden Gruppen von 150 Inseln mit 0,5, 1,0, 2,0 und 4,0 mmol/l ALX, gelöst in NaCit, behandelt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Überstände für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bestimmung aufgearbeitet.

### 3.3.4 Bestimmung von Wasserstoffperoxid

In Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) wird das fluoreszierende Scopoletin durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert und verliert dadurch seine Fluoreszenz (Root et al., 1975; Clifford und Repine, 1984). Der Überstand jeder zu bestimmenden Probe wurde mit 20  $\mu\text{l}$  Scopoletin (20  $\mu\text{mol/ml}$ ) versetzt. Es folgte die Messung der basalen Fluoreszenz bei 460 nm mit Anregung bei 350 nm. Anschließend wurde den Proben 10  $\mu\text{l}$  HRP (150 U/ml) zugesetzt und es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Perkin-Elmer LS-5-Luminescence Spectrometer. Sowohl die Emissions- als auch die Spaltbreite waren bei den Messungen minimal. Die ermittelten Werte wurden anhand einer Standardkurve in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen umgerechnet. Um die Spezifität der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bestimmung und die Generierung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus  $\text{O}_2\cdot^-$  zu zeigen, wurde den Proben zusätzlich zu 20  $\mu\text{l}$  der Scopoletin-Lösung 30  $\mu\text{l}$  einer CAT-Lösung (1.000 U/ml), einer SOD-Lösung (250 U/ml) oder beide Lösungen zusammen, hinzugegeben.

### 3.3.5 In-vitro- $\beta$ -Zellfunktionstest

Die  $\beta$ -Zellfunktion wurde wie beschreiben untersucht (Wang und Gleichmann, 1998; Gai et al., 2004). Hierzu wurden Kulturen von jeweils 10 Inseln nach Isolierung und Vorinkubation für 24 oder 72 h in vorgewärmtem KRB-Puffer gewaschen und in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte (Falcon-Gewebekulturplatte, 24 Vertiefungen) übertragen, in der sich 230  $\mu\text{l}$  KRB befanden. Den Kulturen wurden 20  $\mu\text{l}$  einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung mit Endkonzentrationen von 2,5, 5, 10, 30, 50 oder 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt. Als Kontrolle wurden Inseln mit 20  $\mu\text{l}$  der KRB-Pufferlösung behandelt. In einer weiteren Gewebekulturplatte wurde den Kulturen von je 10 Inseln 20  $\mu\text{l}$  einer STZ-Lösung mit Endkonzentrationen von 1, 3, 6 oder 10 mmol/l STZ zugesetzt. Die Kontrollen wurden mit 20  $\mu\text{l}$  NaCit behandelt. Alle Inselkulturen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Inseln wurden bei 37°C und 5,5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Inkubation wurde nach 30 min durch Zugabe von kaltem KRB beendet. Die verschiedenen Inselkulturen wurden nacheinander der Kulturplatte entnommen, in KRB gewaschen und in eine neue Gewebekulturplatte übertragen, in die zuvor 500  $\mu\text{l}$  KRB je Vertiefung pipettiert wurden.

Die Inseln wurden nun für 60 min bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um die basale Insulinfreisetzung zu bestimmen. Anschließend wurden die Inseln in eine weitere Vertiefung der Kulturplatte mit je 480 µl KRB je Vertiefung überführt. Zu jeder Kultur wurden 20 µl D-G-Lösung mit einer Endkonzentration von 16,7 mmol/l zugesetzt, um die D-G-stimulierte Insulinfreisetzung zu bestimmen. Die D-G-stimulierten Kulturen wurden für 60 min bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrokulturen in je eine Kulturschale mit 2 ml RPMI 1640-Kulturmedium überführt. Der Überstand der basalen und D-G-stimulierten Kulturen wurde abpipettiert und bis zur Bestimmung der Insulinkonzentration bei -20°C eingefroren. Als Grad der D-G-stimulierten Insulinfreisetzung wurde der Stimulationsindex als Quotient der D-G-stimulierten geteilt durch die basale Insulinfreisetzung berechnet.

### 3.3.6 Bestimmung von Insulin

Die Bestimmung von Insulin erfolgte über die Messung von immunreaktivem Insulin (IRI) entweder mittels eines Radioimmunoassays (RIA) (Heding, 1972), oder mittels eines ELISA. Für den RIA wurde ein Doppel-Antikörper-Assay (Insulin RIA 100, Pharmacia Upjohn, Freiburg) verwendet. Es wird radioaktiv-markiertes <sup>125</sup>J-Insulin und ein aus Meerschweinchenseren hergestellter Antikörper (AK1), der spezifisch an Insulin bindet, zu jeder Probe hinzugegeben. Das radioaktiv-markierte Insulin und das freie Insulin der Probe konkurrieren nun um die Bindungsstelle von AK1. Je mehr freies Insulin in der Probe vorhanden ist, desto weniger <sup>125</sup>J-Insulin wird vom AK1 gebunden und *vice versa*. Durch die Zugabe des zweiten Antikörpers (AK2), einem Schaf-anti-Meerschweinchen-IgG, werden alle AK1-Insulin und AK1-<sup>125</sup>J-Insulin-Komplexe gebunden. Der daraus entstehende Komplex mit hohem Molekulargewicht bleibt bei der darauffolgenden Zentrifugation in einer Kontron TGA Zentrifuge als Sediment im Reagierröhrchen zurück. Nach Abgießen des Überstandes wird die Radioaktivität des Sediments, d.h die Konzentration des <sup>125</sup>J-Insulins, gemessen. Diese Konzentration ist umgekehrt proportional zur freien Insulinkonzentration der Probe.

Im Folgenden sind die einzelnen durchgeführten Arbeitsschritte aufgelistet:

1. 100  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe, bzw. 100  $\mu\text{l}$  einer Insulin-Standardlösung, die 0, 3, 10, 30, 100 oder 240  $\mu\text{U/ml}$  Insulin enthielt, wurden in ein Reagierröhrchen (3,5 ml) pipettiert.
2. In jedes Röhrchen wurden 50  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{J}$ -Insulin hinzugegeben.
3. Dazu wurden in jedes Teströhrchen 50  $\mu\text{l}$  des AK1 hinzugegeben.
4. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch für 2 Stunden inkubiert.
5. Nach der Inkubation wurden 2 ml einer Dekantiersubstanz mit AK2 in jedes Teströhrchen pipettiert.
6. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.
7. Bei 1.500 g wurde für 10 min zentrifugiert.
8. Der Überstand wurde danach abgegossen.
9. Es folgte die Messung der im Sediment enthaltenen Radioaktivität, dem Komplex aus  $^{125}\text{J}$ -AK1-AK2 und die anschließende Berechnung.

Die Messung der Proben erfolgte jeweils als Doppelbestimmung, die Messung der Insulinstandardlösung als Dreifachbestimmung. Anhand der elektronisch erstellten Standardkurve wurde die Konzentration des freien Insulins abgelesen. Die Angabe erfolgte in U/ml; U ist bei dieser Messung eine dimensionslose Einheit, die in ng Insulin pro Stunde und Anzahl der eingesetzten Inseln umgerechnet wurde.

Zur Insulinbestimmung mit einem ELISA wurde der Maus-Insulin-ELISA (Merodia AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Es handelt sich dabei um einen Zwei-Phasen-Immunoassay, der auf der direkten Sandwich-Methode basiert. Ein anti-Insulin-AK ist bereits an den Boden der Mikroplatte gebunden. Standardlösungen von 25  $\mu\text{l}$ , welche entweder 0, 0,28, 0,67, 1,6, 3,9 oder 6,8  $\mu\text{g/l}$  Insulin enthalten, oder 25  $\mu\text{l}$  der Testprobe werden in die Platte pipettiert. Danach werden 50  $\mu\text{l}$  einer Konjugat-Lösung (Peroxidase-konjugierter monoklonaler Maus anti-Insulin-AK) hinzugegeben. Anschließend werden 200  $\mu\text{l}$  einer Peroxidase-Lösung hinzupipettiert und für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Säure beendet. Die Mikroplatte wurde für 5 s auf einem Schüttler bewegt. Dies führt zu einem Farbumschlag in den Proben, der von der Insulinkonzentration abhängt. Anschließend werden die Proben spektrometrisch

bei 450 nm gemessen. Die Absorptionswerte des Insulinstandards werden auf log-Papier aufgetragen. Die IRI-Konzentration der Probe wird von der Standardkurve abgelesen. Die Angaben erfolgen in U/ml und werden anschließend in ng Insulin pro Stunde und Anzahl der eingesetzten Inseln umgerechnet.

### 3.3.7 Messung der enzymatischen Aktivität von GPX

Die Methode von Paglia und Valentine (1967) wurde zur Messung der GPX-Aktivität angewandt und modifiziert. Es wurden Gruppen von je 300 Inseln (siehe 3.3.1. und 3.3.3) in 1 ml kaltem Tris-EDTA-Puffer für 3 x 10 s mittels Ultraschall homogenisiert und anschließend für 15 min bei 4°C und bei 10.000 g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 450 µl entweder direkt für die GPX-Aktivitätsbestimmung verwendet oder bei -80°C bis zur Messung eingefroren. Weitere 450 µl des Überstandes wurden für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C tiefgefroren.

Die Messung der GPX-Aktivität erfolgte bei 23-25°C. Dazu wurden in eine Quarzküvette 350 µl des Tris-EDTA-Puffers, bestehend aus 1 mmol/l GSH, 0,6 U/ml GSH-Reduktase, 350 µl eines 0,2 mmol/l NADPH-Reagenzes sowie 350 µl einer 0,22 mmol/l tert.-Butylhydroperoxid-Lösung pipettiert. Die aufgeführten Konzentrationen sind in Endkonzentrationen angegeben. Die Aktivitätsbestimmung wurde durch die Zugabe von entweder 70 µl der Standardkonzentrationen von 0, 5, 10, 20 und 40 mU/ml oder 70 µl der Testproben gestartet. Die Absorption wurde für 3 min bei 340 nm gemessen, die Erfassung der Werte erfolgte alle 10 s.

Um die GPX-Aktivität zu ermitteln, wurde die Differenz der Absorption ( $A_{340}/\text{min}$ ) von NADPH zwischen 60 und 120 s verwendet. Die Werte  $A_{340}/\text{min}$  der unbekanntenen Proben werden in den NADPH-Verbrauch (mU/ml) konvertiert. Dabei gilt folgende Beziehung:

$$1 \text{ mU/ml} = 1 \text{ nmol NADPH/min/ml} = (A_{340}/\text{min})/0,00622$$

(0,00622 = Extinktionskoeffizient von NADPH in µmol/cm)

Die Angaben der enzymatischen Aktivitäten erfolgten in mU/ng Protein, nachdem die ermittelte Proteinkonzentration (siehe 3.3.8) je Probe mit einberechnet wurde.

### 3.3.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), bei der eine Protein-Farbstoff-Bindung entsteht. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 konvertiert nach der Bindung an ein Protein von Rot nach Blau. Durch diesen Protein-Farbstoffkomplex wird das Absorptionsmaximum des Farbreagenzes von 465 nm zu 595 nm verschoben. Mit Hilfe eines Photometers wird der Anstieg der Absorption bei 595 nm gemessen.

Für die Bestimmung des Gesamtproteins wurden 30 µl des tiefgefrorenen Homogenats (siehe 3.3.7) eingesetzt. Anhand einer angesetzten Standardreihe von 0, 0,1, 0,15, 0,25, 1,5, 0,75, 1,0 und 1,5 mg/ml BSA wurde die Proteinkonzentration abgelesen. Zur Erstellung der Eichkurve wurde in Tris-Puffer gelöstes BSA eingesetzt. Die Messung der Standardkonzentrationen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 800 µl in Doppelbestimmung. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben wurden 150 µl Probenüberstand mit 650 µl Tris-EDTA-Puffer vermischt. Anschließend wurde den Proben und der Standardreihe 200 µl des 1:5 verdünnten Farbreagenzkontrats zugesetzt. Nachdem die Proben mit Hilfe eines Schüttlers durchgemischt wurden, erfolgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur und anschließend die photometrische Bestimmung bei 595 nm. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte mit 800 µl Tris-Puffer.

Die Konzentration des Proteins wurde anhand der erstellten Standardkurve abgelesen und in µg Protein/ml angezeigt. Dieser Wert wurde in ng Protein/Inseln umgerechnet.

### 3.3.9 Histologische Untersuchungen

Zur Beurteilung einer Insulitis wurde den Mäusen am Tag 12 nach der letzten MLD-STZ-Injektion nach cervikaler Dislokation das Pankreas entnommen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse. Die Fixierung erfolgte nach der Bouin'schen Methode (Romeis, 1968). Nach der Autopsie wurde das Pankreas direkt in Bouin'sches Gemisch überführt. Nach 24 h wurde das Pankreas über eine aufsteigende Alkoholreihe in Methylbenzoat überführt und nach weiteren 24 h aus dem Methylbenzoat in weiches Paraffin gegeben. Nach 24 h wurde das Präparat in hartes Paraffin überführt und nach weiteren 24 h folgte das

Aufblocken mit Hilfe eines Aufblockgerätes. Die eingebetteten Pankreata wurden bis zum Erstellen von Semidünnschnitten im Kühlschrank aufbewahrt. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden Serienschnitte von 5 µm Dicke in 50 µm Abstand geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Die Färbung der Semidünnschnitte erfolgte mittels der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Nachdem die Schnitte codiert wurden, erfolgte die Beurteilung der Inseln nach dem Grad der Insulitis, unabhängig durch zwei Experimentatoren. Der Grad der intra-insulären Infiltrate wurde wie folgt eingeteilt: 0 = keine Infiltration; 1+ = milde Infiltration (  $\leq$  30% der Inselzellen bestehen aus mononukleären Zellen); 2+ = moderate Infiltration (> 30 bis  $\leq$  75% der Inselzellen bestehen aus mononukleären Zellen); 3+ = schwere Infiltration (> 75% der Inselzellen bestehen aus mononukleären Zellen). Perivaskuläre oder periductale Stellen am Inselpol wurden auf die Anwesenheit von Infiltraten untersucht.

### **3.3.10 Statistische Analysen**

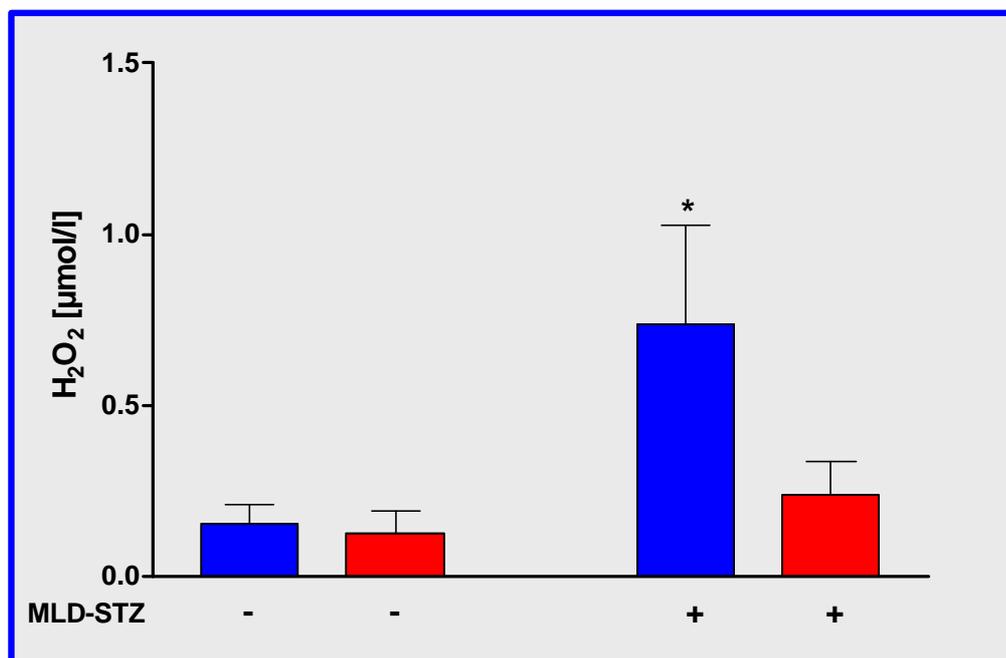
Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde innerhalb jeder einzelnen Gruppe der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) sowie die Standardabweichung (SEM) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test bestimmt. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ex-vivo-Befunde

#### 4.1.1 MLD-STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nur in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse

Um die Ex-vivo-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts zu untersuchen, wurden die Mäuse mit MLD-STZ behandelt. Die Inseln wurden am Tag 3 nach der letzten Injektion mit MLD-STZ oder dem Lösungsmittel als Kontrolle isoliert. Wie in Abbildung 7 gezeigt, stimuliert MLD-STZ in männlichen Empfängern signifikant die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung (\*p < 0,05) auf  $x = 0,97 \pm 0,36$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verglichen mit  $x = 0,16 \pm 0,06$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Kontrollen. In den Inseln weiblicher Mäuse war der Unterschied der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung nach der Injektion mit MLD-STZ mit  $x = 0,25 \pm 0,07$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Lösungsmittel mit  $x = 0,11 \pm 0,04$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht signifikant.

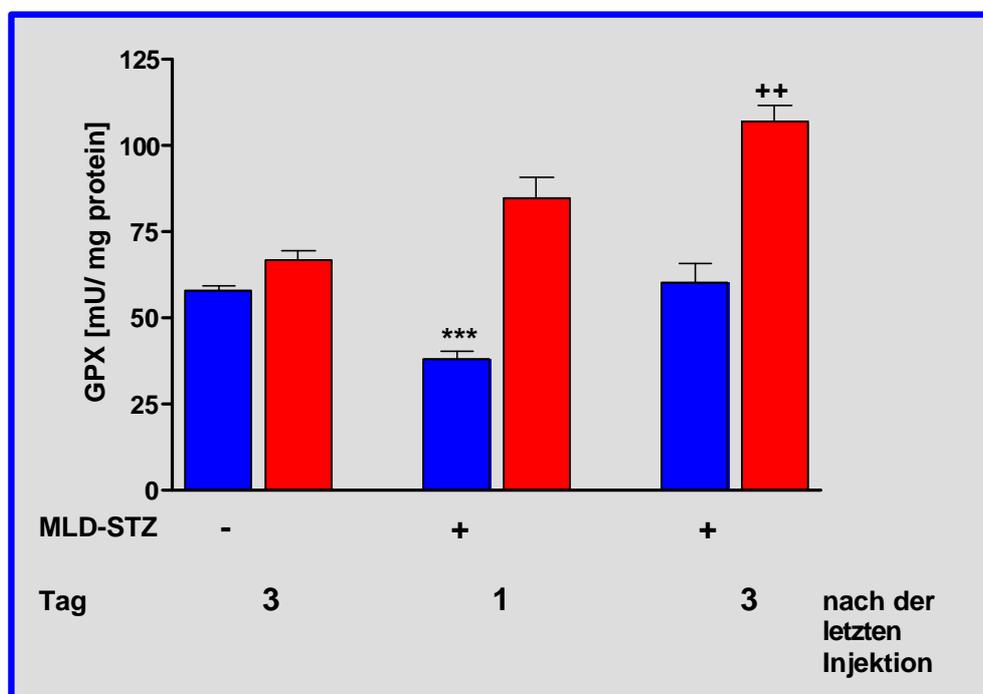


**Abbildung 7:** MLD-STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse. Ex-vivo-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Inseln männlicher (■) und weiblicher (■) Mäuse. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ oder mit dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Die Inseln wurden am dritten Tag nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05 vs Kontrollgruppe.

#### 4.1.2 MLD-STZ reduziert die GPX-Aktivität in Inseln männlicher, stimuliert sie dagegen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse

In Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts wurde ex vivo die Aktivität des antioxidativen Enzyms GPX gemessen. Die Bestimmungen erfolgten am Tag 1 und Tag 3 nach der letzten Injektion mit MLD-STZ oder dem Lösungsmittel als Kontrolle. In männlichen Mäusen löste MLD-STZ am Tag 1 nach der letzten Injektion eine signifikant ( $***p < 0,001$ ) verminderte Aktivität mit  $x = 38,15 \pm 2,43$  SEM mU/mg Protein im Vergleich zu den Kontrollen mit  $x = 57,97 \pm 1,2$  SEM mU/mg Protein aus (Abb. 8). Am Tag 3 nach der letzten MLD-STZ-Injektion entsprach die GPX-Aktivität mit  $x = 60,18 \pm 5,67$  SEM mU/mg Protein den Werten in Kontrollmäusen.

Im Gegensatz dazu stimulierte MLD-STZ in weiblichen Mäusen die GPX-Aktivität am Tag 3 nach der letzten Injektion signifikant ( $^{**}p < 0,01$ ) auf  $x = 107,29 \pm 4,51$  SEM mU/mg Protein, verglichen mit  $x = 66,87 \pm 2,97$  SEM mU/mg Protein in den Kontrollen. Der Anstieg am Tag 1 nach MLD-STZ mit  $x = 84,94 \pm 5,97$  SEM mU/mg Protein unterschied sich nicht signifikant von den Werten in Kontrollmäusen.



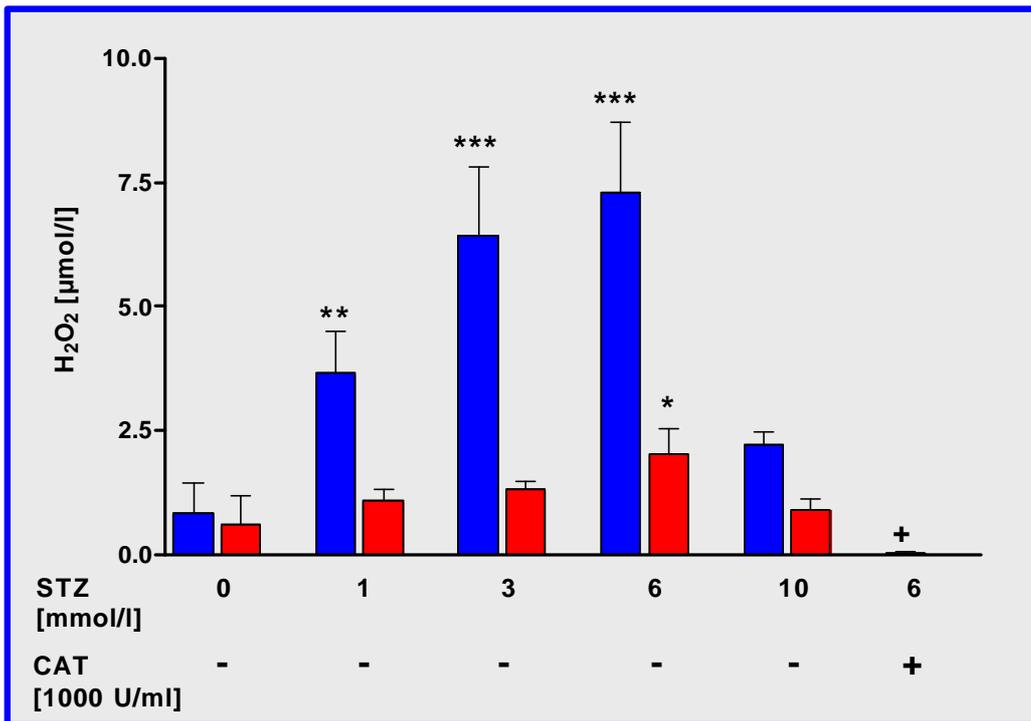
**Abbildung 8:** MLD-STZ reduziert die GPX-Aktivität in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse und stimuliert sie in Inseln weiblicher Mäuse. GPX-Aktivitäten in isolierten Inseln von männlichen (■) und weiblichen (■) C57BL/6-Mäusen nach MLD-STZ-Behandlung. Die Daten sind  $x \pm$  SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.  $***p < 0,001$ ;  $^{**}p < 0,01$  vs entsprechender, mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen.

## 4.2 In-vitro-Befunde

### 4.2.1 STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher C57BL/6 Mäuse

Um die In-vitro-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts zu untersuchen, wurden die isolierten Inseln mit verschiedenen STZ-Konzentrationen inkubiert. Die Behandlung mit STZ erfolgte am Tag der Isolierung. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden in Inseln männlicher Mäuse nach Behandlung mit 1 mmol/l STZ  $x = 3,65 \pm 0,82$  S SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert und mit 3 mmol/l STZ  $x = 6,42 \pm 1,38$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  gemessen. Die stärkste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung wurde nach der Inkubation mit 6 mmol/l STZ gemessen mit  $x = 7,31 \pm 1,41$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ . Die gewählten Konzentrationen von 1, 3 und 6 mmol/l STZ zeigten im Vergleich zu den Lösungsmittel-inkubierten Inselgruppen mit  $x = 0,83 \pm 0,61$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante und dosisabhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 10 mmol/l STZ führte zu einer Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ( $x = 2,21 \pm 0,24$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), verglichen mit den Werten nach Inkubation mit 1, 3 und 6 mmol/l STZ.

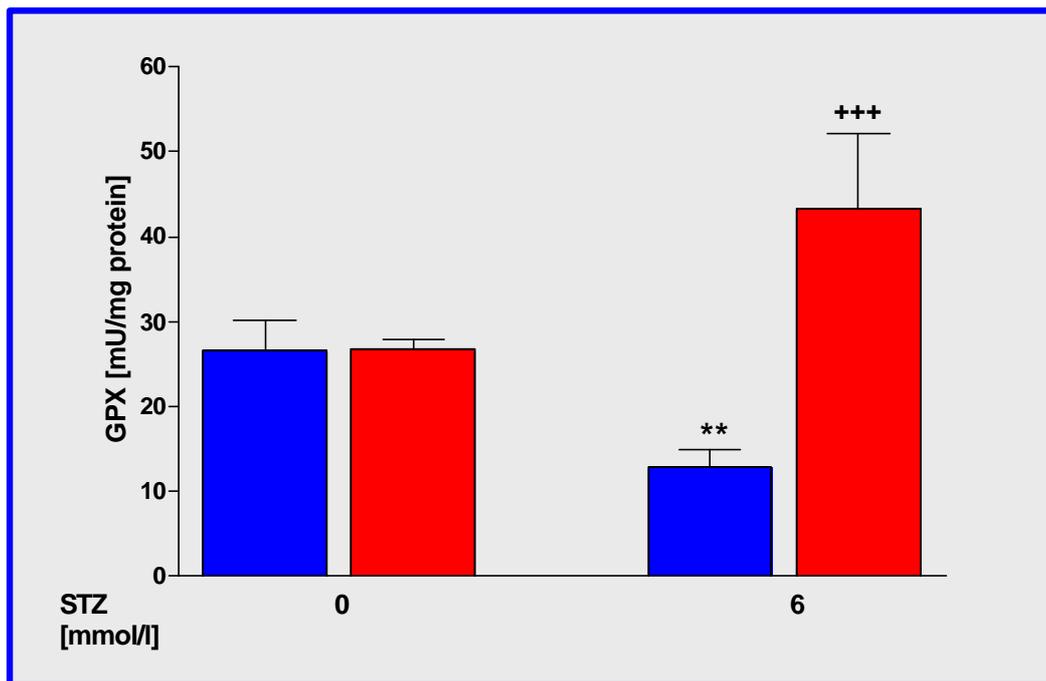
In den Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse hingegen waren die Werte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Allgemeinen, verglichen mit den Werten in Inseln männlicher Mäuse, niedriger. Eine Behandlung mit 1 mmol/l STZ stimulierte die Bildung von  $x = 1,08 \pm 0,22$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mit 3 mmol/l STZ von  $x = 1,31 \pm 0,16$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ , mit 6 mmol/l STZ von  $x = 2,0 \pm 0,51$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  und mit 10 mmol/l STZ  $x = 0,88 \pm 0,24$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ . Im Vergleich zu den Kontrollgruppen, in denen das Lösungsmittel von STZ eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung von  $x = 0,6 \pm 0,6$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  auslöste, stimulierte nur die Inkubation mit 6 mmol/l STZ eine signifikante (\*p < 0,05) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung. Um die Spezifität der Scopoletin-Methode für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu zeigen, wurden die Überstände der mit 6 mmol/l STZ behandelten Inselgruppen männlicher Mäuse zusätzlich mit CAT behandelt. In Abbildung 9 ist eine signifikante (\*p < 0,05) Hemmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung im Überstand nach Zugabe von CAT (0,03  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) im Vergleich zu den Proben, die mit 6 mmol/l STZ behandelt wurden, dargestellt.



**Abbildung 9:** STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse in vitro. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in isolierten Inseln von männlichen (■) und weiblichen (■) Mäusen. Die Zugabe von CAT hemmt die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung. Die Daten sind  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  aus 9 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen; \* $p < 0,05$  vs mit 6 mmol/l STZ-behandelter Kultur.

#### 4.2.2 STZ reduziert die GPX-Aktivität in isolierten Inseln männlicher, steigert sie dagegen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse

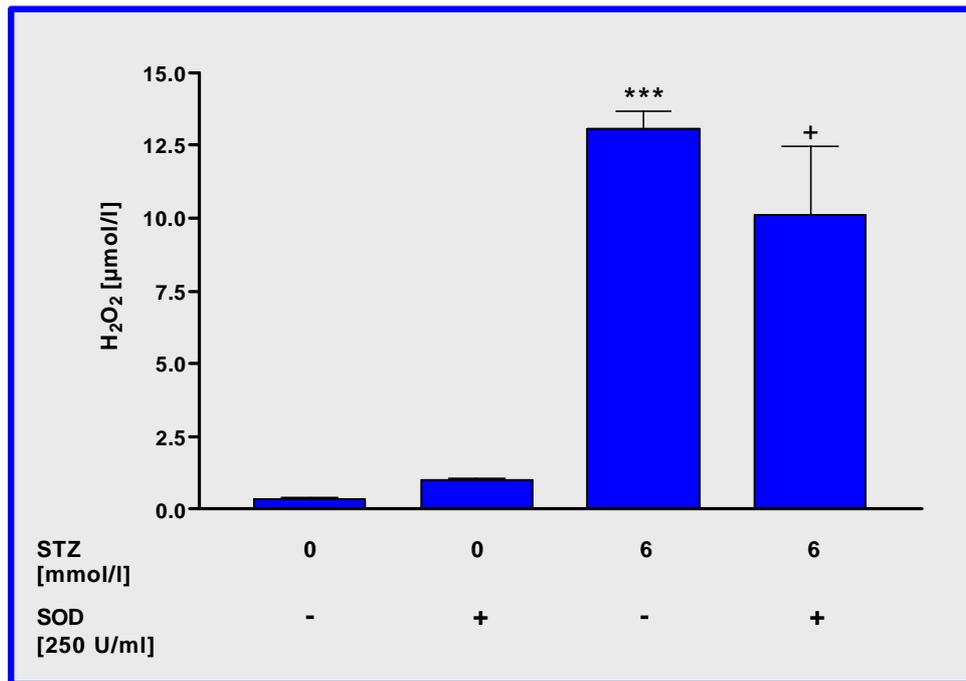
Wie in Abbildung 10 dargestellt, senkte die In-vitro-Behandlung isolierter Inseln männlicher Mäuse mit 6 mmol/l STZ signifikant (\*\* $p < 0,01$ ) die GPX-Aktivität um mehr als 50%. Sie hatte in Inseln männlicher Mäuse, die mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, eine Aktivität von  $\bar{x} = 26,55 \pm 3,6 \text{ SEM mU/mg Protein}$ , nach STZ-Behandlung jedoch nur  $\bar{x} = 12,79 \pm 2,1 \text{ SEM mU/mg Protein}$ . Im Gegensatz dazu löste die Behandlung mit 6 mmol/l STZ in Inseln weiblicher Mäuse eine signifikante (\*\*\*) Steigerung der GPX-Aktivität von  $\bar{x} = 26,84 \pm 1,03 \text{ SEM mU/mg Protein}$  in Kontrollkulturen auf  $\bar{x} = 43,4 \pm 8,78 \text{ SEM mU/mg Protein}$  aus.



**Abbildung 10:** STZ reduziert die GPX-Aktivität in isolierten Inseln männlicher (■) C57BL/6-Mäuse, steigert sie dagegen in Inseln weiblicher (■) Mäuse. Die Daten sind  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  aus 4 unabhängigen Experimenten. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen.

#### 4.2.3 SOD verändert nicht die STZ-stimulierte $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse

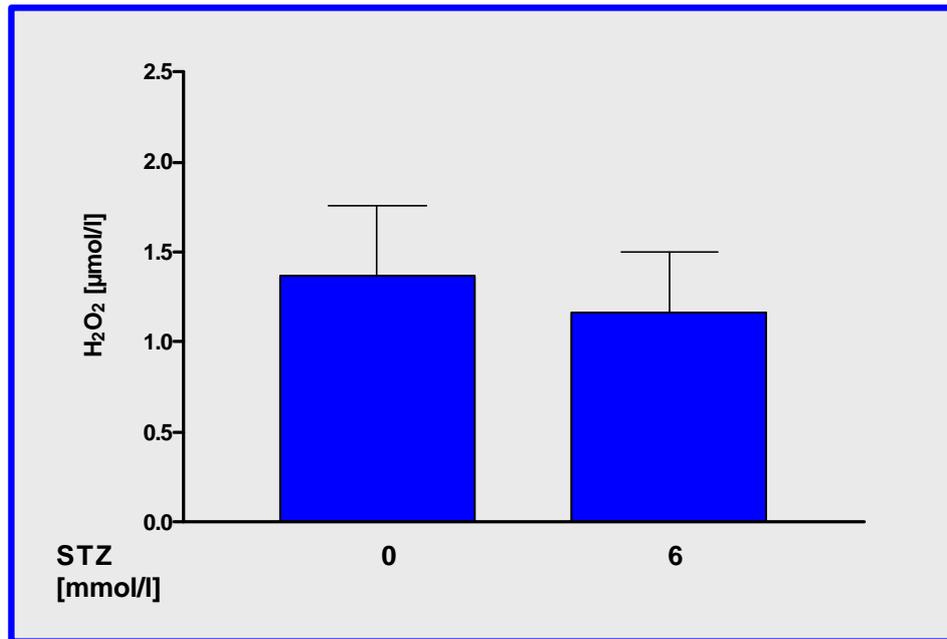
Dem Überstand von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse wurde nach Inkubation mit STZ das Enzym SOD hinzugegeben, um die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus  $\text{O}_2^-$  Bildung zu messen. Die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach Inkubation mit 6 mmol/l STZ wurde in vitro durch die Zugabe der SOD [250 U/ml] zum Überstand nicht gesteigert (Abb. 11). Inseln, die mit 6 mmol/l STZ inkubiert worden waren, zeigten - im Vergleich zu den Lösungsmittel-behandelten Inseln - wiederum eine signifikante (\*\* $p < 0,001$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung von  $\bar{x} = 13,05 \pm 0,64 \text{ SEM } \mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , vergleichbar mit den Werten nach Zugabe von SOD mit  $\bar{x} = 10,08 \pm 2,4 \text{ SEM } \mu\text{mol/l}$ .



**Abbildung 11:** SOD verändert nicht die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse. Die Daten sind  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  aus 4 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen.

#### 4.2.4 Nach Inkubation von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse mit STZ ist im homogenisierten Cytosol keine gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung nachweisbar

Um die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung direkt in der Inselzelle zu messen, wurden Inseln männlicher Mäuse nach der Inkubation mit STZ homogenisiert und zentrifugiert. Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte eine gesteigerte Generierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Cytosol von 150 pankreatischen Inseln männlicher Mäuse nach Inkubation mit 6 mmol/l STZ nicht nachgewiesen werden. Die Lösungsmittel-behandelten Inselgruppen zeigten die Bildung von  $\bar{x} = 1,43 \pm 0,2 \text{ SEM } \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2$ , nach Inkubation mit STZ von  $\bar{x} = 1,25 \pm 0,19 \text{ SEM } \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2$ .



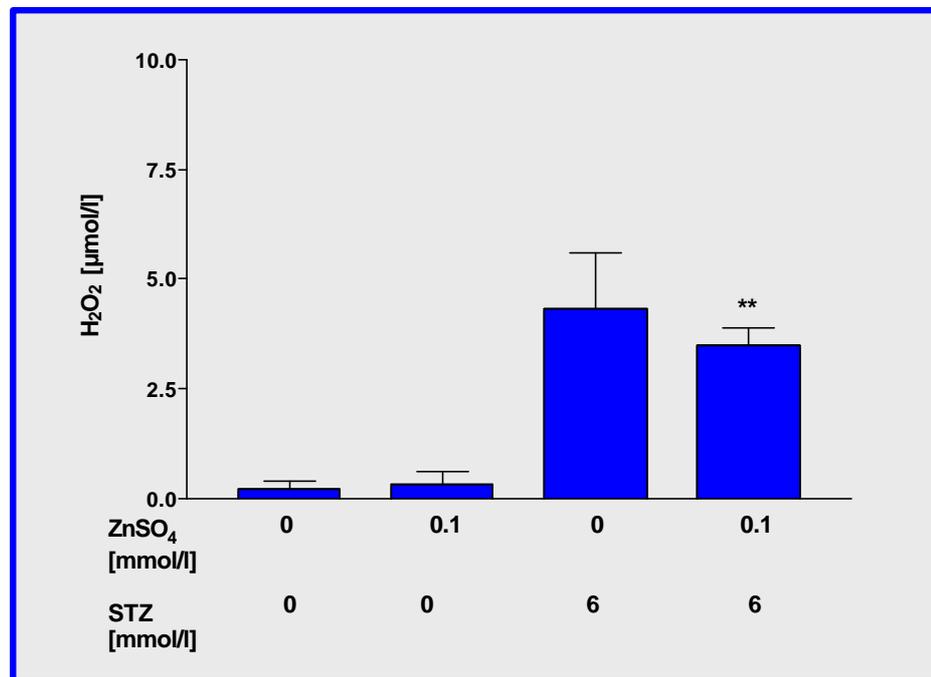
**Abbildung 12:** Nach Inkubation von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse mit STZ ist im homogenisierten Cytosol keine gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung nachweisbar. Die Daten sind  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.5 ZnSO<sub>4</sub> verändert nicht die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse

Die Behandlung mit ZnSO<sub>4</sub> induziert MT in pankreatischen Inseln und schützt vor einem MLD-STZ-Diabetes (Ohly et al., 2000). Es wird angenommen, dass das induzierte MT  $\beta$ -Zellen vor Schäden durch MLD-STZ-induzierte  $\cdot\text{OH}$  schützt. Es soll nun untersucht werden, ob eine Vorinkubation von isolierten Inseln bereits mit ZnSO<sub>4</sub> die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung als Vorläufer von  $\cdot\text{OH}$  vermindert.

Die Vorbehandlung der Inselkulturen für 24 h mit ZnSO<sub>4</sub> zeigte keinen Effekt auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch Inkubation mit 6 mmol/l STZ (Abb. 13). Kontrollgruppen, die entweder mit dem Lösungsmittel alleine oder zusätzlich mit ZnSO<sub>4</sub> behandelt wurden, zeigten vergleichbare Werte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ( $\bar{x} = 0,2 \pm 0,2$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  bzw.  $\bar{x} = 0,3 \pm 0,3$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ ). Wie erwartet, stimulierte die Inkubation mit 6 mmol/l STZ die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} = 4,3 \pm 1,3$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ ), die zusätzliche Behandlung mit ZnSO<sub>4</sub> führte zu einer signifikanten (\*\*p < 0,01)

Generierung von  $x = 3,8 \pm 0,4$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu den nur mit  $\text{ZnSO}_4$  behandelten Kulturen.



**Abbildung 13:**  $\text{ZnSO}_4$  verändert nicht die STZ-stimulierte In-vitro- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung in männlichen C57BL/6-Mäusen. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 4 unabhängigen Experimenten. \*\* $p < 0,01$  vs mit  $\text{ZnSO}_4$ -behandelten Kulturen.

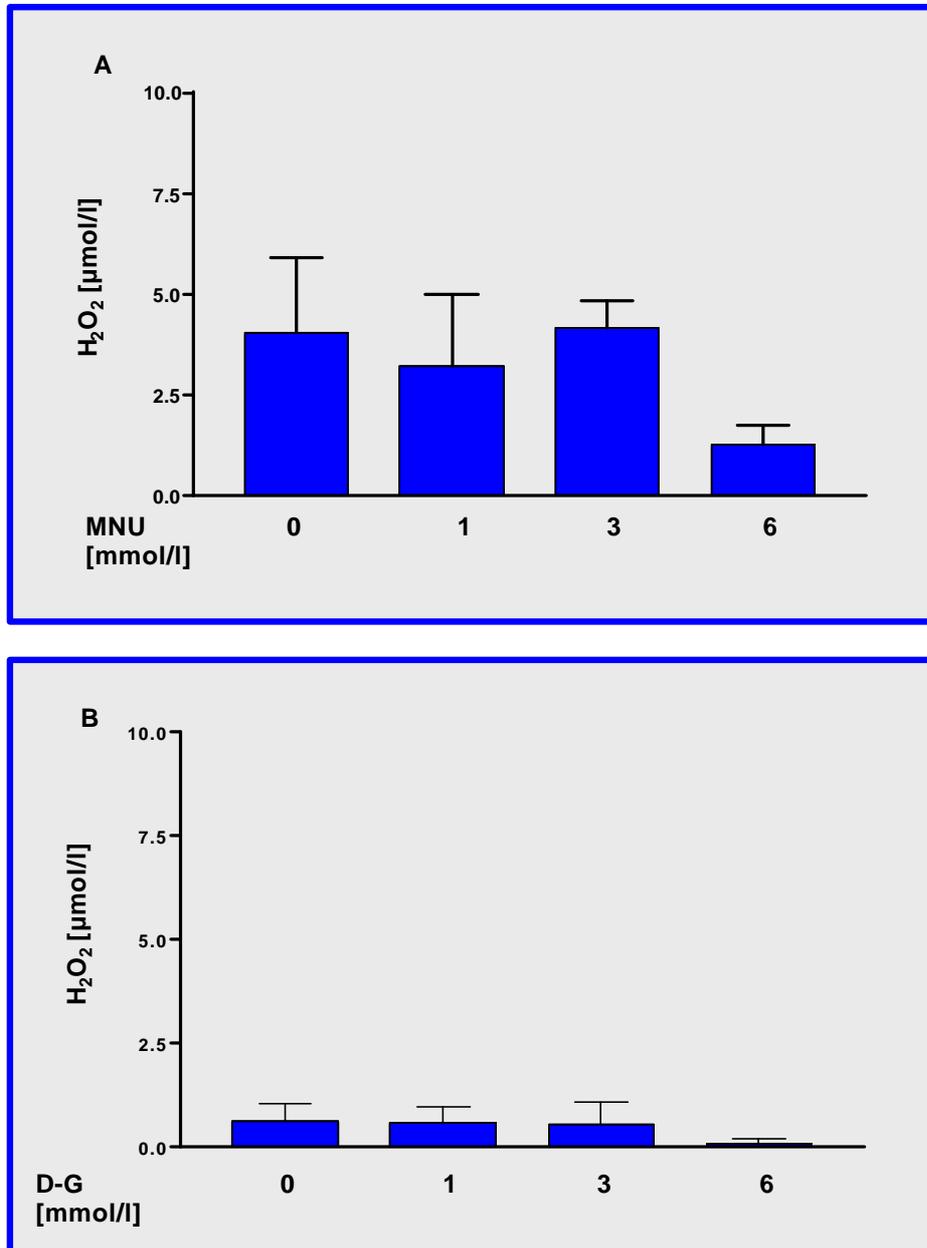
#### 4.2.6 Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) und D-Glucose (D-G) regen keine gesteigerte $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in isolierten pankreatischen Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse an

Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse wurden entweder mit MNU oder mit D-G inkubiert, um nachzuweisen, welche der beiden STZ-Einheiten an der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung beteiligt ist.

Abbildung 14A zeigt die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach In-vitro-Behandlung mit MNU, der toxischen Untereinheit des STZ-Moleküls. In den Kontrollinseln wurde die Bildung von  $x = 34,82 \pm 2,41$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen, nach Inkubation mit 1 mmol/l MNU von  $x = 33,21 \pm 1,78$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ , 3 mmol/l MNU von  $x = 4,03 \pm 0,91$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  und mit 6 mmol/l MNU von  $x = 1,58 \pm 0,51$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Auch nach Behandlung isolierter Inseln mit D-G, der zweiten Untereinheit des STZ-Moleküls, blieb eine gesteigerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung aus (Abb. 14B). In den Kon-

trollgruppen wurden  $x = 0,63 \pm 0,41$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet, nach Inkubation mit 1 mmol/l D-G  $x = 0,58 \pm 0,4$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , mit 3 mmol/l D-G  $x = 0,8 \pm 0,8$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 6 mmol/l D-G  $x = 0,05 \pm 0,05$  SEM  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

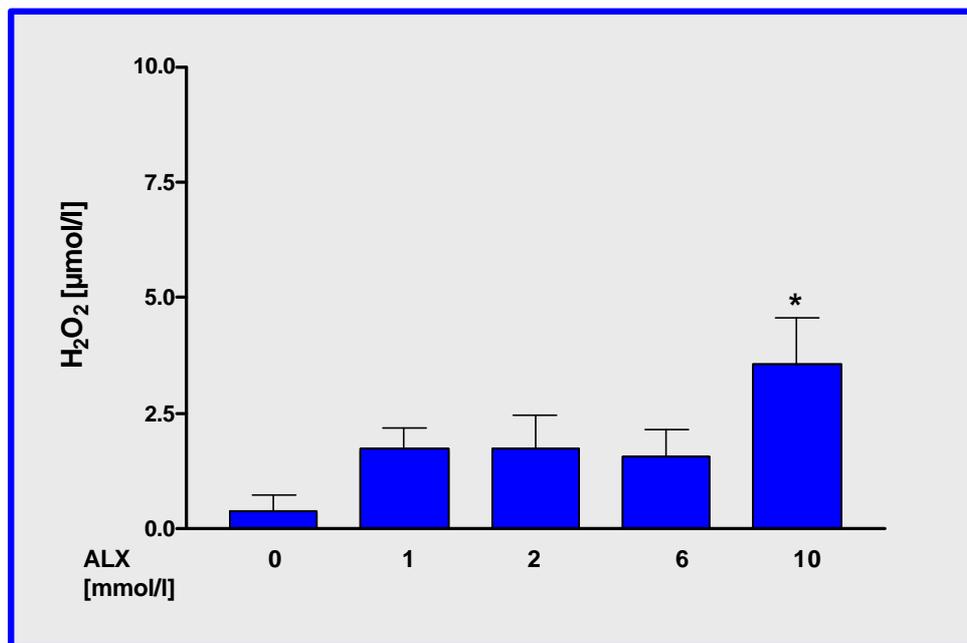


**Abbildung 14:** Weder MNU noch D-G bewirken eine gesteigerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in isolierten Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse in vitro. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus jeweils 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.7 Alloxan (ALX) stimuliert dosisabhängig die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse

Um die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung mit einem weiteren Diabetogen näher zu untersuchen, wurden Inseln männlicher Mäuse mit ALX inkubiert.

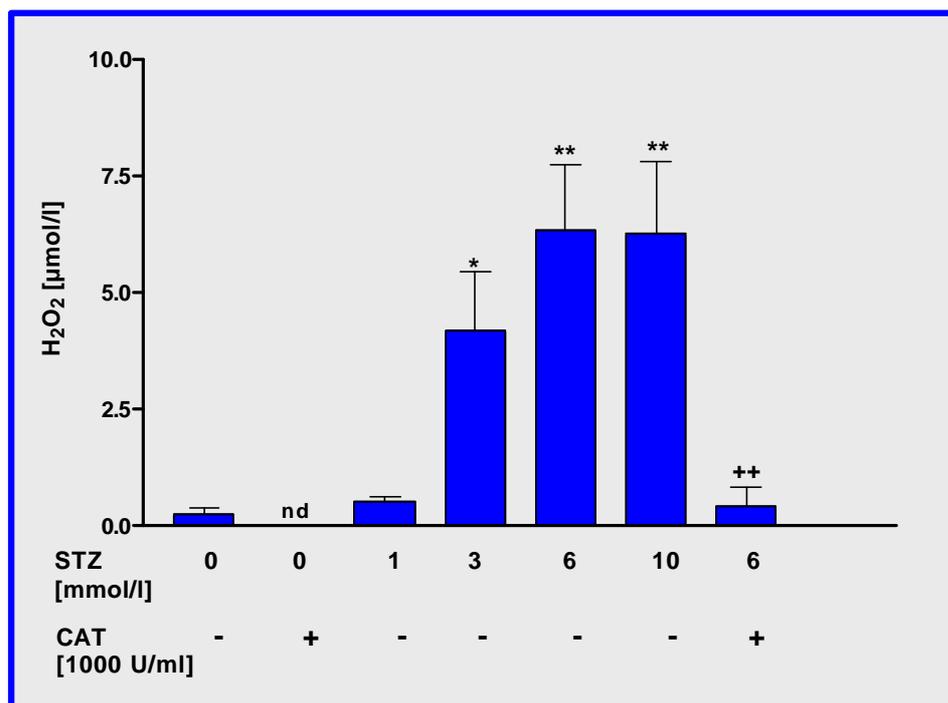
In den Kontrollgruppen zeigte sich eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung von  $x = 0,4 \pm 0,34$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  (Abb. 15). Nach Inkubation mit 1, 2 und 6 mmol/l ALX blieb eine signifikante Stimulierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung mit Werten von respektive  $x = 1,21 \pm 0,54$  SEM,  $x = 1,88 \pm 0,53$  SEM und  $x = 1,57 \pm 0,58$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus. Die Behandlung mit 10 mmol/l ALX dagegen führte zwar zu einer signifikanten ( $*p < 0,05$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung von  $x = 3,57 \pm 0,99$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diese hoch toxische Konzentration ist jedoch biologisch irrelevant.



**Abbildung 15:** ALX stimuliert dosisabhängig die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in vitro in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse. Die Daten sind  $x \pm$  SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.  $*p < 0,05$  vs mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen.

#### 4.2.8 STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher BALB/c-Mäuse

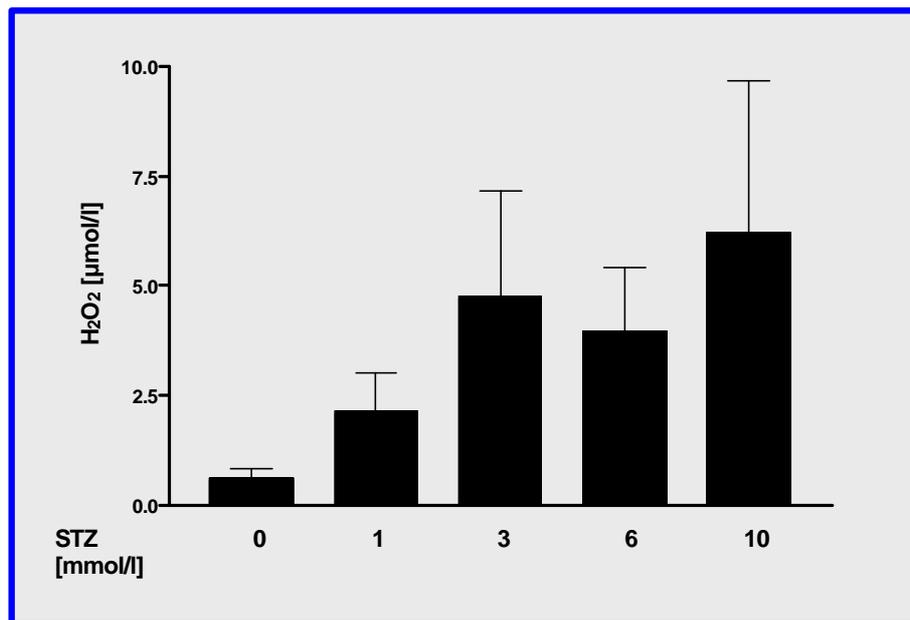
Die In-vitro-Behandlung von Inseln männlicher BALB/c-Mäuse, die weniger empfänglich für einen STZ-induzierten Diabetes sind als männliche C57BL/6-Mäuse, hat ebenfalls eine dosisabhängige Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert (Abb. 16). Die Werte der Kontrollgruppe betrug  $x = 0,22 \pm 0,16$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Behandlung mit 3 mmol/l STZ führte zu einer signifikanten (\*p < 0,05) Bildung von  $x = 4,16 \pm 1,2$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Auch durch die Behandlung mit 6 und 10 mmol/l STZ mit respektive  $x = 6,32 \pm 1,4$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  und  $x = 6,25 \pm 1,5$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signifikant (\*\*p < 0,01) stimuliert. Durch Zugabe von CAT konnte die basale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung ganz unterdrückt und die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung hingegen signifikant (\*\*p < 0,01) inhibiert werden.



**Abbildung 16:** STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln männlicher BALB/c-Mäuse. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 vs Lösungsmittel-behandelter Kontrollen; \*\*p < 0,01 vs STZ [6 mmol/l]-behandelter Kultur. nd = nicht detektierbar.

#### 4.2.9 STZ regt in zellfreiem Kulturmedium keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung an

In Abbildung 17 ist die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Inkubation mit verschiedenen STZ-Konzentrationen in zellfreiem KRB dargestellt, um autooxidative Prozesse auszuschließen. Basal wurden  $x = 0,6 \pm 0,25$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generiert. Minimal wurde nach Inkubation mit 1 mmol/l STZ die Bildung von  $x = 4,76 \pm 2,4$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert und maximal mit 10 mmol/l STZ von  $x = 6,21 \pm 3,46$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



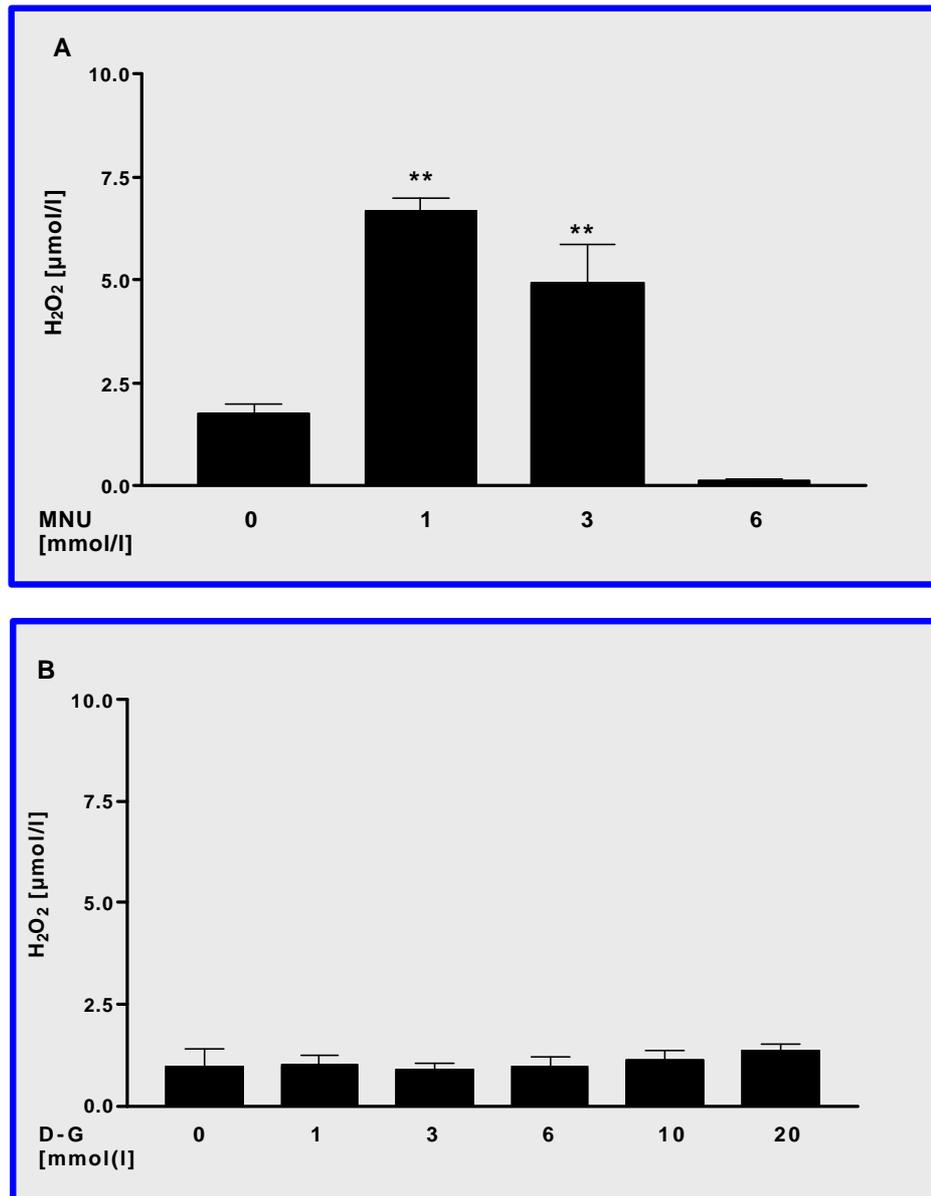
**Abbildung 17:** STZ regt in zellfreiem Kulturmedium keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung an. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.10 MNU und nicht D-G stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Kulturmedium

Um Autooxidationsprozesse der STZ-Untereinheiten zu untersuchen, wurden MNU und D-G dem Kulturmedium zugesetzt.

Wie in Abbildung 18A dargestellt, generierte die Inkubation mit dem Lösungsmittel von MNU die Bildung von  $x = 1,75 \pm 0,25$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Eine signifikante Steigerung (\*\* $p < 0,01$ ) wurde bei Konzentrationen von 1 mmol/l MNU und 3 mmol/l MNU mit respektive  $x = 6,7 \pm 0,27$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  und  $x = 4,93 \pm 0,94$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Hingegen führte die Inkubation mit 6 mmol/l MNU zu einer stark erniedrigten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung von  $x = 0,11 \pm 0,06$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

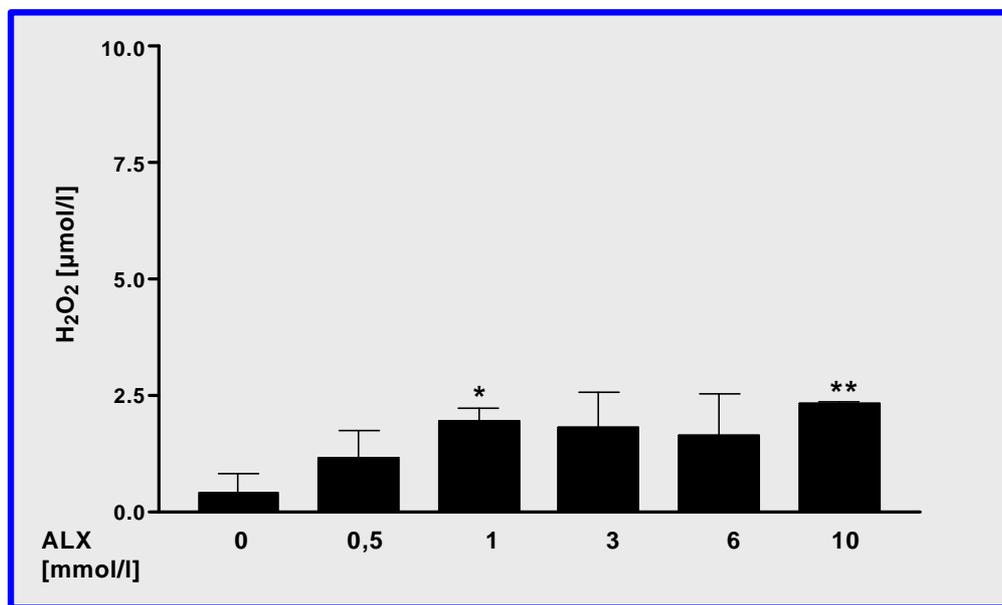
Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von D-G (Abb. 18B) führte nicht zu einer erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung. Inkubation mit dem Lösungsmittel von D-G führte zu einer Bildung von  $x = 0,98 \pm 0,42$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach Behandlung mit 1, 3, 6, 10 oder 20 mmol/l D-Glucose variierten die Werte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung konzentrationsunabhängig zwischen  $x = 0,89 \pm 0,14$  SEM und  $x = 1,34 \pm 0,17$  SEM  $\mu\text{mol/l}$ .



**Abbildung 18:** MNU (A) und nicht D-G (B) stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Kulturmedium. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten. \*\* $p < 0,01$  vs Lösungsmittel-behandelter Kontrollen.

#### 4.2.11 ALX stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in zellfreiem Kulturmedium

Wie in Abbildung 19 dargestellt, führte die Inkubation mit 0,5, 3, und 6 mmol/l ALX zu einer gesteigerten, jedoch nicht signifikanten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung mit Werten zwischen  $x = 1,15 \pm 0,58$  SEM und  $x = 2,3$   $\mu\text{mol/l}$  im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Behandlung mit 1 oder 10 mmol/l ALX führte zu einer signifikanten (\* $p < 0,05$  bzw. \*\* $p < 0,01$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung mit Werten von respektive  $x = 1,95 \pm 0,27$  SEM und  $x = 2,33 \pm 0,03$  SEM  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit vorlag, handelte es sich wahrscheinlich um zufällige Signifikanzen, zumindest nach Inkubation mit 1 mmol/l ALX.



**Abbildung 19:** ALX stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in zellfreiem Kulturmedium. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs mit Lösungsmittel-behandelter Kontrolle.

#### **4.2.12 Inkubation von Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ schädigt die $\beta$ -Zellfunktion anhand der basalen und D-G-stimulierten Freisetzung von immun-reaktivem Insulin (IRI)**

Um den Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ auf die  $\beta$ -Zellfunktion in vitro zu überprüfen, wurden Inselkulturen von je 10 Inseln angesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ behandelt.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurde eine signifikante (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) Abnahme der Stimulierbarkeit nach Behandlung mit verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation im Kulturmedium induziert. Durch die Behandlung mit den unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde die basale IRI-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht, minimal von  $x = 5,55 \pm 1,21$  SEM ng Insulin/Inseln/60 min auf  $x = 10,81 \pm 0,73$  SEM nach Behandlung mit 2,5  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und maximal auf  $x = 137,89 \pm 8$  SEM nach Behandlung mit 100  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Werte zeigen einen dosisabhängigen Anstieg an  $\beta$ -Zellläsionen und eine daraus resultierende unkontrollierte Freisetzung des basalen Insulins. Die ausgeprägtesten Effekte hatten Konzentrationen von 30 und 50  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit reduziertem SI von respektive  $x = 1,02 \pm 0,07$  SEM und  $x = 1,19 \pm 0,07$  SEM, verglichen mit dem SI von  $x = 3,8 \pm 0,56$  SEM in den Kontrollgruppen.

Um den toxischen Effekt von STZ auf die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung zu überprüfen, wurden 5 verschiedene Gruppen von Inselkulturen angesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen von STZ oder dem Lösungsmittel behandelt (Tabelle 1). Die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von STZ mit 1, 3, 6 und 10 mmol/l STZ führten zu einem signifikanten (\*p < 0,05) und dosisabhängigen Verlust der D-G-stimulierten IRI-Freisetzung. Der SI betrug in der Kontrollgruppe  $x = 5,29 \pm 0,45$  SEM bei einer Konzentration von 1 mmol/l STZ nur  $x = 1,96 \pm 0,54$  SEM und erreichte bei einer Konzentration von 10 mmol/l STZ den niedrigsten Wert von  $x = 0,75 \pm 0,13$  SEM.

**Tabelle 1:** Inkubation von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ schädigt die  $\beta$ -Zellfunktion anhand der basalen und D-G-stimulierten IRI-Freisetzung<sup>a</sup>

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\mu$ mol/l]	IRI [ng/ Insel/ 60 min]		SI
	basal	D-G-stimuliert	
0	5.55 $\pm$ 1.21	15.27 $\pm$ 1.13	3.80 $\pm$ 0.56
2.5	10.81 $\pm$ 0.73	18.78 $\pm$ 2.03	1.77 $\pm$ 0.21*
5	11.68 $\pm$ 1.48	28.38 $\pm$ 5.17	2.34 $\pm$ 0.19*
10	20.77 $\pm$ 5.48	33.11 $\pm$ 4.50	1.91 $\pm$ 0.36*
30	86.52 $\pm$ 5.40	92.94 $\pm$ 11.80	1.02 $\pm$ 0.07***
50	137.45 $\pm$ 8.00	162.53 $\pm$ 14.22	1.19 $\pm$ 0.07***
100	137.89 $\pm$ 8.10	167.21 $\pm$ 24.67	1.21 $\pm$ 0.16**

STZ [mmol/l]	IRI [ng/ Insel/ 60 min]		SI
	basal	D-G-stimuliert	
0	2,24 $\pm$ 0,17	11,57 $\pm$ 0,94	5,29 $\pm$ 0,45
1	7,78 $\pm$ 1,64	12,77 $\pm$ 1,96	1,96 $\pm$ 0,54*
3	7,24 $\pm$ 1,23	17,13 $\pm$ 3,30	1,77 $\pm$ 0,42*
6	15,63 $\pm$ 1,85	17,71 $\pm$ 5,78	1,44 $\pm$ 0,41*
10	19,30 $\pm$ 2,27	14,88 $\pm$ 2,66	0,75 $\pm$ 0,13*

a = vor der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ wurden die Inseln für 24 Stunden im Kulturmedium inkubiert. Die Daten sind  $\bar{x} \pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs jeweiliger Lösungsmittel-behandelter Kontrollen.

In Tabelle 2 wird die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ gezeigt. Die Inselkulturen wurden vor der Behandlung drei Tage lang in RPMI inkubiert. In den Versuchen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergab die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung in den Kontrollgruppen einen ausreichenden SI von  $\bar{x} = 6,12 \pm 1,42$  SEM. Insgesamt führten alle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 2,5, 5, 30 und 100  $\mu$ mol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer ausgeprägten Abnahme der D-G-stimulierten IRI-

Freisetzung mit signifikant erniedrigten Werten des SI, ausgenommen nach Behandlung mit 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . In den Experimenten mit STZ wurde auch in den Kontrollgruppen eine D-G-stimulierte IRI-Freisetzung mit einem ausreichenden SI von  $x = 6,57 \pm 1,52$  SEM gemessen. Alle STZ-Konzentrationen von 1, 3, 6 und 10  $\text{mmol/l}$  lösten eine ausgeprägte Abnahme der D-G-stimulierten IRI-Freisetzung mit signifikanter Erniedrigung des SI aus.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Zellfunktion an Tag 1 und Tag 3 nach der Isolierung der Inseln und Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder STZ schon bei niedrigsten Konzentrationen gestört war. Es handelt sich somit um irreversible  $\beta$ -Zellschäden.

Am Tag 3 nach der Isolierung wurden die Inselkulturen männlicher und weiblicher Spendermäuse mit verschiedenen Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder STZ behandelt. In Abbildung 20A ist die basale und die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung in Inseln männlicher Mäuse nach Behandlung mit 10, 30, 50 oder 100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  oder dem Lösungsmittel dargestellt. Die erhobenen Befunde sind mit den Ergebnissen aus Tabelle 1 vergleichbar. Die basale Insulinfreisetzung in den Kontrollgruppen ergaben Werte von  $x = 25,68 \pm 4,8$  SEM ng Insulin.

Nach Stimulierung durch D-G konnte die IRI-Freisetzung  $x = 98,98 \pm 13,27$  SEM ng Insulin gesteigert werden. Steigende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen führten auch am Tag 3 nach Isolierung zu einer Störung der IRI-Freisetzung.

In Abbildung 20B ist die basale und D-G-stimulierte IRI-Freisetzung nach Inkubation und STZ dargestellt. Auch diese Ergebnisse sind mit den in Tabelle 2 dargestellten Befunden vergleichbar. Die IRI-Freisetzung in den Kontrollen betrug basal  $x = 11,81 \pm 2,03$  SEM ng Insulin. Die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung zeigte eine signifikante ( $*p < 0,05$ ) Steigerung von  $x = 112,11 \pm 10,35$  SEM ng Insulin/60 min/Inseln. Die Inkubation mit steigenden STZ-Konzentrationen führte ebenfalls zu  $\beta$ -Zellschäden und somit zu einer gestörten IRI-Freilassung.

**Tabelle 2:** Inkubation von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ schädigt die  $\beta$ -Zellfunktion anhand der basalen und D-G-stimulierten IRI-Freisetzung<sup>b</sup>

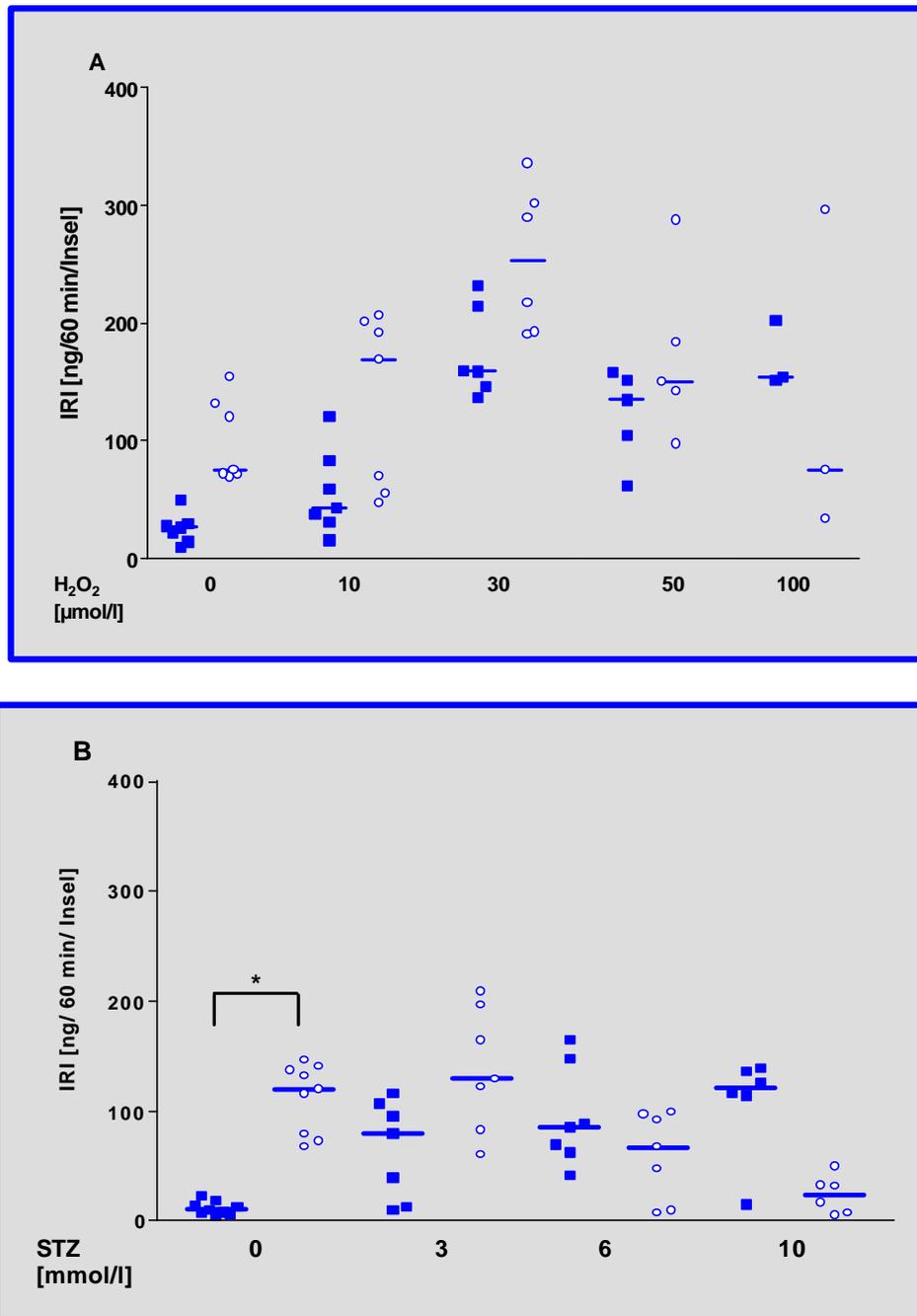
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\mu$ mol/l]	IRI [ng/ Insel/ 60 min]		SI
	basal	D-G-stimuliert	
0	7,53 $\pm$ 2,29	22,62 $\pm$ 5,16	6,12 $\pm$ 1,42
2.5	8,84 $\pm$ 2,02	13,20 $\pm$ 2,83	1,97 $\pm$ 0,55*
5.0	5,52 $\pm$ 0,97	6,95 $\pm$ 1,96	1,47 $\pm$ 0,34*
10	14,81 $\pm$ 3,25	19,89 $\pm$ 4,49	2,01 $\pm$ 0,40**
30	23,61 $\pm$ 6,99	25,53 $\pm$ 7,03	1,65 $\pm$ 0,42*
50	25,79 $\pm$ 7,64	42,01 $\pm$ 12,94	3,15 $\pm$ 0,87
100	29,61 $\pm$ 7,55	39,69 $\pm$ 7,67	2,03 $\pm$ 0,34*

STZ [mmol/l]	IRI [ng/ Insel/ 60 min]		SI
	basal	D-G-stimuliert	
0	6,65 $\pm$ 1,09	41,70 $\pm$ 10,03	6,57 $\pm$ 1,52
1	13,42 $\pm$ 3,09	17,55 $\pm$ 2,46	2,27 $\pm$ 0,48*
3	7,37 $\pm$ 0,70	10,25 $\pm$ 1,80	1,71 $\pm$ 0,19*
6	22,03 $\pm$ 4,07	8,49 $\pm$ 1,76	0,57 $\pm$ 0,14*
10	16,77 $\pm$ 5,11	10,55 $\pm$ 2,93	0,88 $\pm$ 0,22*

b = vor der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder STZ wurden die Inseln nach Isolierung 72 Stunden im Kulturmedium inkubiert. Die Daten sind  $\bar{x} \pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

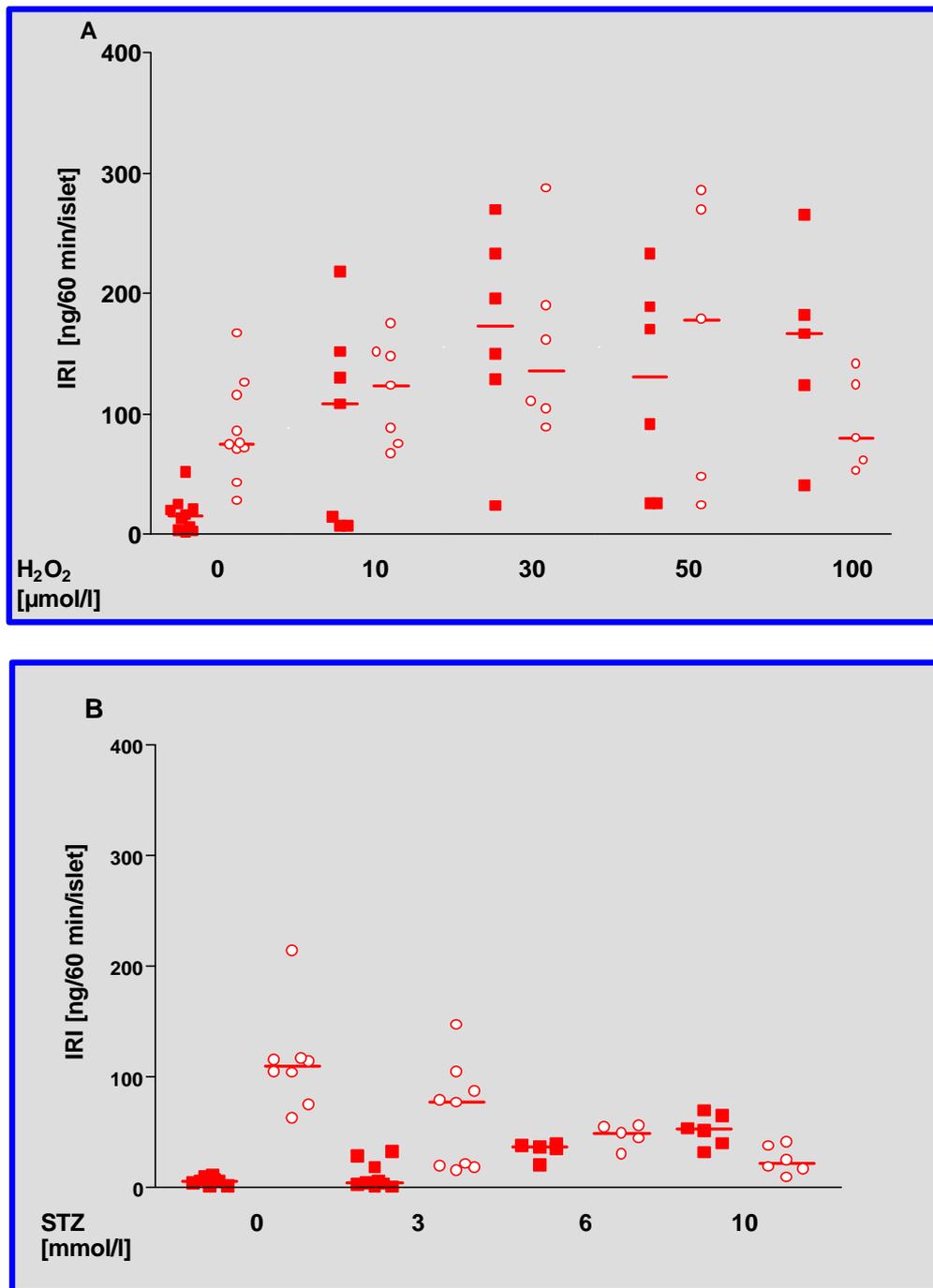
\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 vs jeweiliger Lösungsmittel-behandelter Kontrolle.



**Abbildung 20:** Basale (■) und D-G-stimulierte (○) IRI-Freisetzung nach  $H_2O_2$ - (A) oder STZ (B)-Behandlung nach 72-stündiger Inkubation nach Isolierung von Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse. Die Daten sind  $x \pm \text{SEM}$  aus 3 unabhängigen Experimenten erhoben. \* $p < 0,05$  vs Lösungsmittel-behandelter basaler Insulinfreisetzung.

In Abbildung 21A sind die D-G-stimulierten IRI-Freisetzungen in Inselkulturen weiblicher Spendermäuse nach Inkubation für 72 h im Kulturmedium und nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  dargestellt. Steigende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen hatten einen, mit den Männchen vergleichbaren Effekt auf die  $\beta$ -Zellfunktion. Die basale IRI-Freisetzung in den Kontrollgruppen betrug  $x = 16,44 \pm 5,31$  SEM und konnte nach D-G-Stimulierung auf  $x = 85,54 \pm 14,39$  SEM ng Insulin gesteigert werden. Eine adäquate D-G-stimulierte IRI-Freisetzung konnte nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht gemessen werden. In Abbildung 21B ist die basale und die D-G-stimulierte IRI-Freisetzung in Inseln weiblicher Spendermäuse nach Inkubation für 72 h im Kulturmedium und nach Behandlung mit verschiedenen STZ-Konzentrationen dargestellt. Die basale IRI-Freisetzung in den Lösungsmittel-behandelten Kontrollgruppen betrug  $x = 6,44 \pm 1,1$  SEM ng Insulin. Nach D-G-Stimulierung wurden  $x = 113,39 \pm 16,0$  SEM ng Insulin sekretiert. Lediglich die Inkubation mit 3 mmol/l STZ führte zu einer D-G-stimulierten IRI-Freisetzung, die Behandlung mit 6 und 10 mmol/l STZ zeigte toxische Effekte auf die Funktion der  $\beta$ -Zellfunktion.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass steigende Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und STZ sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen auch nach 72-stündiger Inkubation toxische Effekte auf die  $\beta$ -Zellen haben und zu einem persistierenden Verlust der  $\beta$ -Zellfunktion führen.



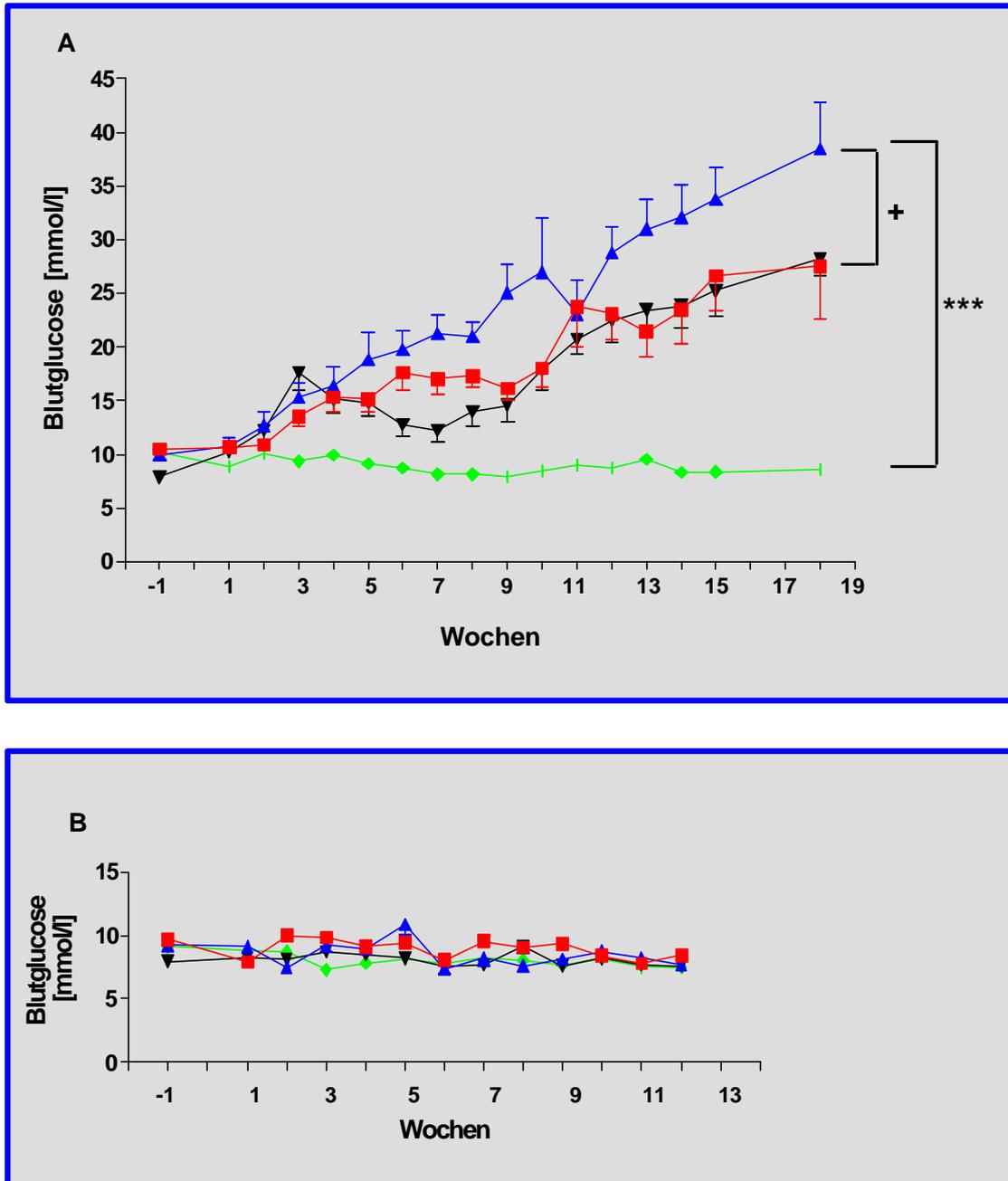
**Abbildung 21:** Basale (■) und D-G-stimulierte (○) Insulinfreisetzung in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder STZ-Behandlung nach 72-stündiger Inkubation nach Isolierung. Die Daten sind ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

### **4.3 In-vivo-Befunde mit Selen-modifizierten Diäten**

#### **4.3.1 Eine Se-Mangelernährung über 3 Generationen steigert die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen C57BL/6-Mäusen**

Es ist bekannt, dass ein Se-Mangel zu Krankheiten wie Kardiomyopathien, kardiovaskuläre Erkrankungen, Karzinogenese und akuter und chronischer Pancreatitis führt (Zimmermann et al., 2000; Lankisch et al., 1998). Ebenso reduziert ein Se-Mangel die GPX-Aktivität (Weitzel und Wendel, 1993). Es soll nun untersucht werden, ob Se-modifizierte Diäten den MLD-STZ-Diabetes beeinflussen. In C57BL/6-Männchen begann - wie erwartet - unter regulärer Mäusdiät 14 Tage nach der MLD-STZ-Behandlung eine kontinuierlich ansteigende Hyperglykämie (Abb. 22A). Se(+)-Futter über 3 Generationen beeinflusste die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie nicht. Die über 3 Generationen verabreichte Se(-)-Diät hingegen erhöhte signifikant die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie, wobei die Flächen unter den Kurven verglichen wurden. In den weiblichen C57BL/6-Mäusen (Abb. 22B) blieb die Resistenz gegenüber einem MLD-STZ-Diabetes sowohl durch eine Se(-)- als auch durch Se(+)-Diät über drei Generationen bestehen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur eine Se(-)-Diät über 3 Generationen die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen C57BL/6-Mäusen beeinflusst, indem sie signifikant erhöht wurde. Die C-Mäusediät scheint genügend Se zu enthalten, da eine Supplementierung keinen Effekt auf die Hyperglykämie hatte. Ob eine Se(-)-Diät bereits in der F<sub>1</sub>-Generation die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie verändert, ist unbekannt, da dieses Experiment nicht durchgeführt wurde.

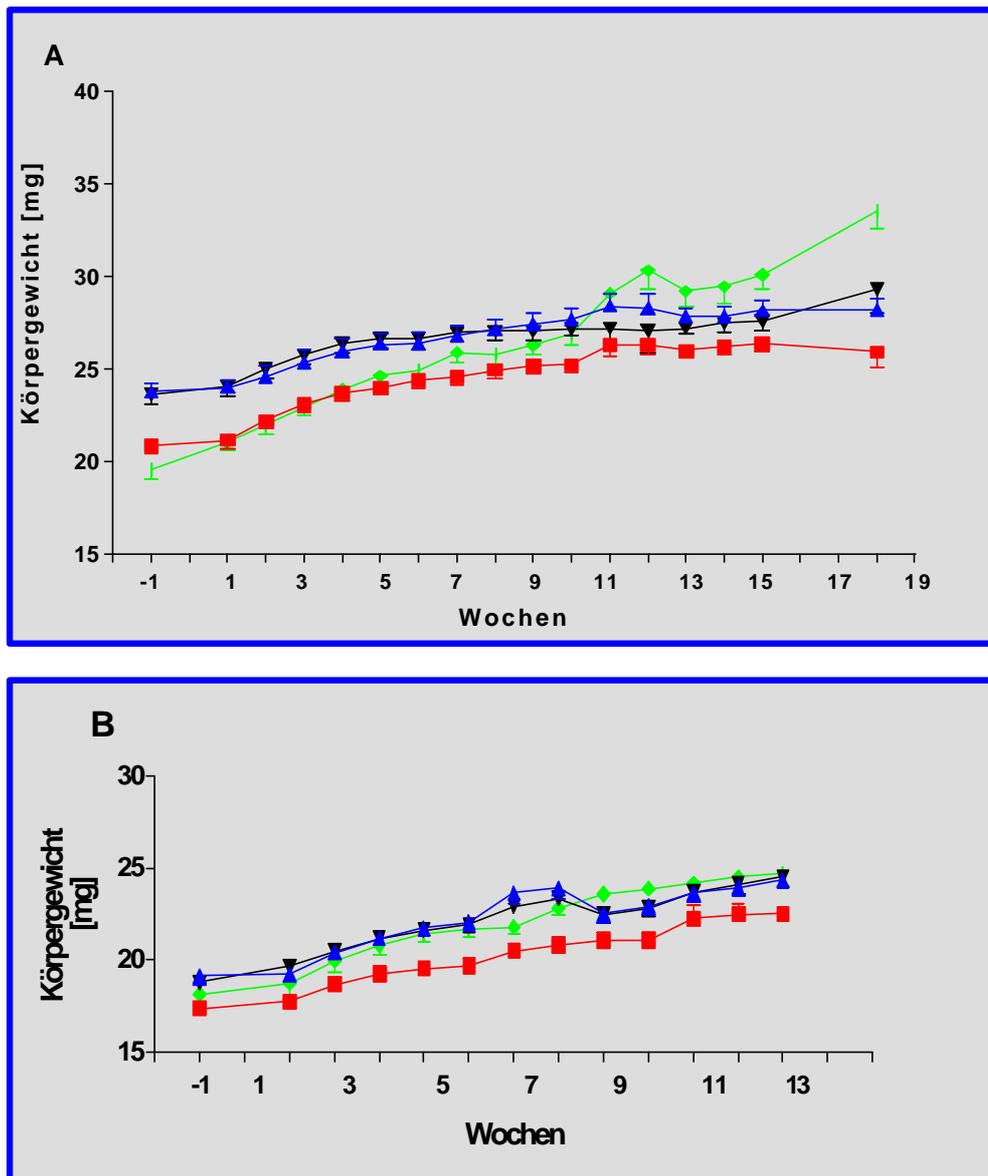


**Abbildung 22:** Eine Se-Mangelernährung über 3 Generationen steigert die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen C57BL6-Mäusen. Blutglucosewerte ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) männlicher (A) und weiblicher (B) C57BL/6-Mäuse, die Se(+)- (■), Se(-)- (▲) oder C-Mäusediät (▼) - entweder alleine oder zusätzlich MLD-STZ (◆) - erhalten haben. Verglichen wurden die Flächen unter den Kurven. \* $p < 0,05$  vs MLD-STZ-behandelter Mausgruppe, die C-Mäusediät erhalten hat; \*\*\* $p < 0,001$  vs Lösungsmittel-behandelter Mausgruppe, die C-Mäusediät erhalten hat.

#### **4.3.2 Weder Se-angereichertes noch Se-defizientes Futter verändern das Körpergewicht MLD-STZ-behandelter männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse**

In männlichen C57BL/6-Mäusen der F<sub>2</sub>-Generation zeigte sich in allen Gruppen, die nicht mit MLD-STZ behandelt wurden, über die Versuchsdauer von 12 bis 18 Wochen ein vergleichbarer Anstieg des Körpergewichts (Abb. 23A). In den MLD-STZ-behandelten Mausgruppen blieb in der 5. Woche nach der letzten MLD-STZ-Injektion eine kontinuierliche Gewichtszunahme aus. Die Gewichtskurven der drei Gruppen mit C-, Se(-)- und Se(+)-verabreichten Diäten waren vergleichbar. Somit ist ein Effekt des Körpergewichts auf die Hyperglykämie auszuschließen.

In weiblichen C57BL/6-Mäusen der F<sub>2</sub>-Generation konnte über die gesamte Versuchsdauer von 12 Wochen eine stetige vergleichbare Gewichtszunahme beobachtet werden (Abb. 23B).



**Abbildung 23:** Weder Se(+) noch Se(-) Futter verändert das Körpergewicht MLD-STZ-behandelter männlicher (A) und weiblicher (B) C57BL/6-Mäuse der F<sub>2</sub>-Generation. Körpergewicht ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse, die Se(+)- (■), Se(-)- (▲) oder C-(▼)-Futter erhalten haben und mit MLD-STZ behandelt wurden sowie der Kontrollgruppen (◆). Eine Mausgruppe setzte sich aus je 10 Tieren zusammen. Die Mäuse der einzelnen Gruppen wurden für 18 bzw. 12 Wochen einmal wöchentlich gewogen.

### **4.3.3 Effekte von Se-angereichertem und Se-defizientem Futter auf die Infiltration mit mononukleären Zellen in Inseln von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen**

Die Ergebnisse der Beurteilung des Grades von Infiltrationen der Inseln mit mononukleären Zellen sind in Tabelle 3 aufgelistet und zeigen, dass Diabetesempfindliche C57BL/6 männliche Mäuse der F<sub>2</sub>-Generation, die C-Futter erhalten haben, nach Behandlung mit MLD-STZ in 84,47% keine Insulitis (Grad 0), in 13,64% eine Insulitis mit milden Infiltrationen (Grad 1) und in 1,89% eine moderate Infiltration (Grad 2) aufweisen. Signifikante Veränderungen wurden nur in der Gruppe festgestellt, die eine Se(+)-Diät erhalten hat und mit MLD-STZ behandelt wurde. Hier reduzierte sich der Anteil der Insulitis Grad 1 auf 6,5%, 93,5% zeigten keine Insulitis. Pankreatische Inseln weiblicher Mäuse, die für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes nicht empfänglich sind und C-Futter erhalten haben, zeigten in 92,19% der Inseln keine Insulitis.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit MLD-STZ in pankreatischen Inseln männlicher Mäuse nach Gabe von C- oder Se(-)-Futter zu einer Insulitis führte, dagegen Se(+)-Futter die MLD-STZ induzierte Insulitis reduzierte. Auch lag der prozentuale Anteil der Insulitis in der Se(-)-ernährten Kontrollgruppe höher als bei Mäusen, die C- oder Se(+)-Futter erhalten haben. In den Inseln weiblicher Mäuse der F<sub>2</sub>-Generation zeigte sich nach der Behandlung mit MLD-STZ auch nur in der mit Se(-)-Diät versorgten Gruppe ein, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, erhöhter Anteil an Inseln mit Insulitis. Der größte Anteil der Inseln allerdings blieb in den Mäusen mit C-, Se(+)- und Se(-)-Futter ohne Anzeichen einer Infiltration mit mononukleären Zellen.

**Tabelle 3:** Effekte von Se(+) und Se(-) Futter auf die Infiltration mit mononukleären Zellen in Inseln von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen der F<sub>2</sub>-Generation

Behandlung der Mäuse	Inseln mit mononukleären Infiltraten, (%)					
	am Inselpol		0	Insulitis		
	-	+		1+	2+	3+
<b>Männchen</b>						
C + STZ	57,15	42,85	84,47	13,64	1,89	-
Se(+) +STZ	100	-	93,5 <sup>a</sup>	6,5 <sup>b</sup>	-	-
Se(-) + STZ	100	-	90,94	7,14	1,96	-
Se(+)	100	-	97,77	2,2	-	-
Se(-)	100	-	95,05	4,5	0,45	-
<b>Weibchen</b>						
C + STZ	50	50	92,19	7,03	0,39	0,39
Se(+) + STZ	85,75	14,28	93,53	5,59	0,59	0,29
Se(-) + STZ	100	-	91,81	7,38 <sup>a</sup>	0,81	-
Se(+)	100	-	97,84	2,16	-	-
Se(-)	100	-	97,83	2,17	-	-

Die Daten wurden in mindestens 200 Inseln von jeweils 5 männlichen und weiblichen Spendermäusen der F<sub>2</sub>-Generation erhoben, die Se(+)-, Se(-) oder C-Futter über 3 Generationen – alleine oder zusätzlich mit MLD-STZ - erhalten haben. <sup>a</sup>p < 0,05 vs jeweiliger Lösungsmittel-behandelter Kontrollgruppe; <sup>b</sup>p < 0,01 vs STZ-behandelter Mäuse, die C-Futter erhalten hatten.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass

1. MLD-STZ nur in pankreatischen Inseln männlicher und nicht weiblicher C57BL/6-Mäuse signifikant die Bildung von  $H_2O_2$  stimuliert,
2. MLD-STZ zu einer deutlich reduzierten Aktivität des antioxidativen Enzyms GPX in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse führt, hingegen die Aktivität der GPX in den Inseln weiblicher Mäuse signifikant ansteigt,
3. die Behandlung mit STZ in vitro in männlichen Mäusen ebenfalls zu einer signifikanten und dosisabhängigen Steigerung der  $H_2O_2$ -Generierung führt,
4. die Inkubation mit STZ in vitro die Aktivität der GPX in Inseln männlicher Mäuse herabsetzt, sie in Inseln weiblicher Mäuse steigert und
5. ein Se-Mangel über 3 Generationen die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen Mäusen verstärkt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde unterstreichen die Bedeutung von ROS in der Diabetes-Pathogenese, da nur MLD-STZ-Diabetes-empfindliche männliche Mäuse eine gesteigerte  $H_2O_2$ -Bildung vorweisen. In diesem Zusammenhang wird durch die Bedeutung von enzymatischen Antioxidanzien in der MLD-STZ-induzierten Diabetes-Pathogenese gezeigt, dass eine Reduktion mit der Diabetes-Empfindlichkeit in männlichen Mäusen assoziiert ist, eine Steigerung hingegen mit Resistenz in weiblichen.

ROS werden in physiologischen Prozessen und bei inflammatorischen Reaktionen durch Lymphocyten und Leukozyten ständig gebildet (Halliwell, 1994), so lassen z.B. Granulocyten bei der Phagocytose von pathogenen Keimen  $H_2O_2$  als Bakterizid frei (Root et al., 1975).

Es ist bekannt, dass ROS in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in niedrigen Konzentrationen die Apoptose, in hohen Konzentrationen hingegen Nekrosen induzieren (Buttke und Sandström, 1994). Im humanen Typ-1-Diabetes findet die ROS-Bildung unter anderem durch T-zellabhängige Immunreaktionen (Verge et al., 1995; Wilson und Hughes, 1998) sowie durch unspezifische inflammatorische Reaktionen statt und führt zur  $\beta$ -Zelldestruktion (Oberley, 1988; Rabinovitch et al., 1999). Der Anstieg der Produktion von ROS könnte aus der Glucose-Oxidation und der Proteinglykation bzw. aus der allmählichen Degradierung der glykolysierten Proteine resultieren (Brownlee et al., 1984; Wolff et al., 1993; Gillery et al., 1988). Baynes (1991) konnte zeigen, dass während der Diabetes-Pathogenese oxidativer Stress eine zentrale Rolle

spielt. Dabei werden ROS durch nicht-enzymatische und autooxidative Glykolyse gebildet und führen zu Oxidation von Proteinen, ungesättigten Fettsäuren sowie Membranproteinen. Metabolischer Stress führt zu einem Zyklus, der Zellschäden bis hin zum Zelltod verursacht, und dies wiederum führt zu einem Anstieg der ROS-Produktion.

Entzündungsreaktionen im MLD-STZ-induzierten Diabetes sind mit denen des humanen Typ-1-Diabetes vergleichbar (Like und Rossini, 1976; Klinkhammer et al., 1988; Elias et al., 1994). Aus der Gruppe der ROS stellt  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Vorstufe der hochtoxischen  $\cdot\text{OH}$  dar, die durch die Fenton-Reaktion gebildet werden und das reaktivste Potential besitzen (Sato und Bremner, 1993). Über die Fenton-Reaktion entstehen aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  die  $\cdot\text{OH}$  (Graft et al., 1984; Mello-Filho und Meneghini, 1985). Es wurde nachgewiesen, dass intrazelluläres  $\text{Fe}^{2+}$  eine große Rolle bei DNA-Schäden, die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursacht werden, spielen (Barbouti et al., 2001).

Auch in pankreatischen Inseln wurde die Generierung von ROS gezeigt. So wurde mittels ESR-Spektroskopie die basale und die STZ stimulierte Bildung von  $\cdot\text{OH}$  in Mausinseln nachgewiesen (Gille et al., 2002). In pankreatischen Inseln der Ratte wurde durch In-vivo- und In-vitro-Behandlung mit STZ die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung belegt (Takasu et al., 1991). Somit ist anzunehmen, dass ROS Mediatoren der Destruktion essentieller  $\beta$ -Zellstrukturen sind und ihre Funktion zum Erliegen kommt. Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Voraussetzung für die Fenton-Reaktion zur Bildung von  $\cdot\text{OH}$  ist.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die STZ-Behandlung isolierter Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse zu einer dosisabhängigen und signifikanten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung führt (Gille et al., 2002). Auch die STZ-stimulierte In-vitro-Bildung von  $\text{O}_2\cdot^-$  in Anwesenheit des Xanthin-Oxidase-Systems (Nukatsuka et al., 1988) und in isolierten submitochondrialen Zellbestandteilen von Ratten (Gille et al., 2002) wurde beobachtet. Die gesteigerte  $\text{O}_2\cdot^-$ -Bildung kann die Kaskade weiterer ROS-Bildung wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktivieren. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch Inkubation mit SOD von STZ-behandelten Inseln keine vermehrte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung gezeigt werden. Möglicherweise hat SOD eher die Bildung von  $\text{ONOO}^-$ , welches ebenfalls zu der Gruppe der ROS zählt, als die von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verhindert.

Im Cytosol der pankreatischen Inseln konnte nach Behandlung mit STZ keine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung detektiert werden. Ursache dafür könnte sein, dass durch die

Homogenisierung die cytosolische CAT und die GPX frei wurden und das gebildete  $H_2O_2$  abfangen konnten.

Zur Überprüfung der Bedeutung von  $H_2O_2$  in der MLD-STZ-induzierten Diabetes-Pathogenese wurden isolierte pankreatische Inseln eines weiteren Stammes – nämlich männliche BALB/c-Mäuse - mit STZ behandelt. Diese Mäuse sind - im Vergleich zu männlichen C57BL/6-Mäusen - resistenter gegenüber einem MLD-STZ-Diabetes. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen, dass STZ zwar signifikant und dosisabhängig eine  $H_2O_2$ -Bildung anregt, jedoch nur bei höheren Konzentrationen als für Inseln von C57BL/6-Mäusen erforderlich. Daraus ist zu schließen, dass die Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-Diabetes mit dem Spiegel an ROS assoziiert ist.

Im MLD-STZ-Diabetes-Modell ist es sinnvoll, die Bedeutung der Sexualhormone in Bezug auf die Empfänglichkeit zu diskutieren. Rossini et al. (1978) haben den Zusammenhang zwischen Sexualhormonen und der MLD-STZ-induzierten Hyperglykämie belegt. So löste die Behandlung mit Testosteron in weiblichen Mäusen eine Diabetes-Entwicklung aus, hingegen wurde diese bei Östrogen-behandelten männlichen Mäusen sowie durch Gabe von Antiandrogenen verhindert (Mclaren et al., 1980). Auch die Kastration männlicher Mäuse verringerte die Sensitivität gegenüber den diabetogenen Effekten von MLD-STZ, aber eine Ovariectomie steigerte sie (Rossini et al., 1978). Daraus ergibt sich die interessante Frage, ob eine Behandlung der Mäuse mit Östrogenen bzw. Testosteronen oder Kastration bzw. Ovariectomie einen Effekt auf die ROS-Bildung bewirkt. Die Klärung bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Da die Behandlung mit MLD-STZ in pankreatischen Inseln zu Infiltrationen mit mononukleären Zellen führt (Wang et al., 1993; Bach, 1994; Ohly et al., 2000), wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der Effekt des Spurenelementes Se auf die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie sowie die Infiltrationen der pankreatischen Inseln untersucht. Die Auswertung der histologischen Untersuchungen haben ergeben, dass männliche Mäuse, die reguläres oder Se-defizientes Futter erhalten haben, nach MLD-STZ-Behandlung eine gesteigerte Insulitis Grad 1 und Grad 2 zeigten. Die Effekte der modifizierten Se-Diäten waren, wenn überhaupt, nur grenzwertig. Bei den Infiltrationen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse, die mit MLD-STZ behandelt wurden, handelt es sich um unspezifische Reaktionen, ausgelöst durch den Nadelstich über die Injektion.

Um zu analysieren, welche der beiden Untereinheiten des STZ-Moleküls an der  $H_2O_2$ -Bildung beteiligt ist, wurden isolierte Inseln entweder mit MNU oder D-G inkubiert. Beide Untereinheiten alleine hatten keinen Einfluß auf die  $H_2O_2$ -Generierung. Es ist daher anzunehmen, dass für die toxischen Effekte das kombinierte Molekül erforderlich ist. Dadurch wird über den Glucose-Anteil die Aufnahme in die  $\beta$ -Zelle über den GLUT2 (Schnedl et al., 1994; Wang et al., 1998) ermöglicht, um dann in der  $\beta$ -Zelle über MNU - welches per se nicht diabetogen ist (Elsner et al., 2000) - Schäden auszulösen. Diese können - vermutlich in Abhängigkeit von der angewendeten Dosis - einerseits über das alkylierende Potential, welches zur Schädigung der DNA und Überaktivierung der poly-(ADP-Ribose)-Synthase und die damit verbundene Verringerung des Substrats NAD führt (LeDoux et al., 1986; Wilson, 1988) sowie DNA-Schäden durch Methylierung von Guanin via Methylkationen (Murata et al., 1999) und andererseits durch freie Radikale wie ROS (Gille et al., 2002; Friesen et al., 2004) und  $NO\bullet$  (Szkudski, 2001) erfolgen. Inwieweit DNA-Strangbrüche im MLD-STZ-Modell eine entscheidende Rolle für die Diabetogenität spielen, ist unbekannt. Hier ist anzumerken, dass durch STZ und MNU vergleichbare Läsionen an Proteinstrukturen der  $\beta$ -Zelle induziert werden (LeDoux et al., 1986; Wilson und Leiter, 1990), jedoch nur STZ diabetogen ist (Elsner et al., 2000). Inwieweit welcher Grad der Reduktion des zellulären  $NAD^+$  die Ursache für einen STZ- oder ALX-induzierten Diabetes ist, bleibt ebenfalls zu klären, da die PARP zum Teil auch an der Reparatur toxisch induzierter DNA-Schäden beteiligt ist (Wilson et al., 1984). Daher ist die Frage nach der Bedeutung von ROS in der Diabetes-Pathogenese weiterhin relevant.

Um den Befund der ROS-Bildung durch STZ und die mögliche Beteiligung an der  $\beta$ -Zelldestruktion zu erhärten, wurde die  $H_2O_2$ -Bildung in isolierten Inseln durch ALX als einem potenten Generator untersucht. ALX ist durch den Redox-Zyklus ein erwiesener ROS-Bildner (Oberley, 1988; Winterbourne und Munday, 1989; Drews et al., 2000). In den hier dargestellten Untersuchungen wurde eine signifikante Stimulation der  $H_2O_2$ -Generierung nur mit 10 mmol/l ALX erzielt, einer Konzentration, die biologisch irrelevant ist, da sie so toxisch für die  $\beta$ -Zelle ist, dass alle Strukturen unmittelbar zerstört werden. Diese Beobachtung entspricht auch den Befunden anderer Autoren (Herson und Ashford, 1997; Drews et al., 2000).

Dennoch ist der ROS-Bildung durch STZ und ALX in der Diabetes-Pathogenese eine essentielle Funktion zuzuordnen, da in transgenen Mäusen durch Überexpression des antioxidativen Enzyms Cu/ZnSOD  $\beta$ -Zellschutz erreicht wird (Kubisch et al., 1994 und 1997). Nicht nur die ROS-Bildung ist eine gemeinsame Eigenschaft von STZ und ALX als Diabetogene, sondern auch die Voraussetzung, dass der GLUT2 als Zielstruktur vorliegen muss, um den Prozess der  $\beta$ -Zellzerstörung zu initiieren (Schulte im Walde et al., 2002). Somit lassen sich auch die zahlreichen Ergebnisse erklären, durch Intervention mit sehr verschiedenen Mitteln einen MLD-STZ und ALX-Diabetes zu verhindern. So blockiert die Vorbehandlung mit 5-T-G oder D-G sehr wahrscheinlich die Aufnahme von MLD-STZ (Wang et al., 1993, Wang und Gleichmann, 1998) und mit D-G die Aufnahme von ALX (Schulte in Walde et al., 2002) über den GLUT2 in die  $\beta$ -Zelle. Als zugrunde liegender Mechanismus ist Konkurrenz dieser chemisch verwandter Strukturen um Bindung an den GLUT2 anzunehmen. Da, wie bereits erwähnt, ROS als Mediatoren für  $\beta$ -Zellschäden angenommen werden, wurde auch mit verschiedenen Scavengern wie Nicotinamid (Uchigata et al., 1983), 1,1-Dimethylharnstoff (Wilson et al., 1984) und die Induktion von MT (Ohly et al., 2000) die Entwicklung eines induzierten Diabetes-Typ-1 verhindert. Auf die ROS-Bildung zurückkommend, wurden auch auto-oxidative Prozesse von STZ, MNU, D-G und ALX im Kulturmedium untersucht. MNU und ALX regten eine signifikante  $H_2O_2$ -Bildung an, jedoch nicht STZ und D-G. Ohne Zweifel, MNU and ALX sind ROS-Bildner.

Weitere Ergebnisse zeigen, dass mit  $H_2O_2$  oder STZ bereits bei niedrigen Konzentrationen die  $\beta$ -Zellfunktion gestört wird und inadäquate Insulinfreisetzung verursacht. Somit werden Befunde einer anderen Arbeitsgruppe (Maechler et al., 1999) bestätigt, die einen hemmenden Effekt von  $H_2O_2$  auf die Signaltransduktion und Insulinsekretion feststellten.

Im Prozess der  $\beta$ -Zellzerstörung durch ROS spielt der antioxidative Status der  $\beta$ -Zelle als Gegenregulation eine bedeutsame Rolle. Zellen werden im Allgemeinen durch ein intrazelluläres Schutzsystem vor den toxischen Effekten der ROS geschützt. Solange die ROS-Produktion und der antioxidative Status der Zelle im Gleichgewicht sind, können die ROS ihr zerstörerisches Potential nicht entfalten. Eine Verschiebung zu Gunsten der ROS hingegen zündet die Kettenreaktion und die Zellestrukturen.

Zu den unspezifischen Antioxidanzien zählt GSH, welches im intrazellulären Raum detoxifizierend wirkt (Meister und Anderson, 1983). So hemmte die Behandlung mit GSH eine STZ-induzierte diabetische Neuropathie (Bravenboer et al., 1992). Es ist anzunehmen, dass STZ den GSH-Spiegel gesenkt hat, vergleichbar mit den Effekten in Leber und Herz von STZ-behandelten, diabetischen Ratten (Mak et al., 1996).

Zu den antioxidativen Enzymen zählen auch die verschiedenen Isoformen der SOD, die spezifisch  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  umwandelt, die CAT und die verschiedenen Isoformen der GPX, welche  $H_2O_2$  und Lipidperoxide zu  $H_2O$  und  $O_2$  umsetzt. Basierend auf den Befunden an fettleibigen und normalgewichtigen Mäusen (Grankvist et al., 1981) haben Lenzen et al. (1996) in Albino- und fettleibigen Mäusen gezeigt, dass  $\beta$ -Zellen - im Vergleich zu anderen Geweben, wie Leber, Lunge und Niere - eine deutlich reduzierte bis hin zur nicht detektierbaren Expression der antioxidativen Enzyme Cu/Zn und MnSOD, CAT und GPX aufweisen. Auch in primären pankreatischen Inseln der Ratte und in Insulinproduzierenden RINm5F-Zellen ist die geringe Expression der SOD, CAT und GPX beschrieben worden (Tiedge et al., 1998). An Hand dieser Befunde wird vermutet, dass die geringe Menge der enzymatischen Antioxidanzien die Sensitivität der  $\beta$ -Zellen gegenüber toxischen Schäden diabetogener Substanzen durch ROS zur Folge haben könnte. Demzufolge könnte dieser Mangel auch ein Faktor bei der Entwicklung des Typ-1-Diabetes durch exogene Faktoren sein.

Die Bedeutung antioxidativer Reaktionen in Inseln wird durch eigene Befunde gezeigt. So ist die mRNA-Expression von MnSOD und GPX-Aktivität in pankreatischen Inseln durch MLD-STZ in Diabetes-empfindlichen männlichen C57BL/6-Mäusen erniedrigt, in den Diabetes-resistenten weiblichen hingegen erhöht (Friesen et al., 2004). Demnach können Mäuse ihre  $\beta$ -Zellen vor ROS-Attacken durch antioxidative Antworten schützen, welche zumindest in dieser Tierspezies von den Sexualhormonen abhängig zu sein scheinen. Somit können  $\beta$ -Zellen sich wohl an oxidativen Stress adaptieren, anders als in anderen experimentellen Systemen vermutet (Tiedge et al., 1999). Durch genetisches Engineering kann jedoch ein Schutz gegen ROS-Toxizität entstehen. So führte in vitro in RINm5F-Zellen die Überexpression von CAT und GPX zu einer deutlich erhöhten Resistenz gegenüber ROS (Tiedge et al., 1999), in transgenen

Mäusen die Überexpression der Cu/ZnSOD zur Verhinderung eines STZ- und ALX-Diabetes (Kubisch et al., 1994). Die Erhöhung der Cu/ZnSOD in der  $\beta$ -Zelle der Maus erhöhte deren Aktivität um 50%. Auch die Überexpression von CAT in transgenen Mäusen verhinderte den diabetogenen Effekt von HD-STZ (Xu et al., 1999). In anderen Systemen wurde gezeigt, dass die Überexpression von MnSOD vor Toxizität durch ROS-generierende Agenzien und Cytokine schützte, und zu einer signifikanten Reduktion der iNOS auch auf mRNA-Ebene führte (Hohmeier et al., 1998). Auch in RINm5F-Zellen schützte die Überexpression von MnSOD vor ROS-Bildung durch Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  oder einem Cytokin-Gemisch aus IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Die Überexpression von CAT, GPX und Cu/ZnSOD zeigte hingegen keinen Effekt (Azevedo-Martins et al., 2003). Die Überexpression von CAT und GPX reduzierte jedoch effizient die Zelltodrate durch Apoptose und Nekrose sowie die oxidative Schädigung zellulärer Proteine nach Zytokinexposition (Lortz et al., 2000). Auch andere Arbeitsgruppen belegten, dass durch adenovirale Vektoren transfizierte INS-1-Zellen durch Überexpression von CAT und Cu/ZnSOD vor ROS geschützt blieben (Karsten et al., 2002).

Über die Bedeutung antioxidativer Antworten ist auch im spontanen Diabetes der NOD-Maus berichtet worden. So sind die antioxidativen Aktivitäten in männlichen Mäusen, die Diabetes-resistent sind, höher als in weiblichen, die den Diabetes entwickeln (Cornelius et al., 1993). Durch Überexpression des Se-abhängigen Redox-aktiven Proteins Thioredoxin wurde auch in weiblichen transgenen NOD-Mäusen die Diabetes-Prävalenz reduziert und eine Protektion der  $\beta$ -Zelle vor Apoptose erzielt. Durch das antioxidative und anti-apoptotische Protein wurden  $\beta$ -Zellen vor einem STZ-induzierten Diabetes (NOD x B6) F1 geschützt (Hotta et al., 1998).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen und erweitern bereits veröffentlichte Ergebnisse. Demzufolge hat der antioxidative Status der Zelle einen protektiven Effekt auf die STZ-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung. MLD-STZ stimuliert die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in pankreatischen Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse ohne Veränderung der mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme Cu/Zn und MnSOD, CAT und GPX. Im Gegensatz dazu stimuliert MLD-STZ nicht die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse, führt aber zu einer gesteigerten mRNA-Expression der fünf antioxidativen Enzyme (Friesen et al., 2004).

Protektive Effekte gegenüber ROS-induzierten Zellschäden werden auch den Spurenelementen Zn und Se zugesprochen. So wurde in C57BL/6- und F<sub>1</sub>-Hybriden (C57BL/6 x SJL) durch ZnSO<sub>4</sub>-angereichertes Trinkwasser eine Hochregulierung der cytosolischen Proteine MT1 und MT2 gezeigt sowie der Schutz vor MLD-STZ (Ohly et al., 2000). Es ist anzunehmen, dass MT ROS, insbesondere die sehr reaktiven <sup>•</sup>OH inaktivieren (Thornalley und Vasak, 1985; Sato und Bremner, 1993). Zu erwähnen ist hier, dass die Isoformen MT-1 und MT-2 wesentlich effektiver als GSH vor ROS - vermutlich <sup>•</sup>OH-induzierten DNA-Schäden - in vitro schützen (Abel und de Ruiter, 1989). In vivo-Studien an Mäusen haben gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit Metallen wie z.B. Cu, Zn oder Nickel zu einer Erhöhung der MT führt und somit vor oxidativem Stress durch Chemotherapeutika, Röntgenbestrahlung oder ionisierende Strahlung schützen kann (Naganuma, 1985; Matsubara, 1986; Cherian et al., 1994; Kondo et al., 1995). Weiterhin haben erst kürzlich erhobene Befunde aus der Arbeitsgruppe gezeigt, dass ZnSO<sub>4</sub>-angereichertes Trinkwasser weibliche NOD-Mäuse vor einem spontanen Diabetes schützt (Schott-Ohly et al., 2004). Ob dieser Effekt auf Induktion von MT als Scavenger von <sup>•</sup>OH beruht, bleibt zu klären. Jedenfalls verhinderte die 24-stündige Vorinkubation mit ZnSO<sub>4</sub> von pankreatischen Inseln nicht die STZ-stimulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung. Vermutlich kann ZnSO<sub>4</sub> seinen schützenden Effekt nur durch die Aufnahme und die damit verbundene Hochregulierung der MT in vivo ausbilden.

Um die biologische Funktion von Se kurz anzusprechen, ist hervorzuheben, dass Se-Defizienz die Enzymaktivität von GPX1 und GPX4 in vitro und ex vivo erniedrigt. Die Gabe von Se zu Se-defizienten Zellen erhöhte die Aktivitäten der beiden GPX-Isoformen. Wird regulär gefütterten Ratten Se injiziert, so führt diese Behandlung zu einer erhöhten GPX4-Aktivität. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der GPX für die Reduktion und die Regulation endogener Hydroperoxid-Bildung (Weitzel und Wendel, 1993). In der MLD-STZ-Diabetogenese wurde erst kürzlich gezeigt, dass ein Se-Defizit in der Nahrung über 3 Generationen signifikant die Hyperglykämie in männlichen C57BL/6-Mäusen erhöht, hatte aber keine Auswirkungen auf die Diabetes-Resistenz in weiblichen C57BL/6-Mäusen (Friesen et al., 2004). Diese Forschungsergebnisse stützen die Vermutung, dass dem antioxidativen Status eines Organismus eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Krankheiten zugeordnet werden kann

(Schwartz und Foltz, 1957; Lankisch et al., 1998; Zimmermann et al., 2000). Ob jedoch Se-modifizierte Diäten GPX-Aktivitäten in Inseln verändern, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Es ist generell erwiesen, dass den ROS zwei entgegengesetzte Wirkungen – nämlich schützenden und schädigende – zu zuordnen ist. So nutzen Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Neutrophile, ROS auf 2 Wegen: 1) als chemische Waffe gegen z.B. pathogene Mikroben und 2) als Signalmolekül für biologische Prozesse wie Genexpression und Proliferation und somit die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Es ist bekannt, dass aus der Gruppe der ROS  $H_2O_2$  als Aktivator für  $NF\kappa B$  fungiert (Baeuerle und Baltimore, 1988; Schreck et al., 1992; Schmidt et al., 1995). Kinasen, z.B. MAPK und verwandte JUN-Kinasen (Schreck et al., 1992) und T-Lymphocytenproliferation werden als Antwort auf oxidativen Stress aktiviert (Los et al., 1995). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen dem Se-Status und der Bindungskapazität von  $NF\kappa B$  und AP-1 gefunden werden (van Gagern et al., 1999). In Lymphocyten führte die Behandlung mit  $H_2O_2$  zu einer schnellen Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine und somit zur Signaltransduktion.

In Abhängigkeit vom Typ T-zellabhängiger Reaktionen können ROS Second-Messenger in der Signaltransduktion sein (Schulze-Osthoff, 1995; Ho und Bray, 1999; Ho et al., 2001) und haben die Eigenschaft,  $NF\kappa B$  zu aktivieren, welches u.a. an der Regulation der Genexpression pro-inflammatorischer Cytokine wie  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-1\beta$ , iNOS und des Makrophagen chemotaktischen Proteins beteiligt ist (Baeuerle und Henkel, 1994; Rao et al., 1994). Auch im MLD-STZ-Diabetes ist der Aktivierung von  $NF\kappa B$  in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse eine Schlüsselrolle zuzuordnen (Lgssiar et al., 2004). Eine mögliche Ursache für diese Aktivierung ist die beschriebene stimulierte  $H_2O_2$ -Generierung in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse durch MLD-STZ. Auch Makrophagen produzieren ROS und aktivieren Cytokine, die wiederum selber ROS in vitro (Hohmeier et al., 1998, Xu et al., 1999) und in vivo (Kubisch et al., 1997; Xu et al., 1999) freisetzen und somit einen Zyklus kontinuierlicher ROS-Generierung mit unterhalten kann (Karsten et al., 2002). Dadurch entstehen z.B. inflammatorische Prozesse mit mononukleären Zellinfiltraten (Barnes und Karin, 1997) und Zerstörung von Zellfunktionen wie Cytokin-induzierte Inhibierung der Insulinfreisetzung in humanen pankreatischen Inseln (Corbett et al., 1993) und  $\beta$ -

Zellzerstörung in Mäusen (Kallmann et al., 1992). Die Bedeutung proinflammatorischer Reaktionen im MLD-STZ-Diabetes wurden auch an C57BL/6-Mäusen (Müller et al., 2002) gezeigt. So stimulierte MLD-STZ die proinflammatorischen Cytokine IL-1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den Inseln männlicher Mäuse, reduzierte hingegen die anti-inflammatorischen Cytokine IL-4 und IL-10 und TGF- $\beta$ 1. Somit könnte die Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes Folge eines Ungleichgewichts zwischen der ROS-Generierung und dem antioxidativen Status in der  $\beta$ -Zelle sein. Dadurch könnten weitere inflammatorische Cytokine und Chemokine gebildet werden, die wiederum zu einer höheren ROS-Produktion führen würden. Es wird vermutet, dass die hohen Spiegel antioxidativer Enzyme in Inseln weiblicher Mäuse durch das Abfangen von ROS die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und inflammatorische Prozesse verhindern und dadurch vor einem MLD-STZ-induzierten Diabetes schützen (Friesen et al., 2004). Damit verbunden ist auch die Stimulierung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 (Müller et al., 2002).

Zusammenfassend wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass STZ ex vivo und in vitro die  $H_2O_2$ -Bildung in pankreatischen Inseln Diabetes-empfindlicher männlicher C57BL/6-Mäuse stimuliert und die Aktivität der GPX reduziert. Im Gegensatz dazu bleibt in Inseln weiblicher Mäuse die Stimulierung einer  $H_2O_2$ -Generierung durch STZ in vitro und MLD-STZ ex vivo aus, jedoch wird die Aktivität des antioxidativen Enzymes GPX in beiden Systemen gesteigert. Weiterhin wird zum ersten Mal gezeigt, dass eine Se-Mangeldiät über 3 Generationen die MLD-STZ-induzierte Hyperglykämie in männlichen C57BL/6-Mäusen verstärkt. Eine Se-angereicherte Diät ergab jedoch keine Effekte.

An Hand der dargestellten Ergebnisse ist zu erwägen, welche Strategien für eine Intervention und / oder Therapien für den Menschen zu rechtfertigen sind. So könnte durch Überexpression antioxidativer Gene die Überlebenszeit von  $\beta$ -Zelltransplantaten bei Patienten mit Typ-1-Diabetes durch Verbesserung des Abwehrstatus und Vermeidung von Abstoßungsreaktionen erhöht werden. Auch könnte untersucht werden, ob durch Intervention mit einer Kombination aus  $Zn^{2+}$  und Se bei Individuen mit einem hohen Risiko die Manifestation eines Typ-1-Diabetes verzögert werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abel J, de Ruiter N:** Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol Lett* 47:191-196, 1989

**Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H:** Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrit-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 379:1201-1205, 1998

**Aviram M:** Review of human studies on oxidative damage and antioxidative protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res* 33:85-97, 2000

**Azevedo-Martins AK, Lortz S, Lenzen S, Curi R, Eizirik DL, Tiedge M:** Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 52:93-101, 2003

**Bach JF:** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15:516-542, 1994

**Baeuerle PA, Baltimore D:** Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53:211-217, 1988

**Baeuerle PA, Henkel T:** Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 79:141-179, 1994

**Barbouti A, Doulias PT, Zhu BZ, Frei B, Galaris D:** Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA-damage. *Free Rad Biology and Medicine* 31:490-498, 2001

**Barnes PJ, Karin M:** Nuclear Factor- $\kappa$ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England J Med* 336:1066-1071, 1997

**Bauersachs S, Kirchgessner M:** Hematological parameters, selenium concentration and glutathione peroxidase activities in serum and the liver of rats at different selenium and vitamin E levels. *Z Ernährungswiss* 31:70-81, 1992

**Baynes JW:** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991

**Beckmann JS, Ye YZ, Andersen PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpe MM, White CR:** Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyer* 375:81-88, 1994

**Beckman JS:** The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide. In: *Nitric oxide: principles and actions*, J. Lancaster, ed. San Diego, CA, Academic Press, 1-82, 1996

**Behne D, Kyriakopoulos A:** Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* 21:453-473, 2001

**Behne D, Kyriakopoulos A:** A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J* 332:591-592, 1998.

**Bell RH, Sayers HJ, Pour PM, Ray MB, McCullough PJ:** Importance of diabetes in inhibition of pancreatic cancer by streptozotocin. *J Surg Res* 46:515-519, 1989

**Biesalsky F:** Antioxidanzien in der Ernährung und ihre Bedeutung für die anti-/prooxidative Balance im Immunsystem. *Immun Infekt* 23:166-173, 1995

**Bolanos JP, Almeida A:** Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1411:415-436, 1999

**Boveris A:** Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58:350-356, 1998

**Bradford MM:** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976

**Bravenboer B, Kapelle AC, Hamers FPT, van Buren T, Erkelens DW, Gispen WH:** Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia* 35:813-817, 1992

**Bray TM, Bettger WJ:** The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 8:281-291, 1990

**Brownlee M, Vlassara H, Cerami A:** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 101:527-537, 1984

**Burkhardt V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF, Kolb H:** Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozotocin. *Nature Medicine* 5:314-319, 1999

**Buttke TM, Sandström PA:** Oxidative Stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 15:7-10, 1994

**Chance B, Sies H, Boveris A:** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605, 1979

**Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD:** Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 107:2169-2179, 1988

**Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatnick J, Lazo JS, Waalkes MP:** Role of metallothionein in cancerogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:1-5, 1994

**Chubatsu LS, Meneghini R:** Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J* 291:193-198, 1993

**Clifford DP, Repine JE:** Measurement of oxidizing radicals by polymorphonuclear leukocytes. *Methods Enzymol* 105:393-398, 1984

**Cohen G:** The Fenton reaction. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, 55-63, 1993

**Combs GF, Combs SB:** The Role of Selenium in Nutrition. Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1986

**Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster Jr JR, Mc Daniel JR and ML:** Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *PNAS* 90:1731-1735, 1993

**Cornelius JG, Luttge BG, Peck AB:** Antioxidant enzyme activities in IDDM-prone and IDDM-resistant mice: a comparative study. *Free Radical Biol Med* 14:409-420, 1993

**Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Saul RL, McCord JM, Harman D:** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-545, 1987

**Desowitz RS, Barnwell JW:** Effect of selenium and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide on the vaccine-induced immunity of Swiss-Webster mice against malaria (*Plasmodium berghei*). *Infect Immun* 27:87-89, 1980

**Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, Jansen PL, van Goor H:** Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammation bowel disease. *J Pathol* 186:416-421, 1998

**Drews G, Krämer C, Düfer M, Krippreit-Drews P:** Contrasting effects of aloxan on islet and single mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem J* 352:389-397, 2000

**Eisenbarth GS:** Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314:1360-1368, 1986

**Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Hellerström C:** Preferential reduction of insulin production in mouse pancreatic islets maintained in culture after streptozotocin exposure. *Endocrinology* 122:1242-1249, 1988

**Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapoport M, Lohse AW, Cohen IR:** Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxin STZ. Immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin. *Diabetes* 43:992-998, 1994

**Elsner M, Guldbakker B, Tiedge, M, Munday R, Lenzen S:** Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528-1533, 2000

**Epp O, Ladenstein R, Wendel A:** The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0,2 nm Resolution. *Eur J Biochem* 133:51-69, 1983

**Flohe L:** Glutathione Peroxidase brought into Focus. *Free Radicals in Biology*. Academic Press, New York 5:223-254, 1982

**Friedovich I:** Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247:1-11, 1986

**Friesen NTE, Büchau AS, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H:** Generation of hydrogen peroxide and a failure of antioxidative responses in pancreatic islets is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in C57BL/6 mice. *Diabetologia* (in press)

**Friesen N, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H:** Dietary selenium deficiency aggravates hyperglycemia induced with multiple low doses of streptozotocin in male C57BL/6 mice. *Eur J Nutr* (submitted)

**Gagern von G, Zimmermann T, Albrecht S, Bachmann L, Saeger HD:** Significance of selenium in regulation of inflammatory responses by transcription factors in polytrauma patients. *Med Klin* 94:62-65, 1999

**Gille L, Schott-Ohly P, Friesen NTE, Schulte im Walde S, Udilova N, Nohl H, Gleichmann H:** Generation of hydroxylradicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro. *Pharmacol and Toxicol* 90:317-326, 2002

**Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP:** Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabet Metab* 14:25-30, 1988

**Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP:** An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40:437-438, 1985

**Graft E, Mahoney JR, Byrant RG, Earon JW:** Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *J Biol Chem* 259:3620-3624, 1984

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

**Grilli M, Memo M:** Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 57:1-7, 1999

**Grune T, Klotz LO, Gieche J, Rudeck M, Sies H:** Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 30:1243-1253, 2001

**Gutteridge JM:** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from ferric-complexes and hydrogen peroxide: an evaluation of fourteen iron chelators. *Free Radic Res* 9:119-125, 1990

**Halliwell B, Gutteridge JMC:** Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-112, 1992

**Halliwell B, Cross CE:** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102:5-12, 1994

**Halliwell B:** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 10:721-724, 1994

**Halliwell B:** Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25:439-454, 1996

**Heding LG:** Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients. *Diabetologia* 8:260-266, 1972

**Herson PS, Ashford ML:** Activation of a novel non-selective cation channel by alloxan and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the rat insulin-secreting cell line CRI-G12. *J Physiol* 501:59-66, 1997

**Ho E, Bray TM:** Antioxidants, NF- $\kappa$ B Activation, and Diabetogenesis. *Proc Exp Biol Med* 222:205-213, 1999

**Ho E, Quan N, Tsai YH, Lai WM, Bray T:** Dietary zinc supplementation inhibits NF- $\kappa$ B activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. *Exp Biol Med* 226:103-111, 2001

**Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB:** Stable Expression of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) in Insulinoma Cells prevents IL-1 $\beta$ -induced Cytotoxicity and Reduces Nitric Oxide Production. *101:1811-1820*, 1998

**Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Osnishi ST, Kean R, Champion JM, Sarker AB, Bobroski L, Farber JI, Akaike T, Maeda H, Koprowski H:** Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *PNAS* 94:2528-2533, 1997

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

**Kallmann B, Burkart V, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V, Kolb H:** Toxicity of chemically generated nitric oxide towards pancreatic islets cells can be prevented by nicotinamid. *Life Sci* 51:671-678, 1992

**Kaltschmidt B, Sparna T, Kaltschmidt C:** Activation of NF- $\kappa$ B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 1:129-144, 1999

**Karsten V, Sigrist S, Moriscot C, Benhamou PY:** Reduction of macrophage activation after antioxidant enzymes gene transfer to rat insulinoma INS-1 cells. *Immunobiology* 205:193-203, 2002

**Kehrer JP:** The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50, 2000

**Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA:** Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *PNAS* 88:7381-7387, 1991

**Kinalsky M, Sacute-Ledziewski A, Telejko B, Zarzycki W, Kinalska I:** Antioxidant therapy and streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats. *Acta Diabetologica* 36:113-117, 1999

**Klinkhammer C, Popowa P, Gleichmann H:** Specific immunity to streptozotocin: cellular requirements for induction of lymphoproliferation. *Diabetes* 37:74-80, 1988

**Klotz LO:** Oxidant-induced Signalling: effects of Peroxynitrit and Singlet Oxygen. *Biol Chem* 383:443-456, 2002

**Köhrle J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe I:** Selenium in Biology: Facts and Medical Perspectives. *Biol Chem* 381:849-864, 2000

**Kondo Y, Wo ES, Michalska AE, Choo KHA, Lazo J:** MT Null Cells have increased sensitivity to anticancer drug. *Cancer research* 55:2021-2023, 1992

**Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, Phillips JP:** Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *PNAS* 91:9956-9959, 1994

**Kubisch HM, Wang J, Bray TM, Phillips JP:** Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress. *Diabetes* 46:1563-1566, 1997

**Kyriakopoulos A, Behne D:** Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. *Rev Phys Biochem Pharmacol* 145:1-46, 2002

**Lankisch PG:** Diagnosis of chronic pancreatitis. *Lancet* 351:599-600, 1998

**LeDoux SP, Woodley SE, Patton NJ, Wilson GL:** Mechanism of nitrosourea-induced beta-cell damage. *Diabetes* 35:866-872, 1986

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

- Lgssiar A, Hassan M, Schott-Ohly P, Friesen N, Nicoletti F, Trepicchio WL, Gleichmann H:** Interleukin-11 inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with streptozotocin in mice. *Exp Biol Med* (accepted)
- Like AA, Rossini AA:** Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193:415-417, 1976
- Liou HC, Baltimore D:** Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 5:477-487, 1993
- Lipton P:** Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568, 1999
- Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsen AE, Nerup J, Lenzen S:** Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49:1123-1130, 2000
- Los M Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Dröge W, Schulze-Osthoff K:** IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO* 14:3731-3740, 1995
- Lovell MA, Ehmman WD, Butler SM, Markesbery WR:** Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594-1601, 1995
- Luppi P, Trucco M:** Immunological models of type 1 diabetes. *Horm Res* 52:1-10, 2000
- Maechler P, Jornot L, Wollheim CB:** Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274:27905-27913, 1999
- Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK, Ko KM:** Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 162:153-158, 1996
- Marklund SL, Andersen PM, Forsgren L, Nilsson P, Ohlsson PI, Wikander G, Oberg A:** Normal binding and reactivity of copper in mutant superoxide dismutase isolated from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem* 69:675-681, 1997
- Marquardt H, Schäfer SG:** Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies. In: *Toxicologie*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 94-105, 1994
- Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Haybron DM, Young HH, Ignarro LJ:** Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 262:616-620, 1992

**Matsubara J, Shida T, Ishioka K, Inada T, Machida K:** Protective effect of zinc against lethality in irradiated mice. *Environ Res* 41:558-567, 1986

**Mattson MP, Mark RJ, Furukawa K, Bruce AJ:** Disruption of brain cell ion homeostasis in Alzheimer's disease by oxy radicals and signalling pathways that protect therefrom. *Chem Res Toxicol* 10:507-517, 1997

**Mattson MP, Goodman Y:** Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res* 676:219-224, 1995

**McCord JM, Fridovich I:** Superoxide dismutase: an enzymatic function of erythrocyte superoxide reductase (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969

**McLaren NK, Neufeld M, McLaughlin, Tayler G:** Androgen Sensitization of Streptozotocin-induced Diabetes in Mice. *Diabetes* 29: 710-716, 1980

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

**Mello-Filho AC, Chubatsu LS, Meneghini R:** V79 Chinese-hamster cells rendered resistant to high cadmium concentration also becomes resistant to oxidative stress. *Biochem J* 256:475-479, 1988

**Mello-Filho AC, Meneghini R:** Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 847:82-89, 1985

**Mendola J, Wright JJ, Lacy PE:** Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis. *Diabetes* 38:379-385, 1989

**Mostert V:** Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation. *Arch Biochem Biophys* 376:433-438, 2000

**Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H:** Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 205:35-50, 2002

**Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S:** Site-specific DNA Methylation and Apoptosis: Induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology* 57:881-887, 1999

**Myint P, Deeble DJ, Beaumont PC, Blake SM, Phillips GO:** The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: steady-state and pulse radiolysis studies. *Biochim Biophys Acta* 925:194-202, 1987

**Naganuma A, Satoh M, Koymaa Y, Imura N:** Protective effects of metallothionein inducing metals on lethal toxicity of cis-diaminedichloroplatinum in mice. *Toxicol Lett* 24:203-207, 1985

**Nukatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J:** Enhancement by streptozotocin of  $O_2^-$  radical generation by xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 239:295-298, 1988

**Oberley LW:** Free radicals and diabetes. *Free Rad Med* 5:113-124, 1988

**Ohly P, Gleichmann H:** Metallothionein: In vitro induction with zinc and streptozotocin in pancreatic islets of mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103:79-82, 1995

**Ohly P, Dohle C, Abel J, Seissler J, Gleichmann H:** Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects from diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1020-1030, 2000

**Okamoto H:** Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells of islets of Langerhans. *Bioessays* 2:15-21, 1985

**Owen AD, Schapira AH, Jenner P, Mardsen CD:** Oxidative stress and Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 786:217-223, 1996

**Paglia DE, Valentine WN:** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin* 70:158-169, 1967

**Pieper GM, Felix CC, Kalyanaraman B, Turk M, Roza AM:** Detection by ESR of DMPO hydroxyl adduct formation from islets of Langerhans. *Free Radic Biol Med* 19:219-225, 1995

**Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL:** Cytokines and their roles in pancreatic islets beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55:1139-1149, 1998

**Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynadka K, Ju Q, Edelstein D, Brownlee M, Korbitt GS, Rajotte RV:** Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. *Diabetes* 48:1223-1229, 1999

**Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA:** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288:481-487, 1991

**Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A:** Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30:463-488, 2001

**Rao A:** NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15:274-281, 1994

**Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM:** Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem* 62:376-379, 1994

- Reilly C:** Selenium in Food and Health. Blackie Academic & Professional, London, 1996
- Rerup CC:** Drugs producing diabetes through damage of the insulin-secreting cells. *Pharmacol Rev* 22:485-518, 1970
- Riedel E:** Anorganische Chemie. 4. Auflage, de Gruyter, Berlin, 1999
- Romeis B:** Mikroskopische Technik. 15. Auflage, R, Oldenburg, München, 1968
- Root RK, Metcalf J, Oshino N, Chance B:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J Clin Invest* 55:945-955, 1975
- Rossini AA, Like AA, Dulin WE, Cahill GF:** Pancreatic  $\beta$ -cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes* 26:1120-1124, 1977
- Rossini AA, Williams RM, Appel MC, Like AA:** Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Nature* 276:182-184, 1978
- Rossini AA, Williams RM, Appel MC, Like AA:** Sex-differences in the multiple-dose-streptozotocin model of diabetes. *Endocrinology* 103:1518-1520, 1978
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K:** Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. *J Biol Chem* 274:2866-2871, 1999
- Salgo MG, Stone K, Squadrito GL, Battista JR, Pryor WA:** Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Comm* 210:1025-1030, 1995
- Sato M, Bremner I:** Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14:325-337, 1993
- Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA:** The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 2:13-22, 1995
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson J, Newgard CB:** STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells *Diabetes* 43:1326-33, 1994
- Schott-Ohly P, Lgssiar A, Partke HJ, Hassan M, Friesen N, Gleichmann H:** Zn<sup>2+</sup>-enriched drinking water prevents spontaneous diabetes in NOD mice. *Diabetes* (submitted)
- Schrauzer GN:** Selen. Verlag für Mediziner. Fischer, Heidelberg, 1983

**Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA:** Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17:221-237, 1992

**Schulte im Walde S, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H:** Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sci* 71:1681-1694, 2002

**Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA:** Redox signalling by transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50:735-741, 1995

**Schwartz K, Foltz CM:** Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 79:3292-3299, 1957

**Sies H:** Relationship between free radicals and vitamins: an overview. In: Elevated dosages of vitamins. Walter P, Stähelin H, Brubacer G, (Eds) Huber H Publishers, Toronto, 215-223, 1989

**Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K:** Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272:27812-27817, 1997

**Storey KB:** Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29:1715-1733, 1996

**Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC:** Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 55:342-345, 1990

**Sunde, RA:** Molecular Biology of Selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 10:451-474, 1999

**Szkudski T:** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546, 2001

**Takasu N, Komiya T, Asawa Y, Nagasawa Y, Yamada T:** Streptozotocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40:1141-1145, 1991

**Tappel AL, Hawkes WC, Wilhelmsen EC, Motsenbocker MA:** Selenocystein-containing proteins and glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 107:602-619, 1984

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

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

**Tiedge M:** Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidative enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 42:849-855, 1999

**Thornalley PJ, Vasak M:** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl-radicals. *Biochim Biophys Acta* 827:36-44, 1985

**Tisch R, McDevitt H:** Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291-297, 1996

**Uchigata Y, Yamamoto H, Nagai H, Okamoto H:** Effect of poly(ADP-ribose) synthase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32:316-318, 1983

**Verge CF, Gianani R, Yu L, Pietropaolo O, Smith T, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS:** Late progressive to diabetes and evidence for chronic  $\beta$ -cell autoimmunity in identical twins of patient with type I diabetes. *Diabetes* 44:1176-1179, 1995

**Wang Z, Dohle C, Friemann J, Green BS, Gleichmann H:** Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose. *Diabetes* 42:420-428, 1993

**Wang Z, Gleichmann H:** GLUT2 in pancreatic islets: Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47:50-56, 1998

**Weitzel F, Wendel A:** Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-Lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* 268:6288-6292, 1993

**Wilson GL, Patton NJ, McCord JM, Mullins DW, Moosmann BT:** Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia* 27:587-591, 1984

**Wilson GL, Hartig PC, Patton, LeDoux SP:** Mechanism of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthase and cellular distribution. *Diabetes* 37:213-216, 1988

**Wilson SB, Leiter EH:** Streptozotocin interactions with pancreatic  $\beta$ -cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 156:27-49, 1990

**Wilson MR, Hughes SJ:** Impaired glucose-stimulated release in islets from adults rats malnourished during foetal-neonatal life. *Mol Cell Endocrinol* 142:41-48, 1998

**Winterbourne CC, Munday R:** Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation *Biochem Pharmacol* 38:271-277, 1989

**White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA:** Superoxide and peroxynitrite in arteriosclerosis. *PNAS* 91, 1044-1048, 1994

**Wolff SP:** Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 49: 642-652, 1993

**Xu B, Moritz JT, Epstein PN:** Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic Biol Med* 27:830-837, 1999

**Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H:** Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose)-synthase in pancreatic islets. *Nature* 294:284-286, 1981

**Yang J, Cherian MG:** Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci* 55:43-51, 1994

**Zimmermann T, Albrecht S, Kuhne H, Vogelsang U, Grutzmann R, Kopprasch S:** Selenium administration in patients with sepsis syndrome. A prospective randomized study. *Med Klin* 92:3-4, 1997

**Zimmermann MB, Adou P, Torresani T, Zeder C, Hurrell RF:** Effect of oral iodized oil on thyroid size and thyroid hormone metabolism in childrens with concurrent selenium and iodine deficiency. *Eur J Clin Nutr* 54:209-213, 2000

**Zimny S, Gogolin F, Abel J, Gleichmann H:** Metallothionein in pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch Toxicol* 67:61-65, 1993

## 7. Zusammenfassung

In männlichen C57BL/6-Mäusen kann mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin (MLD-STZ) ein Diabetes induziert werden, der pathogenetisch mit dem humanen, autoimmunen Typ-1-Diabetes vergleichbar ist. Durch intraperitoneale Injektionen von jeweils 40 mg/kg Körpergewicht an 5 aufeinander folgenden Tagen erfolgen mit MLD-STZ subtoxische Effekte auf die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen, gefolgt von T-zellabhängigen Immunreaktionen. Dabei werden unspezifische und STZ-spezifische inflammatorische Reaktionen ausgelöst. Als unspezifische Mediatoren der  $\beta$ -Zellzerstörung werden reaktive Sauerstoffe (ROS) angenommen, von denen die Spezies Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eine Vorstufe für die Bildung der hochreaktiven Hydroxylradikale ist. Einen physiologischen Schutz gegenüber zellschädigenden Effekten von ROS bilden intrazelluläre antioxidative Systeme wie die Superoxiddismutase, die Katalase und die Selen-abhängige Glutathionperoxidase (GPX).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ex-vivo-Effekt von MLD-STZ auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und das antioxidative Enzym GPX in Diabetes-empfindlichen männlichen und Diabetes-resistenten weiblichen C57BL/6-Mäusen sowie der In-vitro-Effekt von STZ auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und die GPX-Aktivität in isolierten Inseln untersucht. Es wird erstmals gezeigt, dass MLD-STZ in pankreatischen Inseln männlicher Mäuse die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung stimuliert und die GPX-Aktivität reduziert. Im Gegensatz dazu bleibt in Inseln weiblicher Mäuse die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach MLD-STZ aus, jedoch wird die GPX-Aktivität verstärkt. Auch in vitro stimuliert die Inkubation mit STZ die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung dosisabhängig nur in Inseln männlicher Mäuse und reduziert die Aktivität der GPX. In Inseln weiblicher Mäuse hingegen erfolgt durch STZ keine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung, aber eine Steigerung der GPX-Aktivität. Weiterhin wird erstmals gezeigt, dass eine Selenmangelernährung über 3 Generationen nach MLD-STZ-Behandlung in männlichen C57BL/6-Mäusen zu einer verstärkten Hyperglykämie führt. Alle beschriebenen Effekte waren signifikant ( $p < 0,05$ ).

Es wird geschlußfolgert, dass in der Diabetes-Pathogenese die gesteigerte, lokale ROS-Bildung und der erniedrigte antioxidative Status der  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle spielen.

## Curriculum Vitae

<b>Name</b>	Nadira Tanja Elke Friesen
<b>Geburtsdatum /-ort</b>	26. September 1973 in Duisburg
<b>Nationalität</b>	Deutsch
<b>Familienstand</b>	Ledig
<b>Schulbildung</b>	
03.1978 - 03.1979	Deutsche Schule Johannesburg, RSA
08.1980 - 07.1984	Montessori-Grundschule, Düsseldorf
08.1984 - 07.1990	Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf
08.1990 - 04.1993	Reinhard- und Max-Mannesmann-Gymnasium, Duisburg, Schulabschluss: Abitur
<b>Ausbildung</b>	
08.1993 - 04.1994	Zahntechnikerin, Dental Stolle, Duisburg
<b>Studium</b>	
10.1994 - 06.2000	Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
06.1997	Vordiplom / Vertiefungsgebiete: Zoologie, Geobotanik, Geologie
09.1999 - 06.2000	Diplomarbeit: Institut für Zoologie, Zoomorphologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf „Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Integument von <i>Epipedobates tricolor</i> “
06.2000	Studienabschluss: Diplom-Biologin
seit 09.2000	Doktorandin am Deutschen Diabetes Forschungsinstitut, Abteilung Immun-Toxikologie und Immun-Pathologie, Düsseldorf; Voraussichtlicher Titel der Doktorarbeit: „Die Generierung von Wasserstoffperoxid und die Reduktion der Glutathionperoxidase-Aktivität ist assoziiert mit Diabetes, induziert mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin in männlichen C57BL/6-Mäusen“

## **Praxiserfahrungen**

- 05.1996 - 10.1996 Studentische Hilfskraft, Kinderklinik Schlossmannhaus, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 10.1999 - 06.2000 Studentische Hilfskraft, Institut für Zoologie, Zoomorphologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 08.2000 - 01.2002 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 02.2002 - 12.2003 Wissenschaftliche Hilfskraft, Deutsches Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf
- seit 01.2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, BAT IIa/2, Sonderforschungsbereich „Molekulare und zelluläre Mediatoren exogener Noxen“, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

## **Praktika**

- „Morphologische Techniken“  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund
- 02.2002 Versuchstierkundlicher Kurs (Fachkundennachweis gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes)  
Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 des geltenden Tierschutzgesetzes für Versuche mit Wirbeltieren

## **Kooperation / Arbeiten als Gastwissenschaftlerin**

Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Prof. Dr. H. Sies, PD Dr. L.-O. Klotz, Düsseldorf,  
Sonderforschungsbereich 503 „Molekulare und zelluläre Mediatoren exogener Noxen“, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf,  
Abteilung Strukturforschung und Spurenelemente, Hahn-Meitner-Institut, Prof. Dr. D. Behne, Berlin

Düsseldorf, 29. Januar 2004

Nadira Friesen

## Veröffentlichungen

- Originalarbeiten**
- Gille L., P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, S. Schulte im Walde, N. Udilova, H. Gleichmann  
Generation of hydroxylradicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro  
Pharmacol Toxicol 90:317-326, 2002
- N.T.E. Friesen**, A.S. Büchau, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
Generation of hydrogen peroxide and a failure of antioxidative responses in pancreatic islets is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in C57BL/6 male mice  
Diabetologia (in press)
- Abdelhakim Lgssiar, Mohammed Hassan, Patricia Schott-Ohly, **Nadira Friesen**, Ferdinando Nicoletti, William H. Trepicchio, and Helga Gleichmann  
Interleukin-11 inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice  
Exp Biol And Med (accepted)
- P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, **N.T.E. Friesen**, H. Gleichmann  
Zn<sup>2+</sup>-enriched drinking water prevents spontaneous diabetes in NOD mice. Diabetes (submitted)
- N. Friesen**, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
Dietary selenium-deficiency aggravates hyperglycemia induced with multiple low doses of streptozotocin in male C57BL/6 mice  
Eur J Nutrition (submitted)
- Vorträge**
- Nadira Friesen**, Patricia Schott-Ohly, Claudia Dohle, Helga Gleichmann  
Generation of hydrogen peroxide by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro  
7. Inselworkshop der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Münster, 14.- 15. Dezember 2001
- Präsentationen**
- Friesen N.T.E.**, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
STZ-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in pancreatic islets of mice in vitro  
(37. Jahrestagung der Deutschen-Diabetes-Gesellschaft, Dresden, 2002)

**Friesen N.T.E.**, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
STZ-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in pancreatic islets of mice in vitro  
(38. Jahrestagung der Deutschen-Diabetes-Gesellschaft, Bremen, 2003)

**Friesen N.T.E.**, A. S. Büchau, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
Diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin is associated with generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and deficient antioxidant enzyme responses in pancreatic islets of C57BL/6 mice  
(18<sup>th</sup> International Diabetes Federation Congress, Paris, 24.- 29. August 2003)

## Abstracts

**Friesen N.T.E.**, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
STZ-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in pancreatic islets of mice in vitro  
Diabetes und Stoffwechsel 11:56, 2002

Lgssiar A., P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, H. Gleichmann  
Reduction of IL-4, IL-10, and IL-11 in pancreatic islets is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin  
Diabetes und Stoffwechsel 11:55, 2002

Lgssiar A., M. Hassan, **N.T.E. Friesen**, A. Büchau, P. Schott-Ohly, H. Gleichmann  
Susceptibility of immune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin (MLD-STZ) is associated with down-regulation of anti-inflammatory cytokines, generation of reactive oxygen species, and activation of NF- $\kappa$ B and AP-1  
Immunobiology 206:121, 1.8, 2002

Lgssiar A, M. Hassan, P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, A.S. Büchau, F. Nicoletti, H. Gleichmann  
Recombinant human interleucine-11 inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 in pancreatic islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin  
Diabetes und Stoffwechsel, 12:55, 2003

**Friesen N.T.E.**, A. S. Büchau, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar, H. Gleichmann  
Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and failure of upregulation of antioxidative enzymes in pancreatic islets of C57BL/6 mice is associated with susceptibility for diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin  
Diabetes und Stoffwechsel, 12:135, 2003

## Abstracts

Schott-Ohly P, H.-J. Partke, A. Lgssiar, **N.T.E. Friesen**, A.S. Büchau, H. Gleichmann

Zn<sup>2+</sup>-enriched drinking water prevented spontaneous diabetes in NOD mice

Diabetes und Stoffwechsel, 12:133, 2003

Lgssiar, A., M. Hassan, P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, F. Nicoletti, H. Gleichmann

Recombinant human interleukin-11 inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in pancreatic islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin

Diabetes 52: A66 [Suppl 2], 2003

Gleichmann H., A. Lgssiar, P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, F. Nicoletti

Prevention of mouse diabetes with Zn<sup>2+</sup> and rhIL-11

(Joslin Diabetes Centre 2003 Symposium, Boston, May 4-6, 2003)

**Friesen N.T.E.**, A. S. Büchau, P. Schott-Ohly, A. Lgssiar; H. Gleichmann

Diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin is associated with generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and deficient antioxidant enzyme responses in pancreatic islets of C57BL/6 mice

Diabetologia (2003) 46: [Suppl 2]: I-III, 513

Schott-Ohly P., H.-J. Partke, A. Lgssiar, **N.T.E. Friesen**; A.S. Büchau, H. Gleichmann

Zn<sup>2+</sup>-enriched drinking water prevented spontaneous diabetes in NOD mice

Diabetologia (2003) 46: [Suppl 2]: I-III, 517

Lgssiar A, M. Hassan, P. Schott-Ohly, **N.T.E. Friesen**, A.S. Büchau, F. Nicoletti, H. Gleichmann

Recombinant human interleukin-11 inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in pancreatic islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin

Diabetologia (2003) 46: [Suppl 2]: I-III, 18

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Düsseldorf, 29. Januar 2004

# **Die Generierung von Wasserstoffperoxid und die Reduktion der Glutathionperoxidase-Aktivität ist assoziiert mit Diabetes, induziert mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin in männlichen C57BL/6-Mäusen**

Dipl. Biol. Nadira T.E. Friesen

## **Zusammenfassung**

In männlichen C57BL/6-Mäusen kann mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin (MLD-STZ) ein Diabetes induziert werden, der pathogenetisch mit dem humanen, autoimmunen Typ-1-Diabetes vergleichbar ist. Durch intraperitoneale Injektionen von jeweils 40 mg/kg Körpergewicht an 5 aufeinander folgenden Tagen erfolgen mit MLD-STZ subtoxische Effekte auf die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen, gefolgt von T-zellabhängigen Immunreaktionen. Dabei werden unspezifische und STZ-spezifische inflammatorische Reaktionen ausgelöst. Als unspezifische Mediatoren der  $\beta$ -Zellerstörung werden reaktive Sauerstoffe (ROS) angenommen, von denen die Spezies Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eine Vorstufe für die Bildung der hochreaktiven Hydroxylradikale ist. Einen physiologischen Schutz gegenüber zellschädigenden Effekten von ROS bilden intrazelluläre antioxidative Systeme wie die Superoxiddismutase, die Katalase und die Selen-abhängige Glutathionperoxidase (GPX).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ex-vivo-Effekt von MLD-STZ auf die  $H_2O_2$ -Bildung und das antioxidative Enzym GPX in Diabetes-empfindlichen männlichen und Diabetes-resistenten weiblichen C57BL/6-Mäusen sowie der In-vitro-Effekt von STZ auf die  $H_2O_2$ -Bildung und die GPX-Aktivität in isolierten Inseln untersucht. Es wird erstmals gezeigt, dass MLD-STZ in pankreatischen Inseln männlicher Mäuse die  $H_2O_2$ -Bildung stimuliert und die GPX-Aktivität reduziert. Im Gegensatz dazu bleibt in Inseln weiblicher Mäuse die Bildung von  $H_2O_2$  nach MLD-STZ aus, jedoch wird die GPX-Aktivität verstärkt. Auch in vitro stimuliert die Inkubation mit STZ die  $H_2O_2$ -Bildung dosisabhängig nur in Inseln männlicher Mäuse und reduziert die Aktivität der GPX. In Inseln weiblicher Mäuse hingegen erfolgt durch STZ keine  $H_2O_2$ -Bildung, aber eine Steigerung der GPX-Aktivität. Weiterhin wird erstmals gezeigt, dass eine Selenmangelernährung über 3 Generationen nach MLD-STZ-Behandlung in männlichen C57BL/6-Mäusen zu einer verstärkten Hyperglykämie führt. Alle beschriebenen Effekte waren signifikant ( $p < 0,05$ ).

Es wird geschlußfolgert, dass in der Diabetes-Pathogenese die gesteigerte, lokale ROS-Bildung und der erniedrigte antioxidative Status der  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle spielen.

