

# **Untersuchungen zum Einfluss des Diabetes mellitus auf die extrazelluläre Superoxiddismutase**

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

**Christiane Bellin**  
aus Mönchengladbach

Düsseldorf

2004

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

Referent: Prof. Dr. P. Rösen

Koreferent: Prof. Dr. H. Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2001 bis Oktober 2004 im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie am Deutschen Diabetes-Zentrum, Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. D. Müller-Wieland) unter Anleitung von Herrn Professor Dr. P. Rösen und Herrn Professor Dr. H. Weber angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Rösen für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute fachliche Anleitung mit vielen konstruktiven Diskussionen. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich für seine großzügige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Kongressreisen, durch die er mir ermöglichte meine Ergebnisse sowohl im nationalen als auch in einem internationalen Umfeld zu diskutieren.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Weber möchte ich mich bedanken, für seine Freundlichkeit diese Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu vertreten und für seine Hilfsbereitschaft bei der Organisation der Formalitäten.



Et hätt noch immer jot jejange.

*K. Beikircher,  
Artikel 3, Rheinisches Grundgesetz*

Für meine Familie  
und  
für meinen Freund Christian Ebenau



---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Kardiovaskuläre Sekundärkomplikationen im Diabetes mellitus .....	3
1.2	Das Endothel als Zielstruktur der kardiovaskulären Schädigung .....	4
1.3	Vaskulärer oxidativer Stress als Ursache der im Diabetes verringerten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid .....	7
1.3.1	Die entkoppelte NO <sup>•</sup> -Synthese als Radikalgenerator.....	8
1.3.2	Die mitochondrielle Produktion von ROS .....	8
1.3.3	Generierung von ROS über alternative Stoffwechselwege des Glucosemetabolismus .....	9
1.4	Antioxidative Schutzmechanismen im Diabetes .....	11
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
3.1	Substanzen und Puffer .....	21
3.2	Tierexperimentelle Methoden .....	24
3.2.1	Tierhaltung .....	24
3.2.2	Diabetes-Induktion und Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage.....	25
3.2.3	Fütterung .....	26
3.2.4	Transgene Tierlinie .....	26
3.2.5	Organentnahme .....	27
3.3	Zellkultur.....	28
3.3.1	Zellkultivierung.....	28
3.3.2	Präparation von glatten Muskelzellen aus Rattenaorta .....	29
3.3.3	Charakterisierung der RASMC .....	29
3.3.4	Doppelfärbung mit Propidiumiodid .....	30
3.3.5	Nachweis von Radikalen mittels Fluoreszenzfärbung .....	31
3.3.6	Doppelfärbung mit Mitotracker Red und DCF .....	33
3.3.7	Stimulation der Zellen.....	34
3.4	Biochemische Methoden .....	38
3.4.1	Proteinbestimmung.....	38
3.4.2	Anreicherung der ecSOD .....	38

---

3.4.3	Aktivitätsbestimmung der ecSOD.....	39
3.4.4	Western Blot.....	40
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.5.1	Präparation und Analyse von Gesamt-RNA .....	42
3.5.2	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	44
3.6	Statistik.....	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
4.1	Glatte Muskelzellen aus Rattenaorten als Zellmodell.....	49
4.2	Einfluss von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen auf die ecSOD in RASMC.....	52
4.2.1	Untersuchungen zum Einfluss von hoher Glucose auf ecSOD in RASMC.....	53
4.2.2	Untersuchungen zum Einfluss von Radikalbildnern auf die ecSOD .....	57
4.2.3	Veränderungen der ecSOD durch Eingriff in den Glucosestoffwechsel.....	59
4.2.4	Bedeutung inflammatorischer Cytokine bei der Regulation der ecSOD .....	61
4.2.5	Einfluss auf die ecSOD durch Regulation der PKC.....	63
4.2.6	Untersuchungen zum Einfluss von NO <sup>•</sup> auf ecSOD in RASMC.....	67
4.3	STZ-Ratten – ein diabetisches Tiermodell.....	72
4.4	Untersuchungen zum oxidativen Stress in ausgewählten Organen STZ-diabetischer Ratten.....	77
4.4.1	ecSOD in Nieren von STZ-diabetischen Ratten .....	77
4.4.2	ecSOD in Herzen von STZ-diabetischen Ratten.....	82
4.4.3	ecSOD in Aorten von STZ-diabetischen Ratten .....	85
4.5	Einfluss der Inhibition der NO-Synthase auf die ecSOD.....	87
4.6	Untersuchungen zum Einfluss des eNOS knock out auf die ecSOD .....	95
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>101</b>
5.1	Methoden zur Untersuchung der extrazellulären Superoxid-dismutase .....	104
5.1.1	RASMC als <i>in vitro</i> -Zellmodell zur Untersuchung des antioxidativen Enzyms ecSOD.....	104
5.1.2	Die Bestimmung der ecSOD-Aktivität mit der NBT-Methode .....	104
5.2	Regulation der ecSOD im <i>in vitro</i> Zellmodell der RASMC .....	107
5.2.1	Die Bedeutung von NO <sup>•</sup> bei der Regulation der ecSOD.....	108
5.2.2	Cytokine induzieren die ecSOD-Aktivität .....	109
5.2.3	ROS-abhängige Regulation der ecSOD .....	110

---

5.3	Modulation der ecSOD im Tiermodell der Streptozotozin-diabetischen Ratte .....	116
5.3.1	Die Streptozotocin-diabetische Ratte als IDDM Modell .....	117
5.3.2	Untersuchungen zur Regulation der ecSOD in ausgewählten Organen STZ- diabetischer Ratten .....	118
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>148</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	151
	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	154
	Publikationen .....	157
	Preise und Stipendien .....	158
	Lebenslauf .....	159
	Danksagung .....	161



# **1 EINLEITUNG**

---



## 1.1 Kardiovaskuläre Sekundärkomplikationen im Diabetes mellitus

Diabetes mellitus beschreibt einen pathologischen Formenkreis, der alle Arten der akuten und chronischen Hyperglycämie einschließt, die mit einer Störung des Kohlenhydrat- und Lipid-Intermediärstoffwechsels einhergehen<sup>1</sup>. Grundsätzlich sind zwei Formen des Diabetes mellitus nach Ätiologie und Symptomatik zu unterscheiden. Bei Typ I handelt es sich um eine genetisch prädisponierte Diabetesform, die durch eine eingeschränkte bzw. völlige Einstellung der residualen Insulinproduktion (**absoluter** Insulinmangel, syn. *insulin dependent diabetes mellitus, IDDM*)<sup>2</sup> gekennzeichnet ist. Bei Typ II liegt ein **relativer** Insulinmangel vor, da bei dieser Form des Diabetes eine variable Kombination aus Insulinresistenz und Insulinmangel besteht (syn. *non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM*)<sup>2</sup>.

Seit Einführung der Insulintherapie sind weniger die akuten Stoffwechsellentgleisungen als vielmehr die Sekundärkomplikationen für eine erhöhte Mortalität und eine erheblich eingeschränkte Lebensqualität verantwortlich. Einen Beitrag zur Reduktion der Sekundärkomplikationen leistet nicht zu letzt die normnahe Einstellung der Blutglucosespiegel. Die Sekundärkomplikationen stellen hauptsächlich kardiovaskuläre Erkrankungen dar<sup>1</sup>. In großen prospektiven klinischen Studien wie DCCT und UKPDS wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen Hyperglycämie und dem Auftreten von Angiopathien nachgewiesen<sup>3,4</sup>. Dabei gelten nicht nur die chronische Hyperglycämie, sondern ebenso die akuten postprandialen Blutzuckerspitzen als Ursache für die Entwicklung der kardiovaskulären Folgeschäden. Das Einführen der Insulintherapie steigerte die Lebenserwartung der Patienten, sodass zunehmend die Inzidenz der Sekundärkomplikationen den Verlauf und die Prognose des Diabetes mellitus bestimmt<sup>1</sup>.

Die Mikroangiopathie betrifft vor allem die Retina, die renalen Glomeruli und das periphere Nervensystem, und führt in der Konsequenz in diesen Organen zu Katarakten, terminalem Nierenversagen und Polyneuropathie<sup>5</sup>. Auch das Herz wird aufgrund der Schädigung der kleinen Blutgefäße und Kapillaren zu den Organen gezählt, in denen mikrovaskuläre Gefäßschäden auftreten. Bei der Makroangiopathie handelt es sich um atherosklerotische Veränderungen der großen Widerstands- und Leitungsgefäße. Dazu zählen hauptsächlich die Aorta, die Koronararterien und die Mesenterialarterien. Die diabetische Makroangiopathie ist jedoch zusätzlich zu den für Atherosklerose typischen Veränderungen (erhöhte

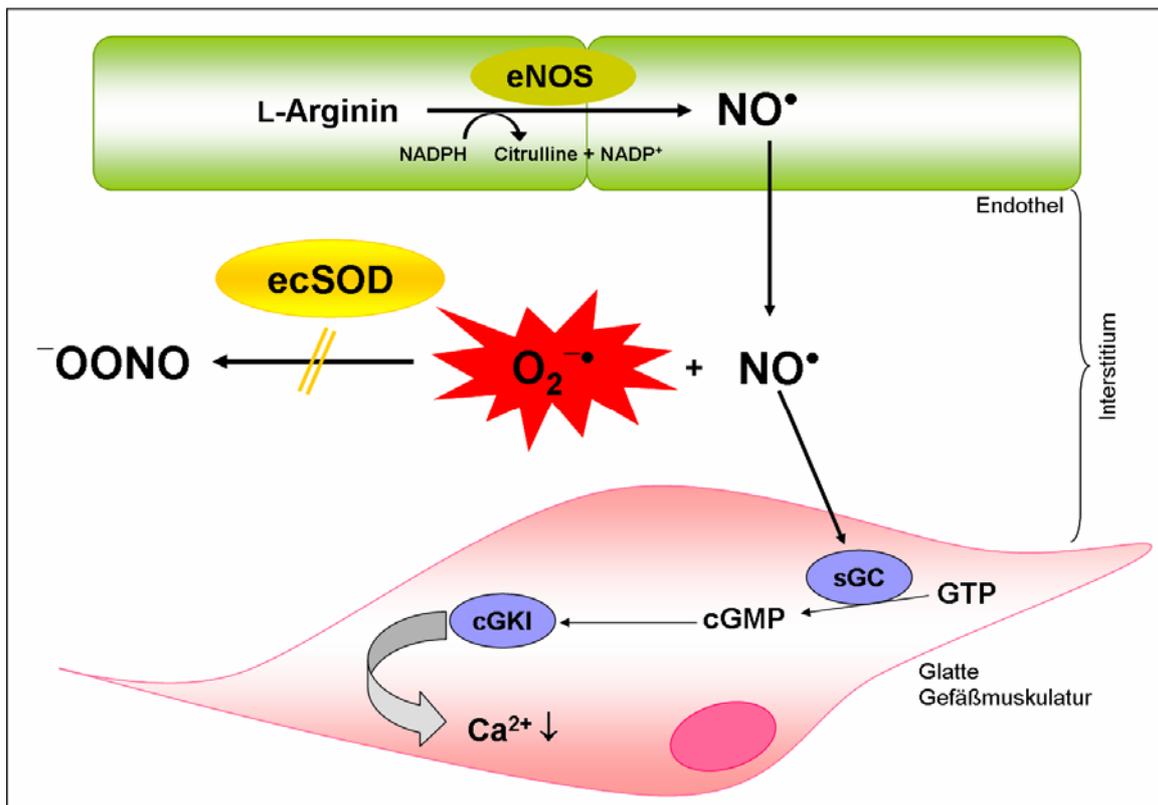
Plättchenaggregation, verringerte Fibrinolyse) auf hyperglycämieinduzierte, proatherogene Mediatoren, z.B. Bildung von AGE-Produkten, zurückzuführen<sup>6</sup>. Sie stellt eine gravierende Komplikation mit fatalen Folgen wie koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder apoplektischem Insult dar. Im Gegensatz zur Atherosklerose bei Nichtdiabetikern setzt die Makroangiopathie bei Diabetikern in früheren Lebensstadien ein und nimmt einen schwereren Verlauf<sup>7</sup>. Die frühe Mortalität der Diabetiker ist vor allem auf die Entwicklung der Makroangiopathie zurückzuführen<sup>8;9</sup>.

## 1.2 Das Endothel als Zielstruktur der kardiovaskulären Schädigung

Pathophysiologisch sind die Angiopathien unter anderem gekennzeichnet durch einen veränderten Blutfluß, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und eine veränderte Endothelfunktion. Die Endothelfunktion wird als Marker benutzt, um über die Reaktivität der Gefäße gegenüber vasoaktiven Neurotransmittern und zirkulierenden Hormonen eine Aussage zu treffen<sup>8;10</sup>.

Das Endothel ist die Schicht, die als Monolayer die luminale Seite aller Blutgefäße auskleidet. Über so genannte *tight junctions* sind die einzelnen Zellen des Endothels miteinander verbunden und stellen so eine Barrierefunktion dar. Die Endothelzellschicht ist über interzellulären Stoffaustausch und die Sezernierung vasoaktiver Substanzen in den Interstitialraum an der Gefäßreaktivität beteiligt<sup>10</sup>. Dabei fungieren Angiotensin II und Endothelin als vasokontrahierende<sup>10</sup> und Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>)<sup>11</sup> und Prostacyclin<sup>12</sup> als vasodilatierende Substanzen. Die im Diabetes beobachtete Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen ist möglicherweise ebenfalls auf eine gestörte Endothelfunktion zurückzuführen<sup>13</sup>. Die komplexen Veränderungen des Endothels, die sowohl phänotypische als auch funktionelle Modulationen der Eigenschaften umfassen, werden auch als "endotheliale Dysfunktion" beschrieben<sup>14;15</sup>. Es wird als gesichert angesehen, dass die im Diabetes auftretenden atherosklerotischen Veränderungen initial auf eine endotheliale Dysfunktion zurückzuführen sind<sup>10;16-19</sup>. Auf funktioneller Ebene wird die endotheliale Dysfunktion hauptsächlich durch die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation charakterisiert, die auf einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) in der Gefäßwand basiert. Das früher als EDRF beschriebene Stickstoffmonoxid ist ein essentieller Mediator für die Reaktivität der Gefäße<sup>20-22</sup>.

Das lipophile, als Radikal sehr kurzlebige Molekül Stickstoffmonoxid diffundiert frei durch Membranen. Seine vasoprotektiven Eigenschaften beinhalten unter anderem antiaggregatorische Wirkungen auf Thrombozyten<sup>23</sup> und antiadhäsive Wirkungen auf Leukozyten<sup>24</sup>. Fernerhin wirkt NO<sup>•</sup> antiproliferativ<sup>25</sup> und antioxidativ<sup>26</sup>. Die am besten bekannte Wirkung stellt jedoch der blutdruckregulierende Einfluss auf die glatte Gefäßmuskulatur dar<sup>27</sup>. Eine Einschränkung der NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit stellt daher die Ursache von Gefäßschäden dar, die auf eine verminderte Vasorelaxation zurückgeführt werden können<sup>28</sup>. Die NO<sup>•</sup>-vermittelte Vasorelaxation verläuft über eine Signalkaskade, bei der es nach Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und weitergehender Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGKI) zu einer Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt (s. Abb. 1.1).



**Abb. 1.1** Vasorelaxierende Wirkung von Stickstoffmonoxid und Inaktivierung von NO<sup>•</sup> durch Superoxidradikale.

Das aus L-Arginin synthetisierte NO<sup>•</sup> diffundiert durch das Interstitium an die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, wo es über einen cGMP-abhängigen Mechanismus die Vasorelaxation bewirkt. NO<sup>•</sup> kann durch Superoxidradikale inaktiviert werden, wodurch in der Folge die Vasorelaxation eingeschränkt wird. NO<sup>•</sup> = Stickstoffmonoxid; OONO<sup>-</sup> = Peroxynitrit; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> = Superoxidradikal; GTP = Guanosintriphosphat; cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat.

Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid erfolgt enzymatisch durch die Umsetzung von L-Arginin unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und  $\text{NO}^{\bullet}$ <sup>29</sup>. Das beteiligte Enzym, die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Synthase (NOS), setzt diese Reaktion unter Beteiligung weiterer Kofaktoren um. Dazu gehören Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Adenin-Mononucleotid (FMN)<sup>30</sup> (s. Abb. 1.2).

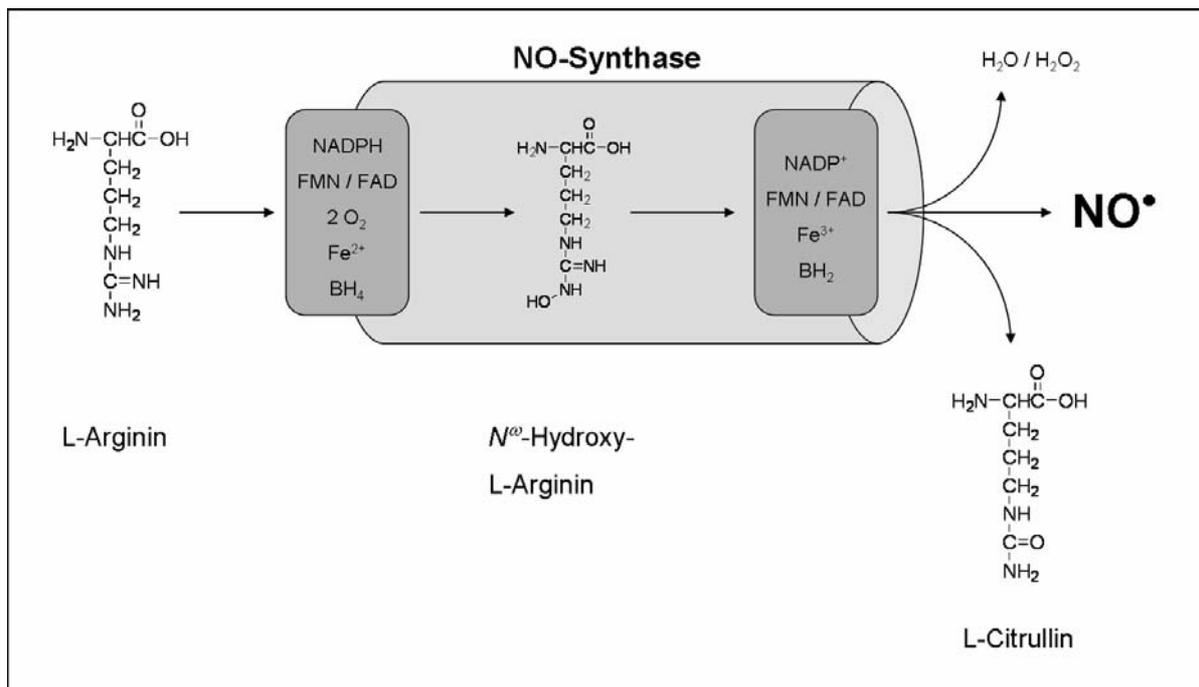


Abb. 1.2 Biosynthese von Stickstoffmonoxid

Die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Synthasen stellen eine Enzymfamilie dar, deren Isoformen sich je nach Lokalisation in ihrer Induktivität und Kapazität unterscheiden. Hier sind in diesem Zusammenhang die endotheliale NOS (eNOS), die konstitutiv in Endothelzellen exprimiert wird, und die induzierbare NOS (iNOS), die unter anderem in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen exprimiert wird, hervorzuheben.

### 1.3 Vaskulärer oxidativer Stress als Ursache der im Diabetes verringerten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid

Im Diabetes mellitus liegt eine gestörte NO<sup>•</sup>-Signaltransduktionskette vor<sup>31</sup>, die auf einer verringerten NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit basiert. Die Folge ist die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion<sup>32</sup>. Ursächlich wurden zunächst zwei Möglichkeiten der verringerten Bioverfügbarkeit diskutiert: Zum einen eine verminderte Expression bzw. Aktivität der eNOS, die in einer reduzierten NO<sup>•</sup>-Konzentration resultiert, zum anderen eine verstärkte Degradation von NO<sup>•</sup>. In Endothelzellen konnte jedoch unter Einfluss von hohen Glucosekonzentrationen bzw. Diabetes eine verstärkte Expression und eine erhöhte Aktivität der eNOS gezeigt werden<sup>33;34</sup>. Damit kann die verringerte NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit nur noch über eine verstärkte Degradation erklärt werden. Hierbei wird der "vaskuläre oxidative Stress" als eine mögliche Ursache vermutet<sup>35</sup>. Der Begriff "vaskulärer oxidativer Stress" wird als Dysbalance zwischen Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und verringerter antioxidativer Kapazität der Zellen definiert<sup>15;36</sup>. Reaktive Sauerstoffspezies (syn. *reactive oxygen species*, ROS) stellen eine Klasse von Sauerstoffintermediaten dar, zu der sowohl radikalische (z.B. Superoxidradikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, Hydroxylradikal HO<sup>•</sup>) als auch nicht-radikalische Verbindungen (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gezählt werden. Besondere Bedeutung besitzt vor allem das hoch reaktive Superoxidradikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Superoxidradikale entstehen endogen durch enzymatische Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Oxidasen. Neben der Einschränkung der NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit sind ROS unter anderem auch an der Induktion von Apoptose<sup>37</sup>, der gesteigerten Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen<sup>38;39</sup> und der vermehrten Lipidperoxidation<sup>40</sup> beteiligt.

Aus vielen Untersuchungen folgt, dass wahrscheinlich ein kausaler Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von oxidativem Stress und der Entwicklung einer diabetes-assoziierten endothelialen Dysfunktion besteht<sup>41-44</sup>. Dabei ist die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxidradikalen von zentraler Bedeutung. Abhängig von der basalen NO<sup>•</sup>-Konzentration reagiert Superoxid mit NO<sup>•</sup> in einer sehr schnellen bimolekularen Reaktion zum cytotoxischen Peroxynitrit ( $k_m = 6,7 * 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>45</sup>.

Die Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies, die bei der Diabeteserkrankung zur Gefäßschädigung aufgrund der Verminderung der NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit führt, ist seitdem Gegenstand intensiver Forschung. Aktuell werden drei grundsätzliche Wege der ROS-Synthese diskutiert:

- Die "entkoppelte" NOS als Radikalgenerator
- Die mitochondrielle Produktion von ROS
- Generierung von ROS über alternative Stoffwechselwege des Glucosemetabolismus

### 1.3.1 Die entkoppelte NO<sup>•</sup>-Synthase als Radikalgenerator

Da im Diabetes eine gleichzeitige Akzeleration von NO<sup>•</sup> und Superoxidradikalen vorliegt, führt dies zu einem exzessiven Anstieg von Peroxynitrit<sup>46</sup>. Dieses cytotoxische Agens ist in der Lage Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), den Kofaktor der NOS, zu Dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) zu oxidieren, sodass es zu einer Verarmung der NOS an BH<sub>4</sub> kommt<sup>47</sup>. Unter den Bedingungen der BH<sub>4</sub>-Defizienz befindet sich die NOS in einem "entkoppelten" Zustand, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das Enzym den Elektronentransport auf molekularen Sauerstoff an Stelle des L-Arginins überleitet, so dass die NOS Superoxid statt NO<sup>•</sup> und L-Citrullin produziert. Dieser Zustand wurde für die konstitutive eNOS und die induzierbare Form der NOS beschrieben<sup>47;48</sup>. In diesem entkoppelten Zustand stellt die NOS selbst eine Radikalquelle dar.

### 1.3.2 Die mitochondrielle Produktion von ROS

Unter hyperglycämischen Bedingungen, wie sie pathophysiologisch im Diabetes auftreten, kommt es zu einer vermehrten Glycolyse. Über den anschließenden Citratcyclus werden insgesamt mehr Reduktionsequivalente wie NADH und FADH<sub>2</sub> gebildet, die in die mitochondrielle Elektronentransportkette zur Generierung von ATP eingehen. Bei Überlastung der Atmungskette durch Übersteigen eines Schwellenwertes<sup>49</sup> an einfließenden Reduktionsequivalenten, kommt es zu einer Erhöhung der elektrochemischen Potentialdifferenz entlang der inneren Mitochondrienmembran<sup>50</sup>, woraus eine längere Halbwertszeit von superoxidbildenden Elektronentransportintermediaten wie Ubisemichinon resultiert. Dies führt in der Folge zu einem massiven Anstieg von Sauerstoffradikalen, deren Konzentration über weitere Stoffwechselwege im Glucosemetabolismus noch erhöht wird.

### 1.3.3 Generierung von ROS über alternative Stoffwechselwege des Glucosemetabolismus

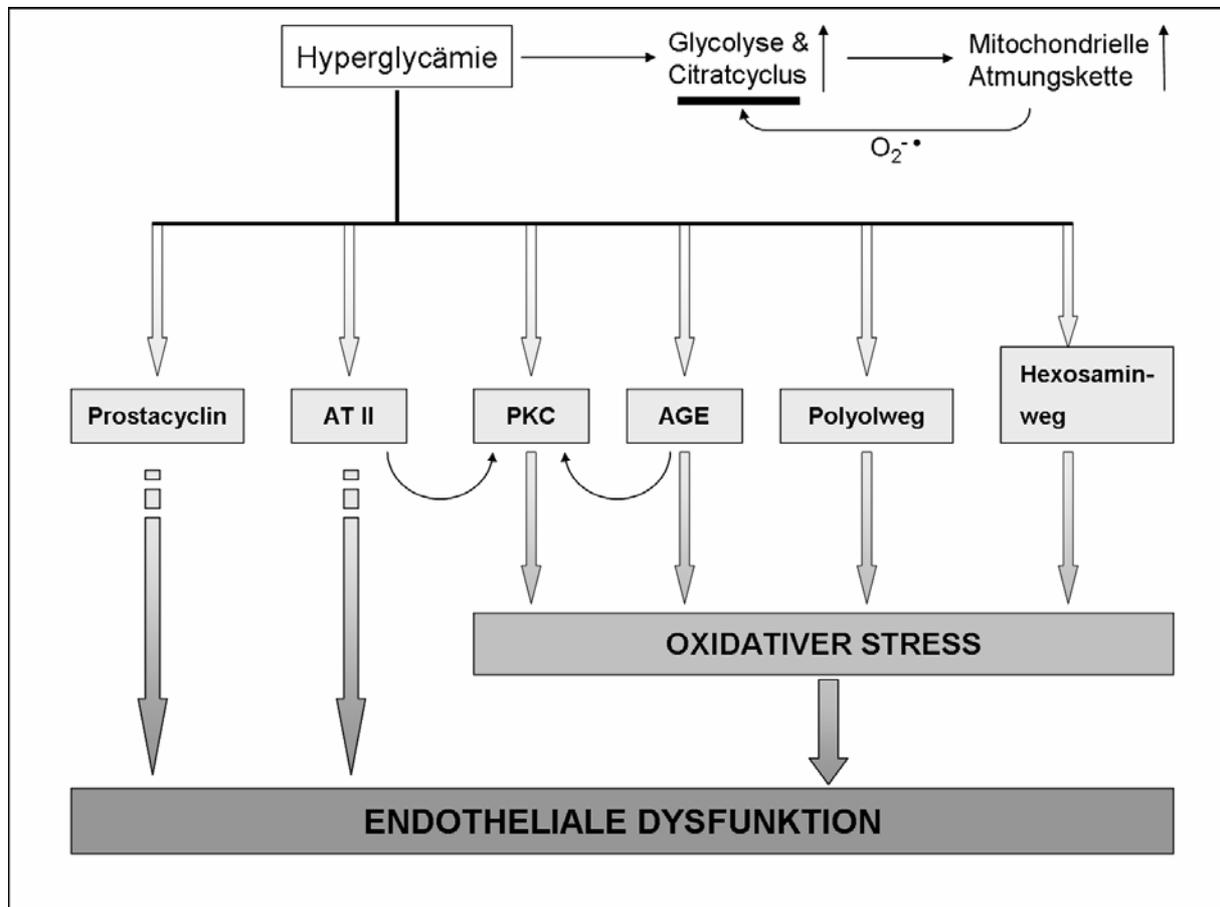
Die ROS-Überproduktion der Atmungskette bewirkt eine Inhibition der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die innerhalb der Glycolyse ein Schlüsselenzym in der Umsetzung von Triosephosphaten zu Pyruvat darstellt. Es kommt zu einer Akkumulation von Zuckerphosphaten *upstream* der GAPDH-Umsetzung, sodass im weiteren Verlauf alternative Stoffwechselwege genutzt werden, um Glucose zu metabolisieren.

Der **Polyolweg** führt über zwei Mechanismen zu einer weiteren Vermehrung der ROS. Die Umlagerung von Glucose zu Sorbitol und Fructose erfolgt unter Beteiligung der Elektronendonatoren NADPH und NADH. Vor allem NADPH wird zur Regeneration des antioxidativ wirkenden Glutathion benötigt. Diese Regeneration ist durch einen erhöhten NADPH-Verbrauch im Polyolstoffwechsel verringert. Die verminderte Konzentration des Glutathion führt zu einer verringerten antioxidativen Kapazität der Zelle und damit einem Vorliegen höherer Konzentrationen reaktiver Sauerstoffintermediate.

Durch die Verstoffwechslung der Glucose über den **Hexosamin-Signalweg** wird UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) synthetisiert. Die *N*-Acetylglucosaminylierung begünstigt die O-Glycosylierung von Transkriptionsfaktoren wie SP-1, durch deren Aktivierung Gewebewachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 sowie der Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI-1 vermehrt synthetisiert wird<sup>51</sup>. Durch TGF werden verschiedene Signalwege beeinflusst, die unter anderem zu einer vermehrten ROS-Produktion führen können. Auch cytoplasmatische Proteine können durch UDP-GlcNAc modifiziert werden. Ein prominentes Beispiel stellt hier die Inhibition der eNOS durch hyperglycämieinduzierte Acetylglucosaminylierung an der Akt-Stelle des Proteins dar<sup>50</sup>.

**Advanced Glycation Endproducts** (AGE) können zum einen Proteine direkt modifizieren, wodurch diese ihre physiologische Funktion verändern können. Zum anderen können AGE rezeptorvermittelt Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B aktivieren und darüber eine pathologische Expressionsänderung von Proteinen hervorrufen. Über Bindung der AGE an seinen Rezeptor (RAGE) wird die Bildung von Sauerstoffradikalen auch direkt induziert<sup>52</sup>.

Die **Proteinkinase C** (PKC) besitzt eine Schlüsselfunktion in der Modulation von Signaltransduktionsketten. Dazu gehören unter anderem die Phosphorylierung des Insulinrezeptors, der eNOS, der NADPH-Oxidase und die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen durch die unterschiedlichen Isoformen der PKC. Von den derzeit bekannten 11 Isoformen werden 9 durch das *second messenger* Molekül Diacylglycerol (DAG) aktiviert, wovon primär die  $\beta$ - und  $\delta$ -Form betroffen sind<sup>53</sup>. DAG wird aufgrund der Akkumulation von Triosephosphaten aus der Glycolyse vermehrt synthetisiert. Zentrale Bedeutung besitzt im Hinblick auf die vermehrte Generation von ROS vor allem die Phosphorylierung und damit Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase<sup>54;55</sup>.



**Abb. 1.3** Zusammenhang zwischen Hyperglycämie und der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion

AT II = Angiotensin II, PKC = Proteinkinase C, AGE = advanced glycation endproducts. Darstellung modifiziert nach Rösen<sup>56</sup> und Brownlee<sup>53</sup>.

## 1.4 Antioxidative Schutzmechanismen im Diabetes

Unter physiologischen Konditionen wird der Redoxstatus der Zelle durch diverse Antioxidantien aufrechterhalten. Dazu zählen Enzyme wie Catalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase sowie auch Glutathion und die antioxidativen Vitamine C und E. Diese antioxidativen Schutzmechanismen sind im Diabetes zumindest teilweise eingeschränkt<sup>57</sup>. Jedoch konnte durch exogene Zufuhr von Antioxidantien gezeigt werden, dass sich dadurch die eingeschränkte Vasorelaxation verbessern lässt<sup>58;59</sup>.

Ein besonderes Interesse bei den antioxidativen Schutzmechanismen gilt der Familie der Superoxiddismutasen (SOD). Unabhängig von der Lokalisation katalysieren diese Enzyme die Reaktion pseudo-erster Ordnung von Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff<sup>60</sup>. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und den Zentralatomen. Grundsätzlich sind in Eukaryonten zwei Isoformen vertreten. Die mitochondrielle SOD ist ein Homotetramer und trägt ein Manganatom im katalytischen Zentrum. Sie ist in der mitochondriellen Matrix verankert<sup>61;62</sup>. Die Hauptform der intrazellulären Superoxiddismutasen stellt die cytosolische Form der Cu/ZnSOD dar<sup>63</sup>. Als Homodimer trägt sie ein Kupfer- und ein Zinkion je Untereinheit im aktiven Zentrum. Neben dem Cytosol ist sie auch im Nukleus nachweisbar<sup>64</sup>. Daneben existiert eine weitere Isoform, die ebenfalls je ein Kupfer- und ein Zinkion pro Untereinheit im katalytischen Zentrum trägt, jedoch im Extrazellularraum lokalisiert ist. Die Kupferionen sind essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms, während durch Ersatz oder Fehlen des Zinkions die Aktivität gemindert jedoch noch vorhanden ist<sup>65</sup>. Anders als die zellulären Isoformen bindet die extrazelluläre Superoxiddismutase (ecSOD) an Heparansulfate und Proteoglycane der extrazellulären Matrix oder an Zelloberflächen. Mit 135 kDa (humane ecSOD) ist das native Enzym schwerer als die beiden vorgenannten Isoformen<sup>66</sup>. Die ecSOD weist bei den meisten Spezies, unter anderem beim Menschen, die Struktur eines Homotetramers auf, in wenigen Ausnahmen wie bei der Ratte, die Struktur eines Homodimers (ecSOD der Ratte  $M_r = 97$  kDa)<sup>67;68</sup>. Die einzelnen Untereinheiten sind über Disulfidbrücken, die zwischen carboxyterminalen Cysteinresten der Untereinheiten ausgebildet werden, miteinander verbunden<sup>69-71</sup>. Die ecSOD kann grob in drei funktionelle Domänen eingeteilt werden: (i) der Aminoterminus enthält drei Glycosylierungsstellen, (ii) die mittlere Domäne enthält das aktive Zentrum und weist eine hohe Homologie zur cytosolischen Isoform der Cu/ZnSOD auf, (iii) die carboxyterminale Aminosäuresequenz stellt eine besondere Domäne dar, da sie

ein Cluster von neun positiv geladenen Aminosäuren (3x Lys, 6x Arg) enthält, die möglicherweise für die Bindung an die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind<sup>72</sup>. Die Gewebeverteilung variiert bei den unterschiedlichen Spezies, wobei das Enzym im allgemeinen jedoch in Lungen, Uterus, Nieren und Blutgefäßen die höchsten Konzentrationen aufweist<sup>67;73</sup>. Dabei enthält das Interstitium von Arterien die größten Mengen<sup>74;75</sup>. EcSOD wird hauptsächlich in den vaskulären glatten Muskelzellen synthetisiert<sup>76</sup> und anschließend in den interstitiellen Raum exocytiert<sup>74</sup>. Aufgrund seiner besonderen Lokalisation stellt die ecSOD ein antioxidatives Enzym dar, das im Bereich der NO<sup>•</sup>-Passage von den Endothelzellen zu den vaskulären glatten Muskelzellen einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit leistet<sup>77;78</sup>. Ein wichtiger Befund in diesem Zusammenhang ist auch die Feststellung, dass die vaskuläre Defizienz von Superoxiddismutase die endothelvermittelte Vasorelaxation beeinträchtigt<sup>79;80</sup>. Damit stellt sie auch eine interessante Zielstruktur in der Therapie zur Reduktion des oxidativen Stress dar, vor allem auch im Hinblick darauf, dass in der Vergangenheit unter Supplementierung mit antioxidativen Enzymen wie Vitamin E kontroverse Befunde hinsichtlich der Verbesserung der kardiovaskulären Gefäßschäden berichtet wurden, und dass eine Verbesserung nur unter unphysiologisch hohen Konzentrationen erzielt werden konnte. Auch im Hinblick auf die unter Nitrattherapie entstehende Toleranz bietet sich mit der ecSOD eine alternative Therapieoption, da bekannt ist, dass Superoxidradikale an der Entstehung der Nitrattoleranz beteiligt sind<sup>81</sup>. Durch exogene Zufuhr von liposomal eingebetteter SOD konnte die maximale Vasorelaxation von Nitrattoleranten Kaninchenaorten gegenüber Nitroglycerin, SIN-1 (Molsidomin) und Acetylcholin verbessert werden<sup>81</sup>. Auch das physiologisch gebildete Stickstoffmonoxid könnte auf diese Weise besser erhalten werden.





## **2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG**

---



Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffverbindungen, vornehmlich Superoxidradikale ( $O_2^{\bullet}$ ), im Diabetes vermehrt entstehen und zur eingeschränkten endothelvermittelten,  $NO^{\bullet}$ -abhängigen Vasorelaxation beitragen. Gleichzeitig konnte für verschiedene antioxidative Schutzmechanismen in der Vergangenheit eine Verringerung unter hyperglycämischen Bedingungen nachgewiesen werden. Da die extrazelluläre Superoxiddismutase (ecSOD) aufgrund ihrer besonderen Lokalisation eine wichtige Funktion in der Erhaltung der  $NO^{\bullet}$ -Bioverfügbarkeit besitzt, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst *in vitro* in einem Zellkulturmodell untersucht werden, ob und in welchem Maße die ecSOD durch Hyperglycämie beeinflusst wird. Es sollte außerdem geklärt werden, welche Stoffwechselwege, die im Diabetes vermehrt genutzt werden, zur Modulation des Enzyms beitragen.

In Untersuchungen zur Regulation der ecSOD in atherosklerotischen Tiermodellen ist gezeigt worden, dass das Vorliegen von Stickstoffmonoxid und ecSOD positiv miteinander korrelieren, was auf modulatorische Eigenschaften von  $NO^{\bullet}$  auf die ecSOD schließen lässt. Auf dieser Erkenntnis basierend sollte ebenfalls zunächst *in vitro* untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auf hyperglycämische Bedingungen übertragen lassen.

Da es sich bei Diabetes mellitus um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, bei der die Hyperglycämie nur einen charakteristischen Parameter darstellt, sollte im zweiten Teil dieser Dissertation in einem diabetischen Tiermodell die Regulation der ecSOD *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden Nieren, Herzen und Aorten ausgewählt, Organe, deren Schädigung in der klinischen Praxis entscheidend zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten beiträgt. Auch im Tiermodell wurde der Einfluss von  $NO^{\bullet}$  auf die Entwicklung der ecSOD untersucht, um die Bedeutung der  $NO^{\bullet}$ -ecSOD-Korrelation bei Vorliegen einer Diabeteserkrankung zu klären.



### **3 MATERIAL UND METHODEN**

---



### 3.1 Substanzen und Puffer

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität und Reinheit von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) und Applichem (Darmstadt) bezogen.

Substanzen für die Molekularbiologie wurden außerdem bei den Firmen Qiagen (Hilden), Amersham Biosciences (Freiburg) und Invitrogen (Karlsruhe) bestellt.

#### Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4

NaCl	99,01 mM
KCl	4,69 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,87 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,20 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,00 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,03 mM
Na-HEPES	20,00 mM
D-Glucose	11,01 mM

#### Denaturierungslösung

Formaldehyd	35,0 µl
Formamid	100,0 µl
10 x E-Puffer	20,0 µl
EtBr (10mg/ml)	2,0 µl

#### Equilibrierungspuffer pH 7,0

Na-HEPES	50,0 mM
Natriumchlorid	0,25 M

#### Mannosid-Lösung

α-Methylmannosid	0,5 M
Equilibrierungs-Puffer pH 7,0	

#### 5 x TBE-Puffer pH 8,0

Tris	445,0 mM
Borsäure	444,0 mM
EDTA	10,0 mM

#### Natriumacetat-Puffer pH 5,2

Natriumacetat	3,0 M
pH-Wert mit Eisessig einstellen	

#### 10 x E-Puffer pH 7,0

MOPS	20,0 mM
Natriumacetat	50,0 mM
EDTA	10,0 mM

#### Tris-Puffer pH 7,5

Tris	10,0 mM
in 0,1 % DEPC-Wasser	

#### Blaumarker für Agarose-Gele

Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
Xylencyanol	0,25 % (m/v)
Glycerol	30,0 % (v/v)

1 x TBE-Puffer pH 8,0

**Homogenisations-Puffer pH 7,4**

Natriumphosphat	50,0 mM
DTPA	3,0 M
Kaliumbromid	0,3 M
+ Complete Mini <sup>®</sup> Inhibitor-Tabletten	
1 Tablette / 10ml	

**Blottingpuffer pH 8,5**

Tris	25,00 mM
Glycin	0,19 mM
Methanol	20,0 % (v/v)

**6 x Probenpuffer**

Tris HCl	18,75 mM
SDS	12,0 % (m/v)
Glycerol	60,0 % (v/v)
Bromphenolblau	0,3 % (m/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	15,0 % (v/v)

**4 x Trenngel-Puffer pH 8,8**

Tris	1,5 M
SDS	0,4 % (m/v)

**Herstellung des Trenngels 10,0 %**

Acrylamid-Bisacrylamid-	
Fertiglösung 30 % (37,5:1)	6,2 ml
4 x Trenngel-Puffer	4,7 ml
MP-Wasser	7,7 ml
TEMED	10,0 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat-Lsg. 10 %	150,0 $\mu$ l

**TBST-Puffer pH 7,4**

Tris HCl	10,00 mM
Natriumchlorid	0,15 mM
Tween	1,0 % (v/v)

**10 x Tankpuffer pH 8,6**

Tris	250,0 mM
Glycin	1,9 mM
SDS	0,1 % (m/v)

**2 x Probenpuffer**

Tris	60,0 mM
EDTA	50,0 mM
SDS	2,0 % (m/v)
Glycerol	10,0 % (v/v)
Bromphenolblau	0,005 % (m/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	12,0 % (v/v)

**10 x Sammelgel-Puffer pH 6,8**

Tris	250,0 mM
Glycin	2,0 M
SDS	1,0 % (m/v)

**15,0 %**

9,3 ml
4,7 ml
4,6 ml
10,0 $\mu$ l
150,0 $\mu$ l

**Herstellung des Sammelgels 4,5 %**

Acrylamid-Bisacrylamid-	
Fertiglösung 30 % (37,5:1)	2,4 ml
10 x Sammelgel-Puffer	4,0 ml
MP-Wasser	9,3 ml
TEMED	10,0 µl
Ammoniumpersulfat-Lsg. 10%	150,0 µl

**Dulbecco's PBS pH 7,4**

Kaliumchlorid	2,68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM
Natriumchlorid	136,90 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,10 mM

**Supplement für DMEM pH 7,4**

Penicillin	5,0 x 10 <sup>6</sup> U
Streptomycinsulfat	5,0 g
HEPES	1,25 M
L-Glutamin	100,0 mM
Dulbecco's PBS	1000,0 ml

**Herstellung STZ-Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,5**

Stammlösung 1	Stammlösung 2
Citronensäure 2,10 %	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,56 %

**Trypsin-Lösung**

Trypsin	0,530 g
EDTA	0,24 mM
Dulbecco's PBS	350,0 ml

**Versuchsmedium DMEM**

DMEM (5,5 mM Glucose)	500,0 ml
Supplement für DMEM	10,0 ml
FCS	2,5 ml

**Kulturmedium DMEM**

DMEM (5,5 mM Glucose)	500,0 ml
Supplement für DMEM	10,0 ml
FCS	50,0 ml

**Hämolyselösung**

Digitonin	0,04 mM
Maleinimid	1,00 mM

5,51 ml der Stammlösung 1 und 4,49 ml der Stammlösung 2 werden zusammengegeben. In dem daraus resultierenden Citratpuffer (pH 4,5) wird das Streptozotocin gelöst.

## 3.2 Tierexperimentelle Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 beantragt und vom Regierungspräsidium Düsseldorf genehmigt (AZ 50.05/240/4003 und AZ 50.05/230/8303).

### 3.2.1 Tierhaltung

Für die Organentnahme aus Ratten und zur Gewinnung von RASMC wurden männliche Wistar-Unilever-Ratten (Fa. Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) eingesetzt.

Für die Zucht der transgenen eNOS „knock out“ Mauslinie wurden entsprechende Ausgangstiere von der Fa. Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. eNOS Knock-out-Mäuse wurden erstmals von Huang et al.<sup>82</sup> generiert und über die Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen.

Die Tiere wurden unter veterinärmedizinischer Kontrolle im Versuchstierbereich des Deutschen Diabetes-Zentrums Düsseldorf in Kunststoffkäfigen bei standardisierten Bedingungen gezüchtet und gehalten (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchte 55% ± 5%, Tag-Nacht-Rhythmus 12 Stunden durch Kunstlicht). Sie erhielten Trinkwasser aus der Flasche und Standardfutter ad libitum. Die Trinkwassermenge wurde regelmäßig kontrolliert und für die Berechnung der Dosen der im Trinkwasser verabreichten Pharmaka berücksichtigt.

### 3.2.2 Diabetes-Induktion und Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellaage

Adulte Tiere (ca. 8 Wochen alt) erhielten zur Induktion des Diabetes<sup>83</sup> eine einmalige intraperitoneale (i.p.) Streptozotocin- (*N*-[Methylnitrosocarbonyl]- $\alpha$ -D-Glucosamin, STZ) Injektion in einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht. Dazu wurde STZ unmittelbar vor der Injektion in eiskaltem *Citrat-Phosphat-Puffer* gelöst (s. 3). Kontrolltiere erhielten eine Vehikel-Injektion, die im Volumen der STZ-Injektion entsprach. Die Ratten wurden nach einer Diabetesdauer von 3 bzw. 16 Wochen untersucht. Bei den Mäusen erfolgte die Analytik 16 Wochen nach STZ-Injektion.

Der diabetische Zustand wurde definiert durch einen postprandialen Blutzuckerspiegel von  $> 11$  mM Glucose eine Woche nach STZ-Injektion. Die Analyse des Blutglucosegehalts erfolgte im klinischen Labor des Diabetes-Zentrums mittels der Hexokinase-Methode durch einen Auto-Analyser Hitachi 912 (Boehringer, Mannheim). Zur Analyse wurden 20  $\mu$ l Vollblut in 500  $\mu$ l *Hämolyse-Lösung* lysiert. Blutzucker und Körpergewicht wurden alle vier Wochen bestimmt, um so diabetesspezifische Veränderungen zu dokumentieren. Die weitere Charakterisierung des Status diabeticus erfolgte über Bestimmung des Proteingehalts und der Kreatinin- und Triglyceridwerte im Serum. Zur Serumgewinnung wurde den Tieren durch post mortem Herzpunktion Vollblut entnommen, das nach Gerinnung zentrifugiert wurde (13.000 rpm, 10 min.). Der Überstand wurde zur Analytik eingesetzt. Der Gesamtproteingehalt im Serum wurde mit Hilfe der Biuret-Reaktion quantifiziert. Kreatinin wurde in einer modifizierten Trinder-Reaktion nach vorheriger enzymatischer Umwandlung zu Sarcosin bestimmt. Die Quantifizierung der Triglyceride (TG) erfolgte durch enzymatischen Nachweis von entstehendem Wasserstoffperoxid. TG wurden zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert. Das Glycerin wurde anschließend zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert.

### 3.2.3 Fütterung

L-NAME, ein Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS), wurde in einer Dosis von 20 mg pro kg Körpergewicht pro Tag im Trinkwasser verabreicht. Die Einteilung in die verschiedenen Gruppen erfolgte randomisiert. Es wurden vier Gruppen gebildet. Das Behandlungsschema der Tiere gibt Tab. 3.1 wieder. Nach drei Wochen Fütterung wurden die Tiere sezziert und deren Organe entnommen (s. 3.2.5).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
<b>L-NAME</b>	–	+	–	+
<b>STZ</b>	–	–	+	+

*Tab. 3.1 Behandlungsschema der Ratten im Fütterversuch mit L-NAME*

### 3.2.4 Transgene Tierlinie

Bei der transgenen Tierlinie handelte es sich um eine Mauslinie (C57/B16), bei der das Gen für die endotheliale NO-Synthase deletiert wurde (eNOS knock out-Maus).

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analytik der genomischen DNA aus der Schwanzspitze der Tiere<sup>79</sup>. Die Methodik der Genotypisierung und der Diabetisierung sowie die eingehende Charakterisierung der Stoffwechsellage wurde von *Schmitz* beschrieben<sup>79</sup>.

### 3.2.5 Organentnahme

Nach der durch den Versuchsansatz definierten Diabetes- bzw. Fütterungsdauer wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und auf einem Präpariertisch fixiert. Das Fell wurde entfernt und anschließend der Thorax nach Durchtrennung des kaudalen Anteils des corpus sterni und der Rippen geöffnet. Nach Durchtrennung der Aorta an ihrem Ursprung aus dem linken Ventrikel wurde das Herz entfernt. Lunge und Ösophagus wurden entnommen und die Bauchhöhle weiter geöffnet. Die Leber wurde entfernt. Die Nieren wurden nach Verlagerung des Darmgeflechts freigelegt und nach Durchtrennung der Ureter entnommen. Danach konnte die Aorta nach Lösen des sie umgebenden Gewebes in ihrer gesamten Länge bis zu ihrer Aufteilung im Beckenbereich vorsichtig entnommen werden. Die Aorta, das Herz und die Nieren wurden nach ihrer Entnahme sofort in eiskalten *Krebs-HEPES-Puffer* überführt. Das Gefäß wurde mit Puffer durchspült, um das Lumen von Blutresten zu befreien. Anhaftendes Binde- und Fettgewebe wurde von Herz und Nieren mit einer chirurgischen Pinzette und Schere entfernt. Bei der Aorta erfolgte die Befreiung des Gefäßes von Binde- und Fettgewebe durch stumpfe Präparation. Alle Organe wurden für die weiteren Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die thorakalen Aorten für das Anlegen der RASMC-Kultur wurden in eiskaltem Dulbecco's PBS mit Penicillin (160 mg/l), Streptomycin (160 mg/l) und Fungizone<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) zur sofortigen Weiterverarbeitung (siehe 3.3.2) aufbewahrt.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Zellkultivierung

Die glatten Muskelzellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem Anteil von 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kulturgefäße wurden Flaschen aus Polypropylen mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche verwendet. Der Zustand der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch überwacht. Das *Kulturmedium* wurde zweimal pro Woche gewechselt (0,2 ml/cm<sup>2</sup>). Bei Erreichen von 80 – 90 % Konfluenz (Vorliegen eines geschlossenen Zellmonolayers) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellschicht einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von *Trypsin-Lösung* (40 µl/cm<sup>2</sup>) und leichtem Klopfen der Flasche gegen den Handballen vom Flaschenboden abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Sobald sich alle Zellen abgerundet hatten, wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von FCS-haltigem Medium (160 µl/cm<sup>2</sup>) inhibiert, um so eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden suspendiert, in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min. mit 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem *Kulturmedium* resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen verteilt. RASMC wurden 1:5 gesplittet, was bei der Aussaat einer Zelldichte von ca. 120.000 Zellen/cm<sup>2</sup> entsprach. Eine konfluente RASMC-Kultur (75 cm<sup>2</sup>) entspricht einer Zellzahl von ca. 45.000.000 Zellen.

Bei RASMC handelt es sich um glatte Muskelzellen aus der Aorta von Ratten. Sie wurden wie unter 3.3.2 beschrieben isoliert.

Als Medium wurde **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium (DMEM) mit 5 mM Glucose (PAA, Cölbe) verwendet. Die Zusammensetzung mit Supplement und FCS ist unter 3 (*Kulturmedium*) beschrieben worden. Für die Versuche wurde entsprechendes DMEM ohne Phenolrot (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet (*Versuchsmedium*), da dieser Farbstoff die anschließende Farbreaktion bei der Aktivitätsbestimmung stört.

### 3.3.2 Präparation von glatten Muskelzellen aus Rattenaorta

Unter der Sterilbank wurden zunächst 6-Kavitäten-Platten (eine Kavität pro Aorta) wie folgt vorbereitet: Die einzelnen Kavitäten (*Wells*) wurden mit 1 ml Medium gefüllt und die Platte danach schräg gestellt, so dass der obere Teil der *Wells* nur noch kapillär mit Medium bedeckt war. Mit einem Skalpell wurde die Aorta in möglichst dünne Ringe geschnitten, die mit dem Querschnitt in die obere Hälfte der Kavitäten gelegt wurden. Je Aorta erhielt man ca. 12 – 18 Aortenringe. Nach zwei Stunden im Brutschrank hafteten die Präparate am Boden der *Wells*, so dass die Platte in waagerechte Stellung gebracht werden konnte. Nach einer Woche wurden erste Zellauswüchse aus den Präparaten beobachtet. Nach weiteren ein bis zwei Wochen war jeder Aortenring von einem Hof glatter Muskelzellen umgeben. Die Zellen mehrerer Kavitäten wurden zu einem Pool einer Zelllinie vereinigt, sofern sie die typische Morphologie glatter Muskelzellen zeigten. Ein Pool glatter Muskelzellen stammte aus vier bis sechs Tieren.

### 3.3.3 Charakterisierung der RASMC

Täglich wurden Wachstumsverhalten und Morphologie der Muskelzellkulturen unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Bei Konfluenz zeigte sich eine dichte netzwerkartige Struktur. Zur Dokumentation wurden Videoprints angefertigt.

Die Charakterisierung der VSMC erfolgte über den Nachweis von  $\alpha$ -Actin als typischem Merkmal glatter Muskelzellen. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie zweimal mit warmem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Paraformaldehyd (4% (m/v) in PBS), womit die Zellen 15 min. inkubiert wurden. Die überschüssige Paraformaldehyd-Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt mittels Triton X-100 (0,1 Vol.-% in PBS). Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen nochmals mehrmalig mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper wurden durch Inkubieren mit 5% BSA in *TBST* blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti- $\alpha$ -Actin, Verdünnung 1:200) erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dreimal 10 min. mit 1 % BSA in *TBST-Puffer* gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper (Anti-Kaninchen-IgG FITC-markiert, Verdünnung 1:500) bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde ein letztes Mal mit 1 % BSA in *TBST-Puffer* gewaschen. Auf die bereit liegenden Objektträger wurde je ein Tropfen

Vectashield™ (Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA) gegeben und die Deckgläschen wurden anschließend auf dem Objektträger mit Nagellack fixiert. Die grüne Fluoreszenz der Actinfilamente konnte bei Anregung durch blaues Licht (488 nm, Filter 505 nm) unter dem Lasermikroskop betrachtet werden.

### 3.3.4 Doppelfärbung mit Propidiumiodid

Nachdem die Zellen auf dem Deckgläschen konfluent waren, wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 4 % (m/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durch 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Um überschüssiges Triton zu entfernen wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper wurden durch 30 minütiges Blockieren mit 5% BSA in *TBST* gesättigt. Über Nacht wurde mit dem 1. Antikörper, der spezifisch gegen  $\alpha$ -Actin in glatten Muskelzellen gerichtet ist, bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst mit 1% BSA in *TBST* gewaschen und anschließend 30 min. mit RNase A (1 mg/ml) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die RNase-Behandlung wurde die spätere Reaktion von Propidiumiodid mit cytosolischer RNA verhindert. Nach der RNase-Behandlung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und sofort für 1 Stunde mit dem zweiten, FITC-konjugierten Antikörper beladen. Nach gründlichem Waschen mit 1% BSA in *TBST* wird im letzten Waschschrift der Waschlösung (*TBST* alleine) Propidiumiodid (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml zugesetzt und 30 min. inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift mit *TBST* wurden die Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert, wie es bereits unter 3.3.3 beschrieben wurde. Durch Anregung bei 488 nm wurde die grüne Fluoreszenz (Emission 505 nm) sichtbar, während nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 543 nm die rote Fluoreszenz des Propidiumiodids (Emission 560 nm) sichtbar wurde.

### 3.3.5 Nachweis von Radikalen mittels Fluoreszenzfärbung

Zum Nachweis von Sauerstoffradikalen in Zellen wurde das Xanthen-Derivat CM H<sub>2</sub>DCFDA (Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat; s. Abb. 3.1) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt.

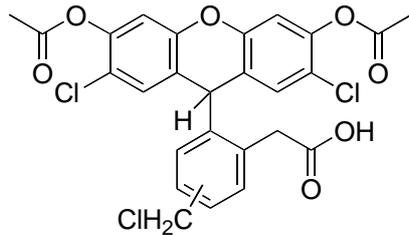


Abb. 3.1 Struktur von DCF

Die Essigsäureester werden intrazellulär durch Esterasen gespalten und gleichzeitig reagieren die Thiol-reaktiven Carboxymethylgruppen mit intrazellulärem Glutathion oder Thiolgruppen von Proteinen. Durch Reaktion mit den in den Zellen entstehenden Sauerstoffradikalen wird das DCF zu einem stark fluoreszierenden Farbstoff oxidiert.

Um das Radikal Stickstoffmonoxid fluorimetrisch zu detektieren, wird das Fluorescein-Derivat DAF-DA (4,5-Diaminofluorescein-diacetat) (Alexis, San Diego, CA, USA) verwendet. Das Diacetat wird ebenfalls durch intrazelluläre Esterasen gespalten zu 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2), was aufgrund seiner Ladung die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Das farblose DAF-2 reagiert im Cytosol mit dem Nitrosonium-Kation (NO<sup>+</sup>) zu einem fluoreszierenden Heterocyclus (s. Abb. 3.2).

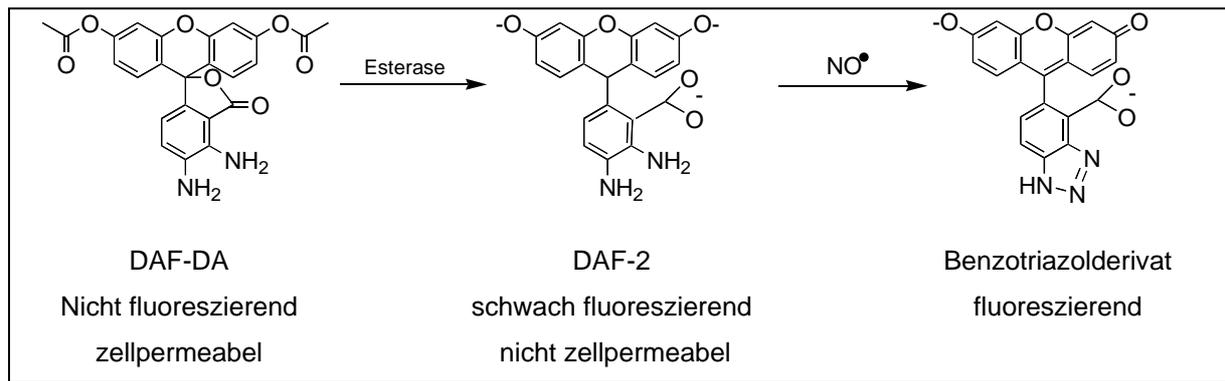


Abb. 3.2 Reaktionsschema von DAF-DA mit NO•

Als positive Kontrollen wurden Zellen für die DCF-Färbung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und für die DAF-Färbung mit dem NO•-Donor A23187 (Calbiochem, Darmstadt) behandelt.

Die Zellen wurden wie unter 3.3.7 beschrieben mit hohen Glucosekonzentrationen über 96 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden dem Medium 10µM CM H<sub>2</sub>DCF-DA bzw. 10µM DAF-DA zugesetzt. Die Zellen wurden dann 60 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Dem schloss sich die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd an (10 min., Raumtemperatur). Nach einem abschließenden Waschschritt mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Fluoreszenzintensität beide Farbstoffe wurde nach Anregung der Farbstoffe mit blauem Licht (Exzitation = 488 nm; Emission = 505 nm (grün)) bestimmt.

Die positiven Kontrollen wurden wie folgt behandelt: Zunächst wurde den Zellen DAF-DA bzw. CM H<sub>2</sub>DCF-DA im Medium zugesetzt und anschließend für 60 min. bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die RASMC für 15 min. mit 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 1µM A23187 behandelt. Ein weiterer Waschvorgang entfernte überschüssiges Versuchsmedium und Farbstoff. Zum Schluss wurde auch im Fall der positiven Kontrollen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen.

### 3.3.6 Doppelfärbung mit Mitotracker Red und DCF

Zur Visualisierung von Mitochondrien wurde der Farbstoff MitoTracker Red CMXRos™ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Dieser Farbstoff passiert selektiv die Membran aktiver Mitochondrien durch passive Diffusion. Durch den schwach thiolreaktiven Chloromethylrest wird CMXRos™ in den Mitochondrien konzentriert, ohne nach Zellfixierung bzw. Permeabilisierung wieder ausgewaschen zu werden. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 543 nm fluoreszieren die Mitochondrien im confokalen Lasermikroskop (Emission 560 nm) rot.

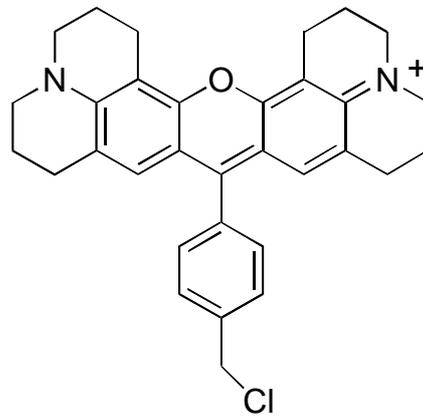


Abb. 3.3 Strukturformel MitoTracker Red CMXRos™

Vor der Fixierung und Färbung der Zellen mit DCF wurde mit Mitotracker inkubiert. Der überschüssige Farbstoff, der per se rot fluoresziert, wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die anschließende Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit DCF wurde wie unter 3.3.5 beschriebenen durchgeführt.

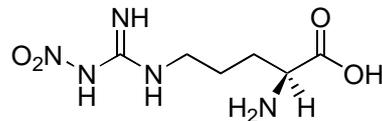
### 3.3.7 Stimulation der Zellen

Alle Zellen wurden bis zur Konfluenz wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben kultiviert. Für eine Versuchsreihe wurden stets Zellen gleicher Passage verwendet. Bevor die Zellen für den Stimulationsversuch eingesetzt wurden, wurde der FCS-Gehalt im Medium über Nacht auf 0,5 % herabgesetzt, so dass sich alle Zellen zum Versuchsbeginn im G<sub>0</sub>-Stadium befanden.

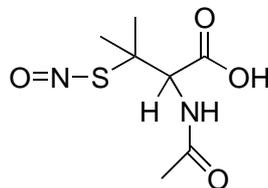
Die folgenden Substanzen wurden dem Phenolrot-freien DMEM *Versuchsmedium* zugesetzt:

**Hohe Glucose:** Dem DMEM, das 5mM Glucose enthält, wurde eine 1,25 M  $\alpha$ -D-Glucose-Lösung 1:50 zugesetzt. Daraus resultiert eine Endkonzentration von 30 mM  $\alpha$ -D-Glucose im Versuchsmedium.

**L-Nitroarginin:** Eine 10 mM Stocklösung von L-NNA wurde 1:100 mit Medium verdünnt. Daraus resultiert eine Endkonzentration von 100  $\mu$ M.

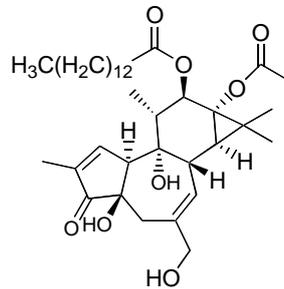


**SNAP:** ( $\pm$ )-S-Nitroso-N-acetylpenicillamin; es wurde eine 50mM Stammlösung hergestellt, die für den Versuch 1:250 mit Medium verdünnt wurde. Die Endkonzentration betrug 200  $\mu$ M.

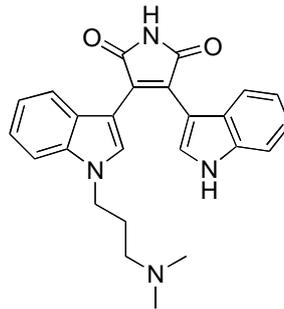


**IL-1 $\alpha$ :** Es wurde eine Endkonzentration von 0,1 ng / ml eingesetzt.

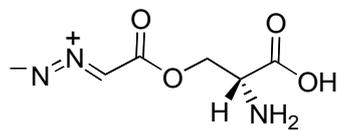
**PMA:** Phorbol-12-myristat-13-acetat; eine 20  $\mu\text{M}$  Stammlösung (in DMSO) des PKC-Stimulans wurde 1:100 mit Medium zu einer Endkonzentration von 200 nM verdünnt.



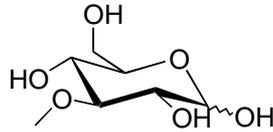
**BIM:** Bisindolylmaleimid; der PKC-Inhibitor wurde in einer Endkonzentration von 10 nM im Versuchsmedium eingesetzt. Zuvor wurde eine Vorverdünnung von 1 mM in DMSO angefertigt.



**Azaserin:** Der Hemmstoff der Glucosamin-Amino-Transferase (GFAT) wurde in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  dem Versuchsmedium zugesetzt.

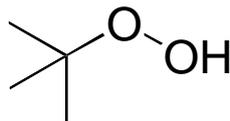


**3-O-Methylglucose:** Von der nicht verstoffwechselbaren Form der Glucose wurde eine Stammlösung von 1,25 M angesetzt, die mit Versuchmedium 1:50 verdünnt wurde. Daraus resultiert eine Endkonzentration von 25 mM.



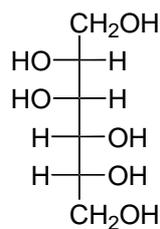
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Unter Berücksichtigung der Dichte wurde eine 100 µM Stammlösung angefertigt, von der 1,022 µl / ml Versuchmedium diesem zugesetzt wurde.

**t-BHP:** Das organische Hydroperoxid lag im Versuchmedium mit einer Endkonzentration von 100 µM vor. Zuvor wurde eine 1 M Stammlösung hergestellt.

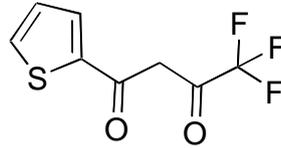


**Hypoxanthin/Xanthinoxidase:** Das System wurde zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eingesetzt, in dem Hypoxanthin dem Versuchsmedium in einer Konzentration von 100 µM und das generierende Enzym in einer Konzentration von 1,5 mU / ml dem Versuchmedium zugesetzt wurden.

**Mannitol:** Um einen der hohen Glucose vergleichbaren osmotischen Druck im Zellsystem zu erzeugen wurde Mannitol in derselben Konzentration wie Glucose verwendet. Dazu wurde eine 1,25 M Stammlösung angefertigt, die mit dem Versuchmedium 1:50 verdünnt wurde.



**TTFA:** Thenoyltrifluoraceton; der Inhibitor der Atmungskette blockiert den Elektronentransport durch Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II der Atmungskette) und verhindert so die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ). TTFA lag in einer Endkonzentration von 30  $\mu$ M im Medium vor.



Bei jedem Stimulationsversuch wurde das Medium nach 96h entfernt und bei  $-20^{\circ}C$  bis zur weiteren Analyse eingefroren. Die Zellen jeder Kulturflasche wurden trypsiniert und die einzelnen Pellets bei  $-80^{\circ}C$  für nachfolgende Analysen eingefroren.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes aus homogenisiertem Gewebe und Zellen erfolgte nach der Methode von Bradford<sup>84</sup>. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen an BSA (1-20 µg/µl) erstellt. Mittels linearer Regression wurde die Eichgerade errechnet werden, aus der die Proteinkonzentration der Proben bestimmt wurde.

### 3.4.2 Anreicherung der ecSOD

Nach der Organentnahme wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Isolierung der extrazellulären Superoxiddismutase (ecSOD) wurde das tiefgefrorene Gewebe zunächst mit einem mechanischen Zerkleinerer gepulvert und in 1 ml *Homogenisationspuffer* mit dem Ultraturax (Omni 2000, Fa. Klees) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 10 min. in Eiswasser ultrabeschallt und danach 20 min. bei 20.000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford (s. 4.4.1) bestimmt. Nach der Proteinbestimmung wurde der Überstand auf ein ConA-Agarose-Gelbett (Calbiochem, Schwalbach/Ts.) überführt und 30 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Rollmix rolliert. Das Gelbett wurde 10 min. bei 20.000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Der resultierende Überstand, der alle nicht ConA-affinen Proteine enthielt, wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde das Gelbett dreimal mit *Equilibrierungspuffer* gewaschen. Nach jedem Rollierungsdurchgang wurde das Gelbett abzentrifugiert und der Überstand abgenommen, wobei der Überstand nach dem ersten Waschschrift mit der nicht ConA-affinen Proteinfraction vereinigt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Die Überstände aus den beiden weiteren Waschsritten wurden verworfen. Die ConA-affine Proteinfraction, die auch die ecSOD enthält, wurde mit insgesamt 1,5 ml *Mannosid-Lösung* eluiert und bis zur weiteren Analytik ebenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.3 Aktivitätsbestimmung der ecSOD

Die Bestimmung der Aktivität der extrazellulären Superoxiddismutase beruht auf einer Methode, die erstmals von *Beauchamp* und *Fridovich* beschrieben<sup>85</sup> und von *Spitz* und *Oberley* modifiziert wurde<sup>86</sup>.

Es handelt sich hierbei um eine Farbreaktion mit Nitrotetrazoliumblau (NBT). Der Farbstoff reagiert unter Einwirkung von Sauerstoffradikalen, die durch ein Xanthin/Xanthinoxidase-System generiert werden, zu Diformazan. Das Diformazan weist ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max} = 560$  nm auf. Im beschriebenen Assay wurde die Hemmung der Diformazanbildung durch SOD als Maß für ihre Aktivität bestimmt. (s. Abb. 3.4). Ein Unit SOD inhibiert die Zunahme der Absorption bei 560 nm um 50 % unter Testbedingungen. Vor jeder Messung wurde eine Eichung mit definierten Einheiten von boviner, erythrocytärer Cu/ZnSOD (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die erhaltene Regressionsgerade wurde zur Berechnung der ecSOD-Aktivität der Proben herangezogen.

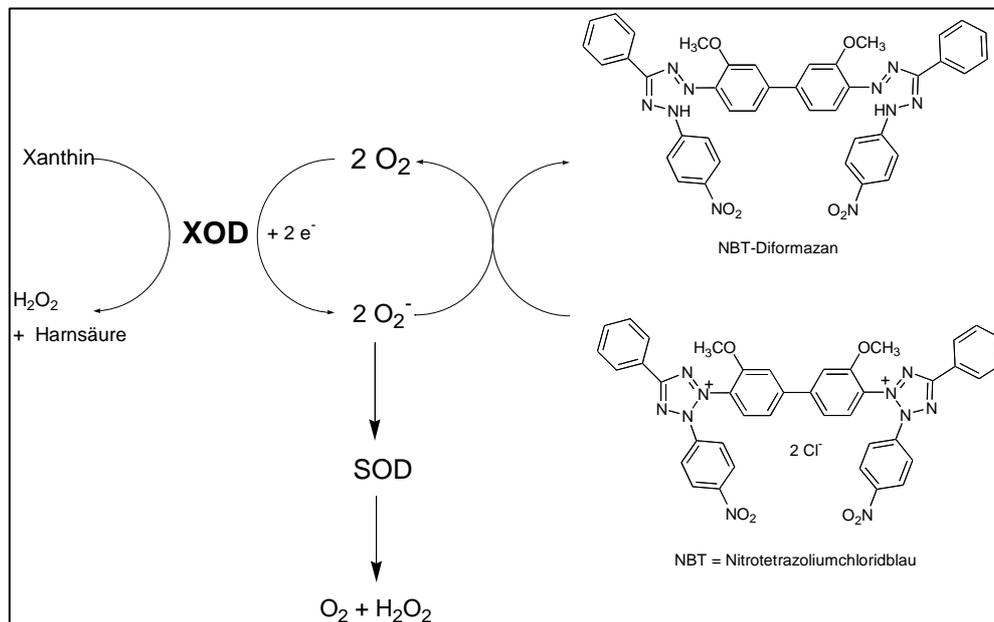


Abb. 3.4 Reaktionsschema für den SOD-Assay

Bei der Quantifizierung wurde die gemessene Aktivität auf das Feuchtgewicht des eingesetzten Gewebes (Units / min / 100 mg ww) bzw. bei der Messung im Zellüberstand auf die DNA-Menge der ecSOD sezernierenden Zellen (Units / min / ng DNA) bezogen.

### 3.4.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Analyse von Proteinexpressionen, wobei die Proteine zunächst durch Gelelektrophorese getrennt, danach auf eine Membran transferiert (geblottet) werden und letztlich auf der Membran durch Bindung spezifischer Antikörper und anschließender photometrischer Detektion sichtbar gemacht werden.

#### 3.4.4.1 Proteinauftrennung

Die Proteine aus den ConA-affinen Gewebefraktionen und Zelllysaten wurden nach dem Prinzip der kontinuierlichen, denaturierenden Gelelektrophorese<sup>87</sup> aufgetrennt. Dazu wurden ein *Trenngel* und darauf ein *Sammelgel* gegossen. Zur Untersuchung wurde eine definierte Menge Gesamtprotein eingesetzt. Vor dem Einbringen in die Sammelgeltaschen wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit 6 *x Probenpuffer* oder 1:1 mit 2 *x Probenpuffer* versetzt, gemischt und 10 min. bei 95°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) denaturiert. Der Gellauf erfolgte in einer Hoefer Elektrophoresekammer (Hoefer, San Francisco, CA, USA) bei konstant 100 V, 100 mA – 16 mA für ca. 90 min. mit 1 *x Tankpuffer*. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein vorgefärbter See Blue Protein Standard<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

#### 3.4.4.2 Proteintransfer (Blotting)

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einer Blotting-Apparatur (BioRad, München) auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach/Ts.) transferiert. Der Blotting-Vorgang erfolgte bei konstant 90 V für 90 min. in *Blottingpuffer*.

### 3.4.4.3 Proteindetektion

Vor Inkubation mit dem für das Protein spezifischen Erstantikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Einwirkung von 5 % BSA in *TBST-Puffer* über 60 min. gesättigt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, 1:200 verdünnt in 5% BSA in *TBST*, über Nacht auf einer Wippe bei 4°C im Kühlraum. Am nächsten Tag wurde bei Raumtemperatur weitere 30 min. inkubiert und anschließend viermal mit *TBST* gewaschen.

**ecSOD-Antiserum:** (Sigma Genosys, Großbritannien); polyklonales Antiserum aus Kaninchen spezifisch gerichtet gegen folgende Sequenz der ecSOD aus Rattengewebe:

**H<sub>2</sub>N-Arg-Leu-Asp-Leu-Val-Glu-Lys-Ile-Gly-Asp-Thr-His-Ser-Lys-Asp-COOH**

Das 15 Aminosäuren lange basische Oligopeptid befindet sich im nativen Protein in der carboxyterminalen Domäne, die spezifisch ist für die Bindung der ecSOD an Proteoglycane der Zellmembran. Das Antiserum wurde benutzerspezifisch von der Firma Sigma (Sigma Genosys, Großbritannien) gegen die oben genannte Sequenz gerichtet hergestellt.

Es erfolgte dann die Inkubation mit dem Zweitantikörper gerichtet gegen Kaninchen-IgG (Sigma, München; Verdünnung 1:2.000), der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Nach einstündiger Einwirkzeit werden die überschüssigen Mengen des Zweitantikörpers ebenfalls durch viermaliges Waschen mit *TBST* entfernt. Zur Detektion des gebundenen Antikörpers auf der Membran wird diese für eine Minute in ECL SuperSignal<sup>®</sup> West Pico<sup>®</sup> (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben inkubiert. Durch die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase wird die Oxidation des enthaltenen Luminols durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Die entstehende Chemilumineszenz wurde am Lumi-Imager<sup>™</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim) densitometrisch erfasst und quantifiziert.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Präparation und Analyse von Gesamt-RNA

#### 3.5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Ratten- und Mausgewebe erfolgte nach der TRIzol<sup>®</sup>-Methode (Total RNA Isolation Reagent = monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat) (Invitrogen, Karlsruhe), die eine Modifikation der Methode von *Chomcynski* und *Sacchi* darstellt<sup>88</sup>. Dazu wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenes Gewebe zunächst durch mechanische Zerkleinerung pulverisiert und nach Zugabe von 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz mit dem Ultraturax (Omni 2000; Fa. Klees, Düsseldorf) homogenisiert und lysiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugefügt und etwa 10 – 15 Sekunden auf dem Vortexer geschüttelt. Nach weiteren 3 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 min. bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min., 12.000 x g, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml Ethanol 75 % (v/v) resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min, 7.500 x g, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde ca. 10 min. bei 55°C im Trockenschrank leicht antrocknen gelassen und anschließend in 50 µl RNase freiem *Tris-Puffer pH 7,5* gelöst.

Die Gesamt-RNA aus den Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, isoliert. Dabei wurden je 20 Millionen Zellen 800 µl mitgelieferter Lysis-Puffer zugesetzt. Nachdem die Suspension auf dem Vortexer kurz geschüttelt worden war, wurde sie über eine QIAshredder Spinsäule (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben homogenisiert. Im weiteren Verlauf der RNA-Isolierung wurde ein erweitertes Herstellerprotokoll verwendet, welches einen DNase-Verdau mit einschließt.

Zur Lagerung der RNA wurden die Proben mit 0,1 Volumen *Natriumacetat-Puffer* und dem 2,5-fachen des Volumens an absolutem Ethanol versetzt. Unter diesen Bedingungen fällt die RNA aus und kann so bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ohne Gefahr der Denaturierung gelagert werden. Bei Bedarf wurde die RNA durch Zentrifugation pelletiert und dann nach Trocknung wie oben beschrieben in *Tris-Puffer* aufgenommen.

### 3.5.1.2 Bestimmung der RNA-Qualität und –Konzentration

Zur Überprüfung der Qualität wurde ein Aliquot der Probe UV-spektralphotometrisch bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mit einem Beckmann UV/VIS-Photometer vermessen. Das Verhältnis der Absorptionen bei 230 nm und 260 nm ( $A_{230}/A_{260}$ ) ist bei reinen RNA-Proben nicht größer als 2. Ein niedrigeres Verhältnis deutet auf Verunreinigung mit Guanidinisothiocyanat und Proteinen hin, welche durch weitere Wachschriffe entfernt werden müssen. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) ist ein weiteres Indiz für die Reinheit einer Probe. Es liegt üblicherweise zwischen 1,7 – 2,0. Bei niedrigeren Werten liegt hier eine Verunreinigung durch Proteine vor, die durch eine weitere Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt werden muss.

Die Konzentration der RNA ergibt sich aus der Absorption bei 260 nm, wobei 1 OD einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ssRNA (einzelnsträngige RNA) entspricht.

### 3.5.1.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Integrität der RNA wird mittels einer denaturierenden Gelelektrophorese bestimmt. Bei intakter RNA kann man mittels UV-Detektion zwei diskrete Banden für die 18 S und die 28 S ribosomale RNA (rRNA) erkennen. Für die Herstellung des Gels wurden 0,8 g Agarose zusammen mit 8 ml  $10 \times E\text{-Puffer}$  und 58,4 ml *DEPC-Wasser* aufgeköcht. Nach Abkühlung der Agaroselösung wurden ihr 13,6 ml Formaldehyd zugesetzt und das Gel gegossen. Vor der Elektrophorese wurden 1  $\mu\text{l}$  und 2  $\mu\text{l}$  der RNA-Lösung mit 9  $\mu\text{l}$  bzw. 8  $\mu\text{l}$  *Denaturierungslösung* versetzt und 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  in einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) erhitzt. Der Gellauf erfolgte bei konstant 60 V in  $0,5 \times TBE\text{-Puffer}$ .

### 3.5.2 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Durch die RT-PCR lassen sich spezifische RNA-Sequenzen amplifizieren, nachdem die RNA *in vitro* durch eine Erststrangsynthese in cDNA umgeschrieben wurde. Bei der Erststrangsynthese dient die RNA als Matrize. Die reverse Transkription der RNA erfolgte mit dem Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Als Primer wurden hierbei Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Es handelt sich dabei um 15 bp lange Oligonukleotide, welche am poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisieren. Dadurch werden selektiv aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Auf diese Weise erhält man die gesamte mRNA-Sequenz als komplementäre DNA (cDNA).

In der anschließenden PCR dient ein DNA/RNA-Doppelstrang, welcher aus der vorangegangenen reversen Transkription resultiert, als Matrize. Bei der PCR wurden spezifische Primer für das interessierende Gen, hier ecSOD und GAPDH (s. Tab. 3.2), eingesetzt, um so eine bestimmte Sequenz aus diesem Gen zu amplifizieren. Die PCR wurde mit PuRe Taq™ Ready-to-go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg) laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Alle PCR-Produkte wurden zur Verifizierung der Identität am Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sequenziert.

Spezies	Gen	Primersequenzen	
		Sense	Antisense
Ratte	ecSOD	5'-ATG GTG GCC TTC TTG TTC TGC-3'	5'-GTG CTG TGG GTG CGG CAC ACC-3'
	GAPDH	5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'	5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'
Maus	ecSOD	5'-CTG GCG GCC TGT GGC TCT GT-3'	5'-GCG GCC CAA GAT GGC GTG C-3'
	GAPDH	5'-CCG GTG CTG AGT ATG TCG TG-3'	5'-GCC ACA GCT TTC CAG AGG G-3'

Tab. 3.2 Sequenzen der spezifischen Primer für die ecSOD- und GAPDH-mRNA in Ratte und Maus

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte densitometrisch durch Aufnahme der UV-Fluoreszenz, die aus der Reaktion der Amplifikate mit Ethidiumbromid resultierte, mit einer CCD-Kamera. Anschließend wurden diese Daten am Lumi-Imager™ (Roche Diagnostics, Mannheim) ausgewertet. Die Auswertung wurde semiquantitativ durchgeführt, indem die Signale der ecSOD-Sequenz mit denen der GAPDH-Sequenz ins Verhältnis gesetzt wurden. Bei dem GAPDH-Gen handelt es sich um ein so genanntes „housekeeping“-Gen, das als Bezug verwendet wurde.

### **3.6 Statistik**

Alle biochemischen Messdaten sind dargestellt als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes). Alle Daten wurden einem zweiseitigen Student's t-Test oder einer Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Test unterzogen. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl der Versuchstiere wurde mit n bezeichnet.



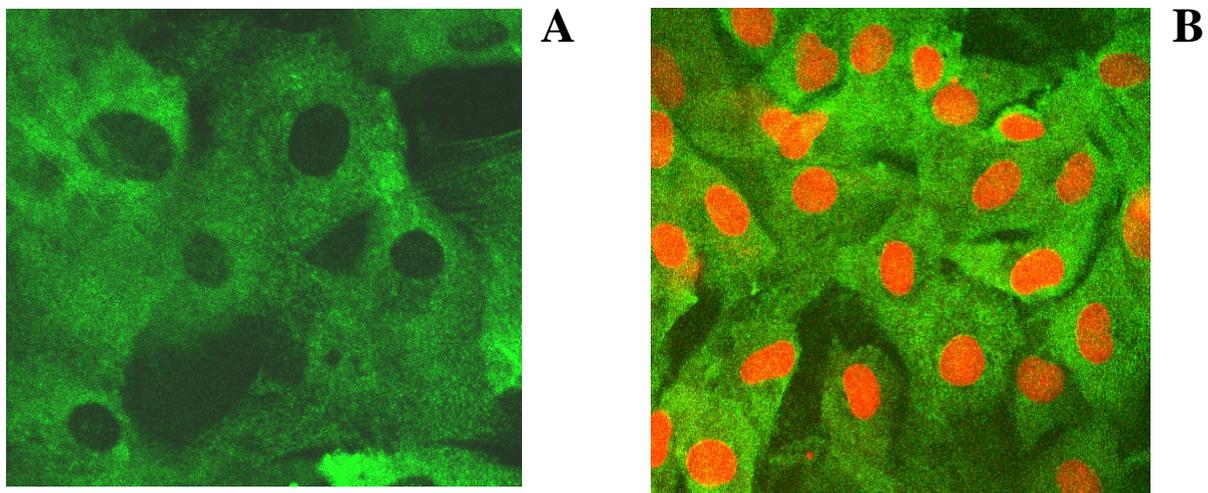
## **4 ERGEBNISSE**

---



## 4.1 Glatte Muskelzellen aus Rattenaorten als Zellmodell

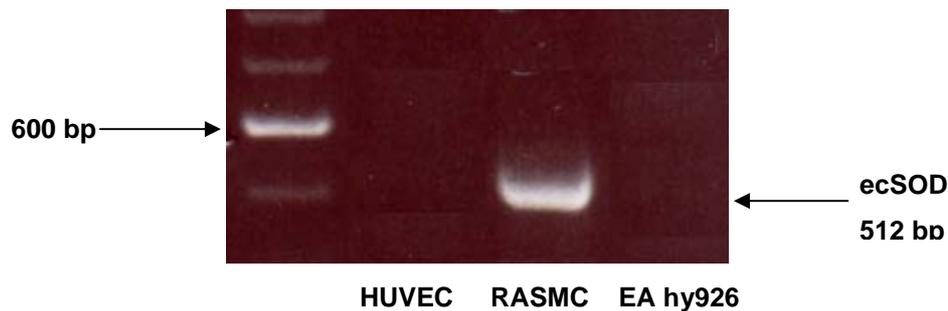
Aus der Aorta von männlichen Wistar-Ratten wurden wie unter 4.3.2 beschrieben glatte Muskelzellen isoliert und charakterisiert (vgl. Kapitel 4.3.3). Zur Charakterisierung wurde das für glatte Muskelzellen typische  $\alpha$ -Actin angefärbt. Unter dem confokalen Laserscanningmikroskop (LSM) fluoreszierte das  $\alpha$ -Actin nach Exzitation bei einer Wellenlänge von 488 nm grün (Emission 505 nm), während die mit Propidiumiodid gefärbten Zellkerne nach Exzitation bei 543 nm (Emission 560 nm) rot fluoreszierten (s. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1** Charakterisierung glatter Muskelzellen aus Rattenaorta (RASMC)

Exemplarische Darstellung von glatten Muskelzellen mit dem confokalen Mikroskop. Actinbündel wurden durch spezifischen, FITC-markierten Antikörper gegen  $\alpha$ -Actin sichtbar gemacht (A). Gleichzeitig erfolgte die Färbung der DNA mit Propidiumiodid zur Visualisierung des Zellkerns (B). Antikörperverdünnung 1:200, Propidiumiodidkonzentration 10  $\mu$ g/ml, Objektiv: Plan 63x/1.4 Öl.

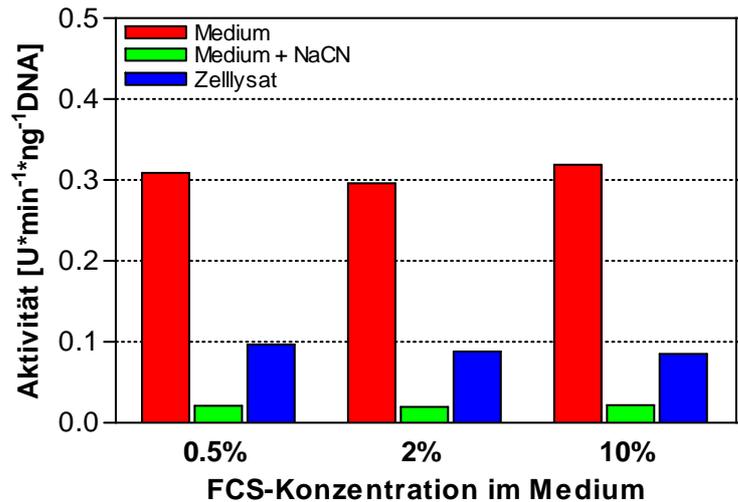
Das antioxidative Enzym ecSOD wird zunächst in glatten Muskelzellen gebildet und anschließend in den interstitiellen Raum exocytiert<sup>76</sup>, wo es an Proteoglycane und Heparansulfate an den Zelloberflächen bindet. Im Gegensatz zu vaskulären glatten Muskelzellen sind die NO<sup>•</sup>-bildenden Endothelzellen nicht in der Lage ecSOD zu synthetisieren (s. Abb. 4.2). Die mRNA, die für ecSOD codiert, konnte weder in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) noch in EA hy 926-Zellen (permanente Hybridzelle aus Endothelzellen und einer Tumorzelle) nachgewiesen werden.



**Abb. 4.2** Nachweis der PCR-Produkte für ecSOD in verschiedenen Zelltypen

Nachweis der ecSOD-mRNA nach RT-PCR in humanen Endothelzellen aus Umbelikalvene (HUVEC), glatten Muskelzellen aus Rattenaorta (RASMC) und einer permanenten humanen Endothelzelllinie (EA hy926). Das PCR-Produkt der ecSOD besitzt eine Größe von 512 bp. Nur in glatten Muskelzellen konnte die mRNA der ecSOD nachgewiesen werden.

RASMC wurden im Folgenden mit verschiedenen Konzentrationen fötalen Kälberserums (FCS) über 5 Tage kultiviert, um zu prüfen, ob das für die Zellkultivierung benötigte Serum die Aktivität der ecSOD beeinflusst. In Abb. 4.3 ist die Aktivität der ecSOD beispielhaft nach Kultivierung mit FCS-Konzentrationen zwischen 0.5 % und 10 % dargestellt. Dabei wurde die ecSOD-Aktivität auf den DNA-Gehalt in ng bezogen.



**Abb. 4.3** Aktivität der ecSOD nach Kultivierung der RASMC mit verschiedenen Konzentrationen FCS im Versuchsmedium

Dargestellt ist die Aktivitätsmessung der ecSOD im Medium (■) und in Zellysaten (■) nach Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen FCS. Zusätzlich wurde die ecSOD-Aktivität im Medium unter Hemmung der ecSOD mit NaCN (■) bestimmt.

Unter Einfluss von niedrigen Konzentrationen FCS (0.5 % und 2 %) unterschied sich die Aktivität der ecSOD nicht von der Aktivität, die im Medium mit 10 % FCS gemessen wurde (s. Abb. 4.3). Um die Spezifität der enzymatischen Messung zu überprüfen, wurden dem Medium vor der Aktivitätsbestimmung Natriumcyanid (NaCN) zugesetzt. NaCN komplexiert das zentrale Kupferatom und hemmt somit die ecSOD in ihrer Aktivität. Wie aus Abb. 4.3 hervorgeht, wurde die enzymatische Aktivität durch das NaCN fast vollständig blockiert. Weiterhin ist zu erkennen, dass der überwiegende Anteil der ecSOD-Aktivität im Medium nachgewiesen wurde. Zellysate enthielten lediglich 20 – 30 % der Gesamtaktivität. Dies bedeutet, dass RASMC in der Lage sind, die ecSOD zu synthetisieren, das Enzym jedoch nicht speichern sondern es überwiegend ins Medium sezernieren.

## 4.2 Einfluss von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen auf die ecSOD in RASMC

Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\bullet$ ) ist einer der für die Gefäßreaktivität wichtigsten endogenen Mediatoren.  $\text{NO}^\bullet$  wird durch die konstitutiv in Endothelzellen der Gefäße exprimierte eNOS gebildet und erreicht über das Interstitium die glatten Muskelzellen, wo es cytosolisch über die Aktivierung des cGMP-abhängigen Signalwegs die Relaxation der Gefäße bewirkt. Unter inflammatorischen Bedingungen kann  $\text{NO}^\bullet$  auch durch die induzierbare NOS (iNOS) gebildet werden. Die Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}^\bullet$  wird durch oxidativen Stress reduziert, da Sauerstoffradikale mit  $\text{NO}^\bullet$  zum cytotoxischen Peroxynitrit reagieren.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Diabetes mellitus sowohl mit einer verringerten  $\text{NO}^\bullet$ -Bioverfügbarkeit als auch mit vermehrtem oxidativen Stress assoziiert ist<sup>56;89;90</sup>. Durch die Reaktion von Sauerstoffradikalen und  $\text{NO}^\bullet$  zu Peroxynitrit wird die Wirkung der zellprotektiven Eigenschaften des  $\text{NO}^\bullet$  unterbunden. Synergistisch dazu schädigen sowohl Sauerstoffradikale als auch das reaktive Peroxynitrit selbst das Endothel.

In dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativ wirkende extrazelluläre Superoxiddismutase *in vitro* untersucht werden. Daran anschließend sollte geprüft werden, ob und in welchem Maße Stickstoffmonoxid an der Regulation des Enzyms beteiligt ist.

### 4.2.1 Untersuchungen zum Einfluss von hoher Glucose auf ecSOD in RASMC

Die ecSOD reduziert Superoxidradikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu  $H_2O_2$ . Auf diesem Weg kann das Enzym Zellen vor Schäden durch oxidativen Stress schützen. Daher sollte als erstes untersucht werden, ob der unter hohen Glucosekonzentrationen vermehrt auftretende Sauerstoffstress die ecSOD reguliert.

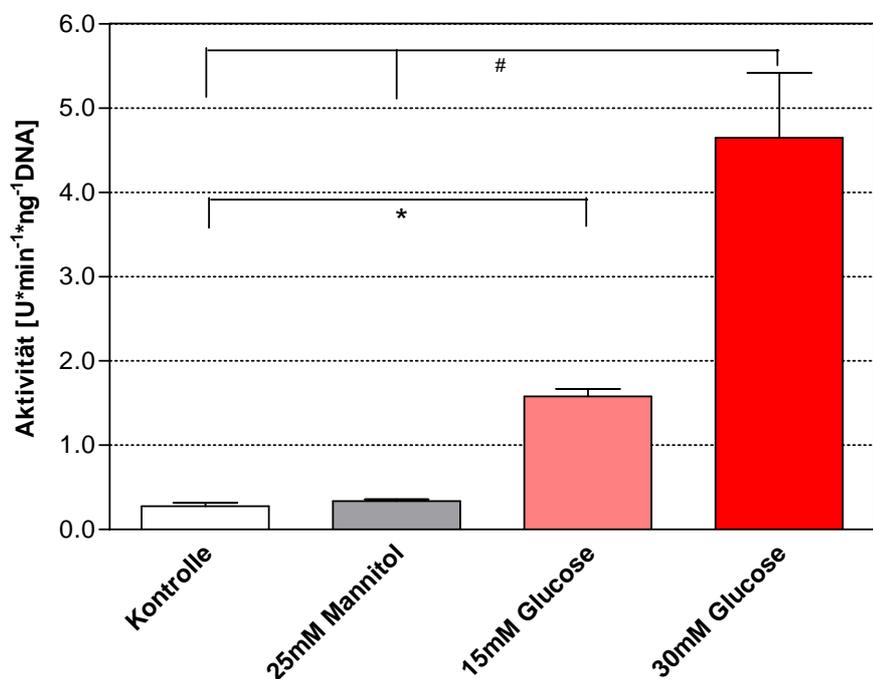
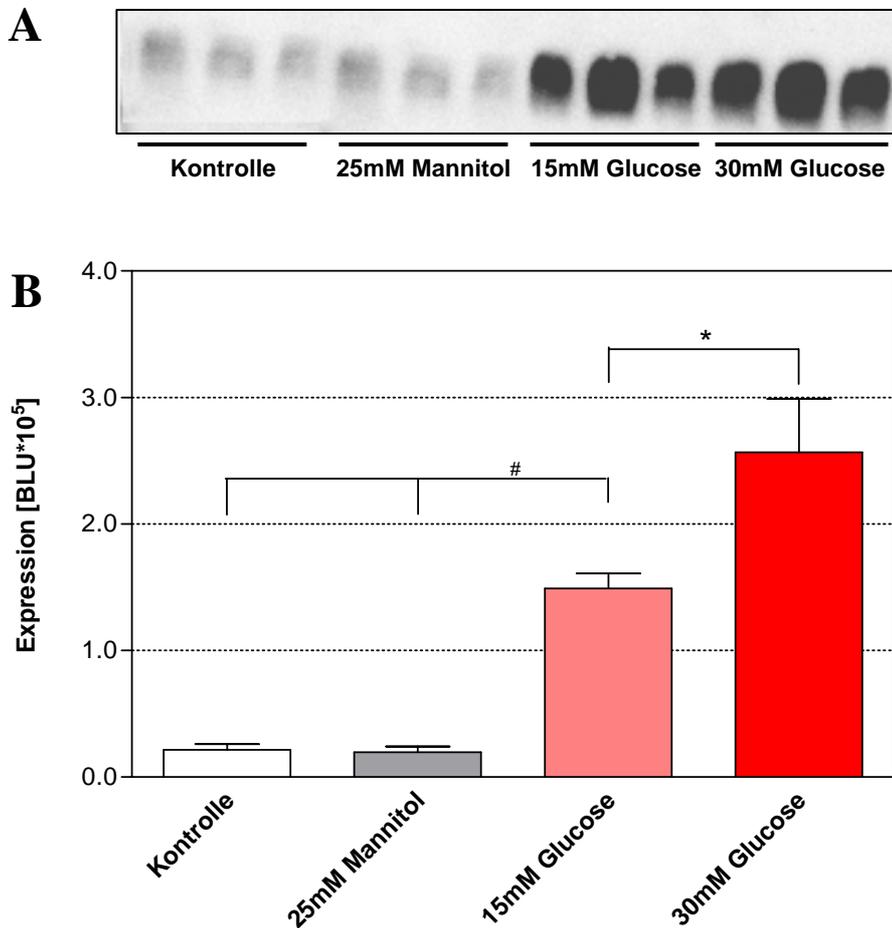


Abb. 4.4 ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit Mannitol und Glucose

Bestimmung der ecSOD-Aktivität im Medium nach Behandlung der RASMC über 96 h mit 25 mM Mannitol, 15 mM Glucose, 30 mM Glucose und 5 mM Glucose (Kontrollbedingungen). Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  Einzelexperimenten. \*  $p<0,001$ ; #  $p<0,0001$ ; One-way ANOVA.

Aus Abb. 4.4 geht hervor, dass die Aktivität der ecSOD durch Inkubation mit erhöhten Konzentrationen Glucose dosisabhängig ansteigt. Nach Inkubation mit 30 mM Glucose wurde eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 10 beobachtet. Dass die Hochregulation der ecSOD-Aktivität eine direkte Folge der Glucosekonzentrationen und nicht eines osmotischen Effekts ist, wurde bewiesen, indem RASMC in vergleichenden Untersuchungen mit 25 mM Mannitol und 5 mM Glucose inkubiert wurden, um den osmotischen Effekt des 30 mM

Glucoseansatzes zu imitieren. Die ecSOD-Aktivität zeigte unter 25 mM Mannitol keine Veränderungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen (s. Abb. 4.4).

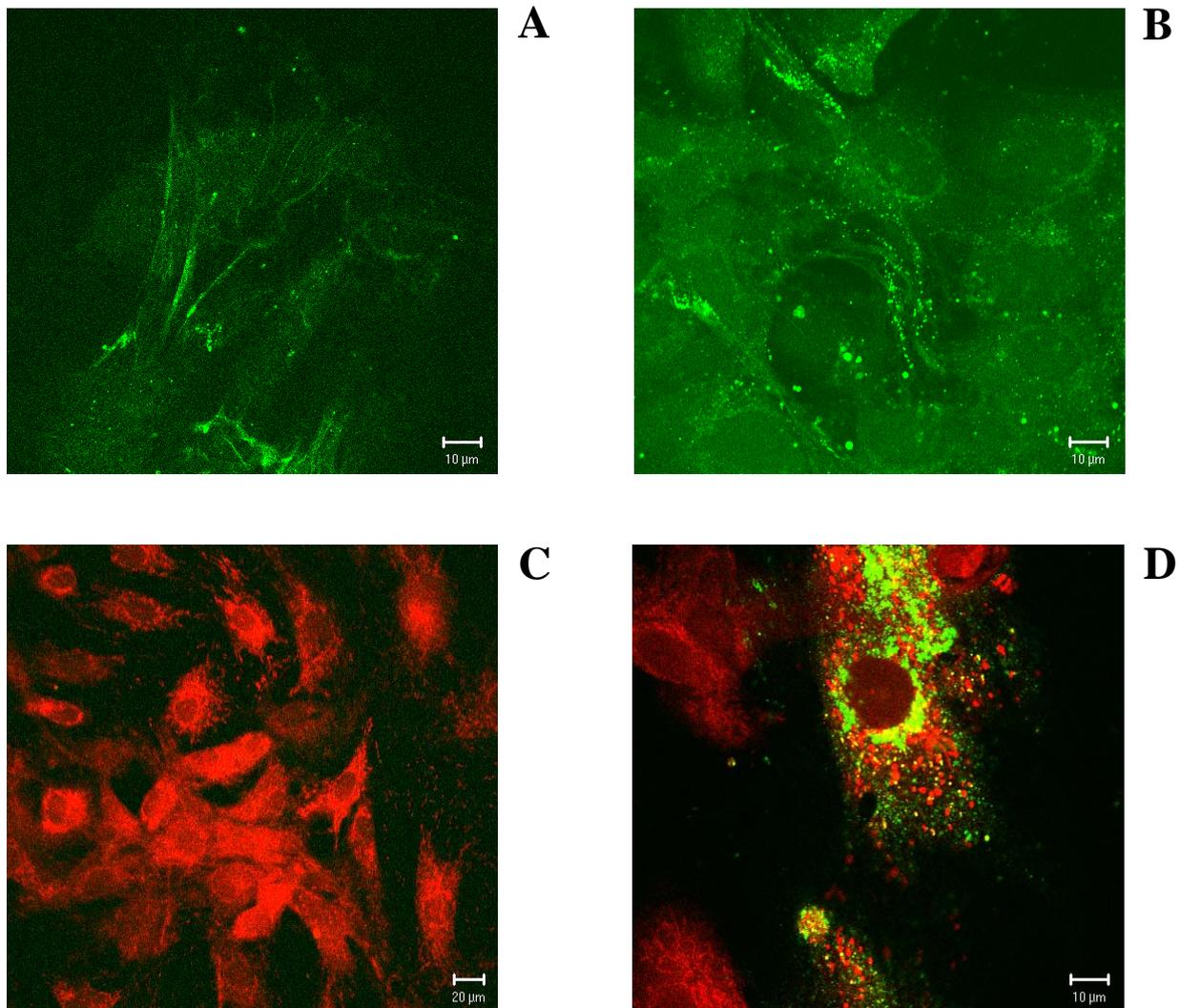


**Abb. 4.5** *Proteinexpression der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit Mannitol und Glucose*

*Bestimmung der ecSOD-Expression im Medium nach 96 h Inkubation der RASMC mit 25 mM Mannitol, 5 mM, 15 mM und 30 mM Glucose. Repräsentativer Western Blot (A) mit densitometrischer Auswertung in der Darstellung der Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  Einzelerperimenten. \*  $p<0,05$ ; #  $p<0,001$ ; One-way-ANOVA (B).*

Parallel zur Aktivität war auch das Protein bei Inkubation mit 15 mM Glucose 7,5fach und mit 30 mM Glucose 10fach stärker exprimiert als unter Kontrollbedingungen. Die gesteigerte Aktivität der ecSOD ist demzufolge auf eine vermehrte Proteinexpression des Enzyms zurückzuführen (s. Abb. 4.5).

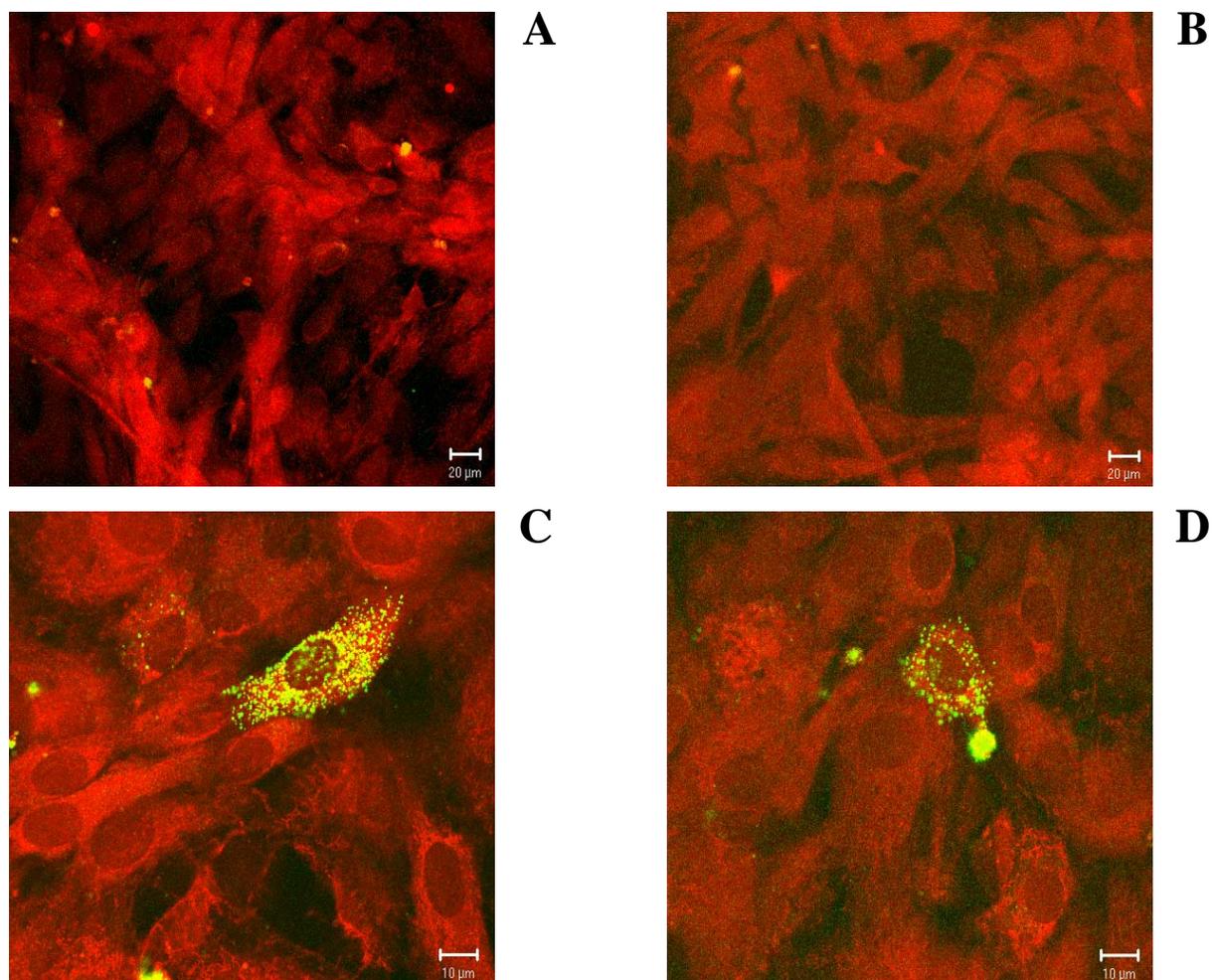
Durch Färbung mit dem Fluorescein-Derivat CM H<sub>2</sub>DCF-DA wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen in RASMC nachgewiesen. Wie Abb. 4.6 zeigt, werden bei 96 Stunden Inkubation von RASMC mit hohen Glucosekonzentrationen massiv reaktive Sauerstoffintermediate gebildet.



**Abb. 4.6** DCF-Färbung von RASMC

Färbung von RASMC mit dem Fluorescein-Derivat DCF zum Nachweis von Sauerstoffradikalen (A, B; Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil) bzw. in einer Doppelfärbung mit MitoTracker Red CMXRos™ (C; Objektiv: Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil und D; Objektiv: Plan-Apochromat 100x/1.4 Oil) nach 96 Stunden Inkubation mit 5 mM Glucose (A, C) und 30 mM Glucose (B, D).

Um zu prüfen, ob nicht nur bei langfristiger Inkubation von RASMC mit hohen Glucosekonzentrationen sondern auch bei kurzer Inkubationsdauer mit 30 mM Glucose die Bildung von ROS verstärkt wird, wurden Zellen 60 Minuten lang mit 30 mM Glucose behandelt. Anschließend wurden die Zellen zur Darstellung der ROS mit DCF und zur Visualisierung der Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos™ gefärbt. Die Bilder zeigt Abb. 4.7. Es ist zu erkennen, dass eine Inkubationsdauer von 60 min. mit 30 mM Glucose nicht ausreicht, um die Generierung von Sauerstoffradikalen zu induzieren. Unter beiden Inkubationsbedingungen produzierten lediglich einzelne Zellen Sauerstoffradikale (Abb. 4.7 C und D).

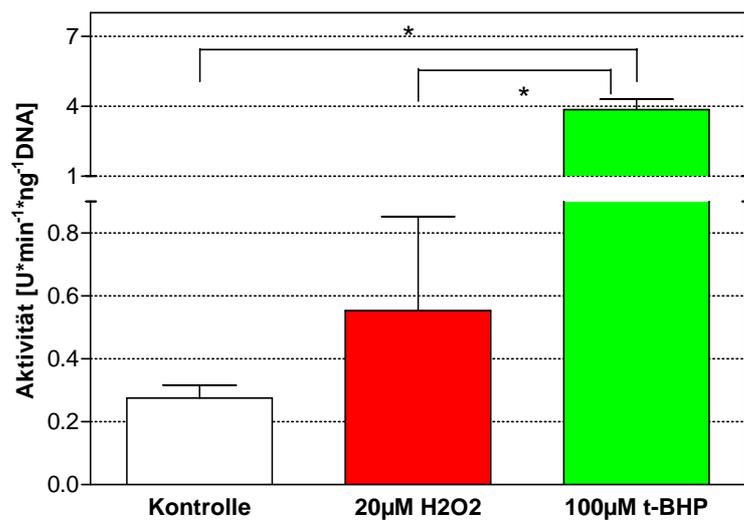


**Abb. 4.7** Doppelfärbung der RASMC mit Mitotracker und DCF

RASMC wurden nach 60 min. Exposition gegenüber 5 mM Glucose (A und C) und 30 mM Glucose (B und D) mit dem Mitochondrienfarbstoff Mitotracker (rot) und mit DCF (grün) gefärbt. Aus der Überlagerung beider Farbstoffe ergibt sich eine gelbe Färbung. Die Bilder C und D zeigen jeweils eine Ausschnittsvergrößerung aus den Bildern A und B. Objektive: Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil (A, B) und Plan-Apochromat 100x/1.4 Oil (C, D)

#### 4.2.2 Untersuchungen zum Einfluss von Radikalbildnern auf die ecSOD

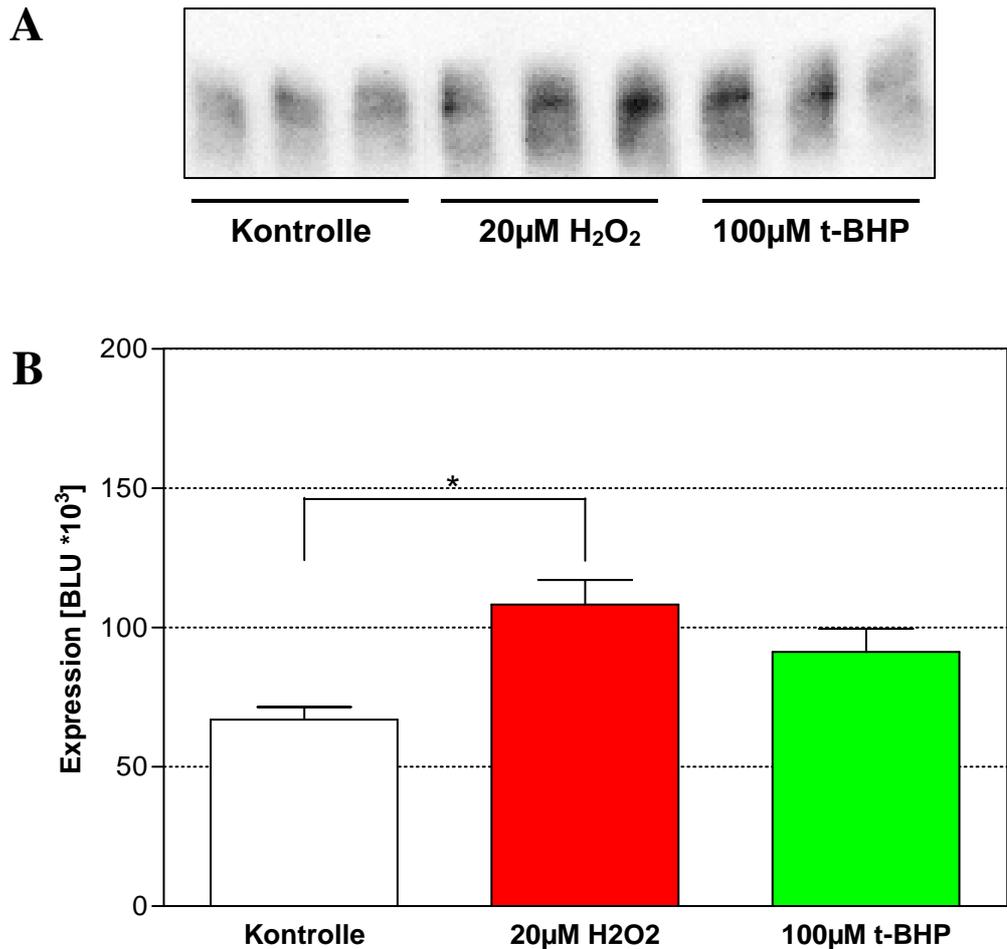
Um den Einfluss des oxidativen Stress auf die Regulation der ecSOD zu untersuchen, wurden RASMC 96 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  t-BHP (tert. Butylhydroperoxid) inkubiert. Hintergrund der Behandlung mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) war die Überlegung, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum einen als Produkt der Dismutation von Superoxidradikalen in einer Rückkopplungsreaktion selbst die ecSOD regulieren könnte, zum anderen kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgrund seiner schwachen O-O-Bindung durch homolytische Spaltung zu Hydroxylradikalen zersetzt werden und dadurch eine Regulation der ecSOD bewirken. t-BHP zerfällt als organisches Peroxid in Hydroxyl- ( $\text{OH}^\bullet$ ) und Superoxidradikale ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), die beide als regulatorische Sauerstoffspezies für die ecSOD in Betracht gezogen werden können.



**Abb. 4.8** ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit Radikalbildnern

Entwicklung der ecSOD-Aktivität im Medium nach 96 h Inkubation der Zellen mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und tert. Butylhydroperoxid (t-BHP) zur Erzeugung von Sauerstoffstress. Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  Einzelerperimenten. \*  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA.

Unter Einfluss von Wasserstoffperoxid war die Aktivität der ecSOD im Medium der behandelten Zellen um das 2fache erhöht. Jedoch streuten die Werte unter  $H_2O_2$ -Behandlung stark, so dass das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde (s. Abb. 4.8). Eine wesentlich stärkere Aktivierung der ecSOD trat bei Inkubation der RASMC mit t-BHP auf. Sie lag um das 13fache über der Aktivität, die unter Kontrollbedingungen bestimmt wurde (s. Abb. 4.8).



**Abb. 4.9** ecSOD Protein-Expression im Medium nach Inkubation der RASMC mit Radikalbildnern

Veränderung der ecSOD-Expression nach 96 h Inkubation mit 20 µM  $H_2O_2$  und 100 µM t-BHP. Die Bestimmung erfolgte aus dem Medium. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (A) und die densitometrische Auswertung als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  einzelnen Experimenten (B). \*  $p < 0,05$ ; One-way-ANOVA.

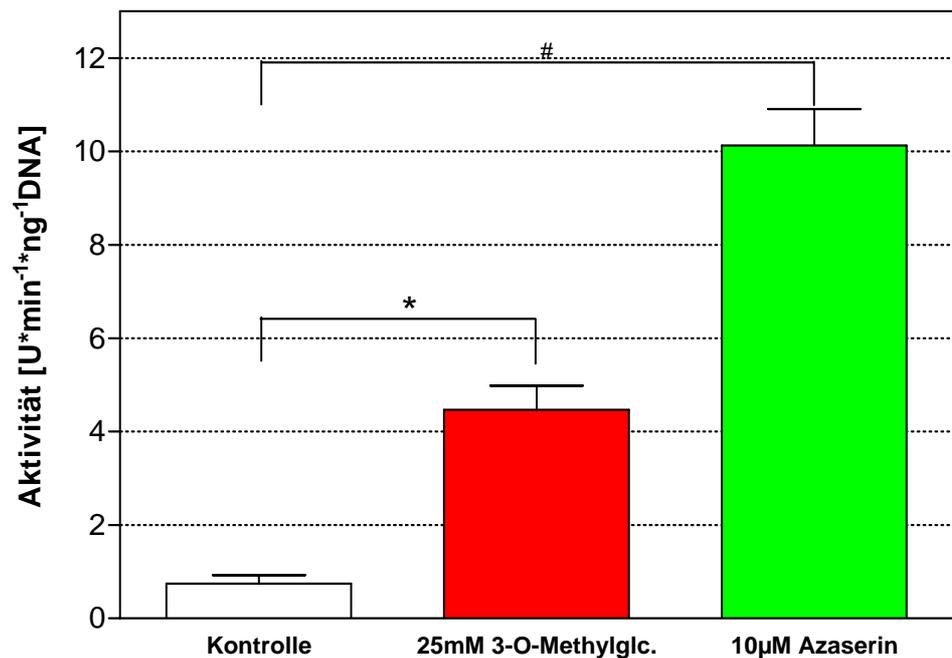
Sowohl  $H_2O_2$  als auch t-BHP verursachten eine leichte Erhöhung der ecSOD-Expression. Jedoch erreichte nur der unter  $H_2O_2$  bestimmte Wert statistische Signifikanz (s. Abb. 4.9).

### 4.2.3 Veränderungen der ecSOD durch Eingriff in den Glucosestoffwechsel

Um den Einfluss der im Diabetes veränderten Glucosehomöostase auf die Aktivität und Expression der ecSOD zu untersuchen, wurden RASMC in den folgenden Ansätzen mit 3-O-Methylglucose (3-OMG) inkubiert. Das Glucose-Derivat wird von den Zellen zwar aufgenommen, kann aber nicht verstoffwechselt werden, da keine Phosphorylierung des 3-OMG erfolgt. Das Derivat ermöglicht somit die Untersuchung, ob die glucoseabhängigen Wirkungen auf die ecSOD eine Verstoffwechslung des Zuckers voraussetzen.

Zum anderen wurde der Hexosaminweg, ein wichtiger im Diabetes vermehrt genutzter Weg des Glucosemetabolismus, blockiert. Ausgehend von einer forcierten Glycolyse wird die Glyceralphosphatdehydrogenase (GAPDH), ein Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, durch die hyperglycämieinduzierte Bildung reaktive Sauerstoffspezies gehemmt. Die Akkumulation von Glucose-6-phosphat, führt zu einer vermehrten Nutzung alternativer Glucosestoffwechselwege, u.a. des Hexosaminweges. Als Folge der Aktivierung des Hexosaminstoffwechsels werden Veränderungen in der Genexpression von Wachstumsmediatoren (z.B. TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1)<sup>51</sup> und in der Funktion von Proteinen (z.B. eNOS)<sup>91</sup> diskutiert, die für die langfristigen Folgen des Diabetes von Bedeutung sind. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Signalwegs ist die Glutamin:Fructose-6-phosphat-Amidotransferase (GFAT), durch die Glucose-6-phosphat zu Glucosamin-6-phosphat transaminiert wird.

Um zu untersuchen, ob der Hexosaminstoffwechselweg die Aktivität und Expression der ecSOD beeinflusst, wurden RASMC mit 10  $\mu$ M Azaserin, einem spezifischen Inhibitor der GFAT, inkubiert.



**Abb. 4.10** Aktivität der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit Inhibitoren des Glucosestoffwechsels

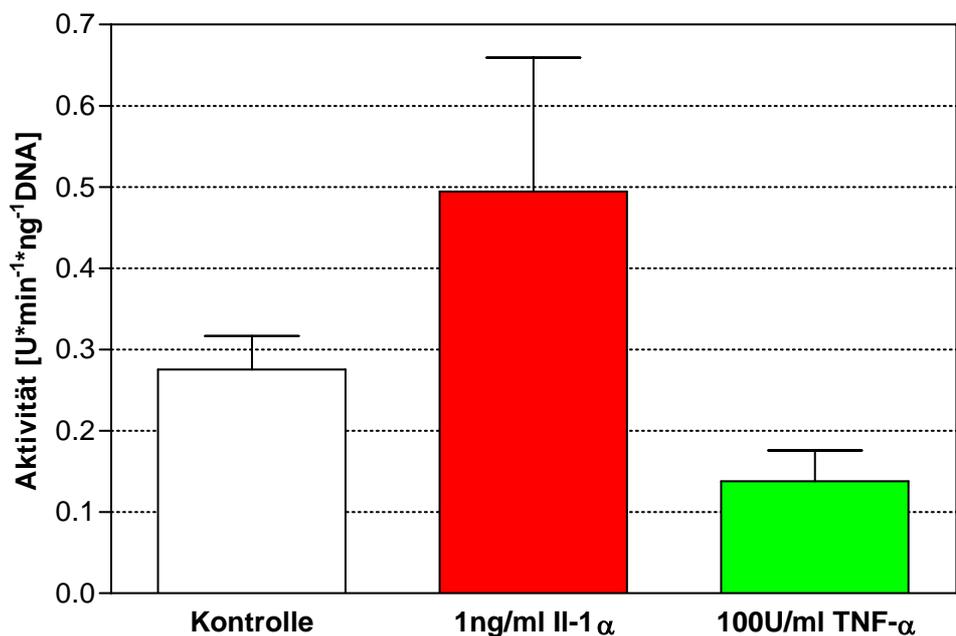
Bestimmung der ecSOD-Aktivität im Medium nach Behandlung der vaskulären glatten Muskelzellen über 96 h mit 25 mM 3-O-Methylglucose, 10 µM Azaserin und unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  einzelnen Experimenten. \*  $p<0,01$ ; #  $p<0,001$ ; One-way ANOVA.

Unter Einfluss von 25 mM 3-O-Methylglucose kam es zu einer Erhöhung der ecSOD-Aktivität im Medium der behandelten Zellen. Die Aktivität stieg dabei von  $0,744 \pm 0,182$  U / min / ng DNA auf  $4,469 \pm 0,519$  U / min / ng DNA. Bei Hemmung der GFAT durch Azaserin stieg die Aktivität der ecSOD gegenüber der Anfangsaktivität ebenfalls signifikant an, wobei der Anstieg stärker ausgeprägt war als unter 3-OMG. (s. Abb. 4.10).

#### 4.2.4 Bedeutung inflammatorischer Cytokine bei der Regulation der ecSOD

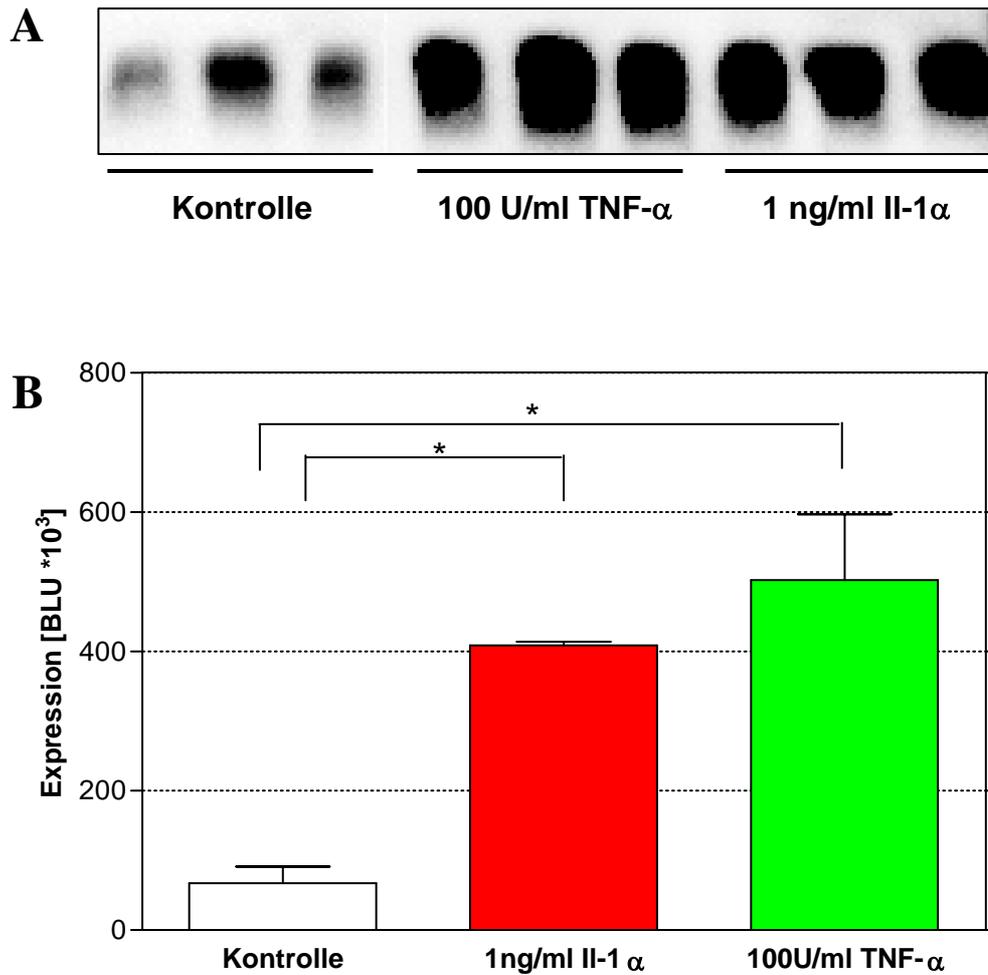
In Folge der Diabeteserkrankung lassen sich im Blut von diabetischen Patienten vermehrt Cytokine (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  u.a.) nachweisen, die einen proinflammatorischen Zustand zu Beginn der Diabetesmanifestation anzeigen. Exemplarisch wurden daher die Einflüsse von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  auf die ecSOD untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass nach 96 h Inkubation mit IL-1 $\alpha$  die ecSOD-Aktivität um 80 % gesteigert war (s. Abb. 4.11), während die Proteinexpression im Vergleich zu Kontrollbedingungen lediglich um 25 % erhöht war (s. Abb. 4.12). Überraschenderweise verursachte die Inkubation mit TNF- $\alpha$  zwar eine verstärkte Expression der ecSOD (s. Abb. 4.12), jedoch nahm die Aktivität leicht ab (s. Abb. 4.11). Die Expression spiegelt somit nicht die Aktivität wider.



**Abb. 4.11** ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit inflammatorischen Cytokinen

Entwicklung der ecSOD-Aktivität im Medium nach 96 h Inkubation der Zellen mit Interleukin Il-1 $\alpha$  und Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$ . Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  einzelnen unabhängigen Experimenten.



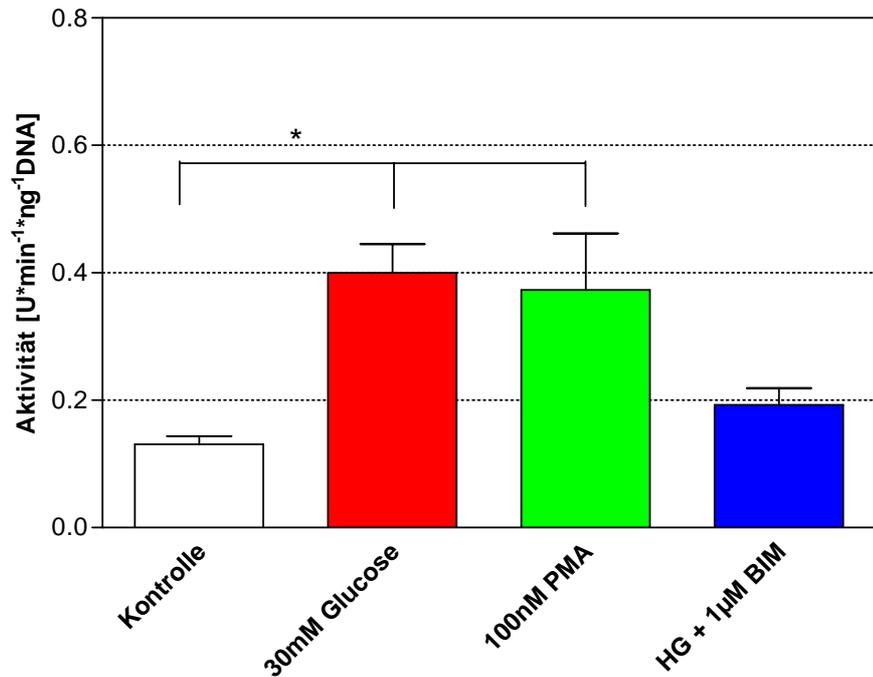
**Abb. 4.12** *ecSOD Protein-Expression im Medium nach Inkubation der RASMC mit inflammatorischen Cytokinen*

*Veränderung der ecSOD-Expression nach 96 h Inkubation der RASMC mit 1 ng/ml Il-1 α und 100 U/ml TNF-α. Die Bestimmung erfolgte aus dem Medium. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (A) und die densitometrische Auswertung als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  einzelnen Experimenten (B). \*  $p<0,01$ ; One-way-ANOVA.*

#### 4.2.5 Einfluss auf die ecSOD durch Regulation der PKC

Im Diabetes mellitus und bei Inkubation von verschiedenen Zellarten mit hohen Glucosekonzentrationen kommt es zur Aktivierung der PKC. Davon sind jedoch nur einzelne Isoformen betroffen. Es scheinen dabei vor allem die Untereinheiten PKC  $\alpha$  und PKC  $\beta$  involviert zu sein. Die Aktivierung der PKC stellt ebenso wie die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten einen entscheidenden Schritt in der Modifizierung von Signaltransduktionsketten dar, die zur Anpassung der Zellaktivitäten an hyperglycämische Bedingungen führen. Die Phosphorylierung der eNOS, des Insulinrezeptors und verschiedener MAP-Kinasen stellen typische Konsequenzen dar.

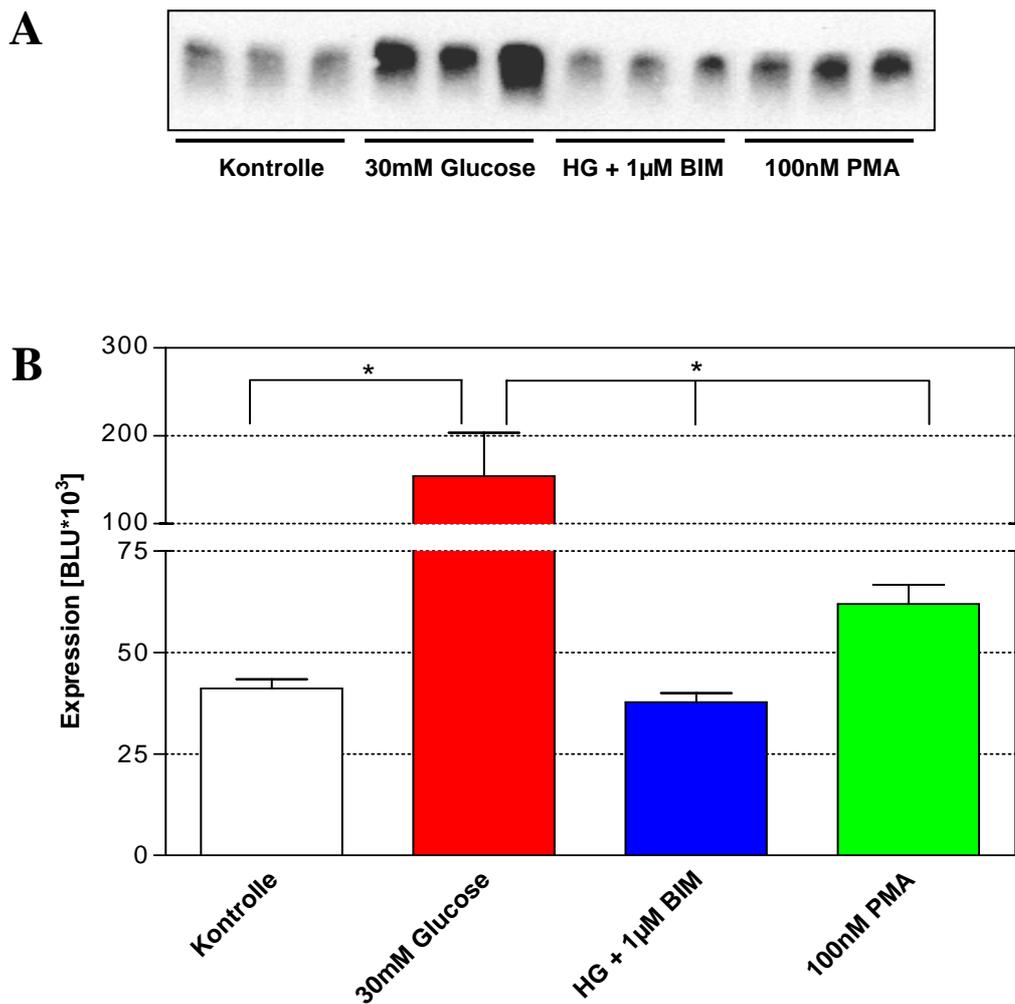
Um zu untersuchen, ob die glucoseabhängige Aktivierung der PKC für die Hochregulation der ecSOD von Bedeutung ist, wurden RASMC sowohl mit hoher Glucose als auch einem Aktivator der PKC, dem Phorbolester Phorbol-12-myristat-13-acetat, sowie mit hoher Glucose unter gleichzeitigem Zusatz des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid (BIM) inkubiert.



**Abb. 4.13** *ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit PKC regulierenden Substanzen*

*Entwicklung der ecSOD-Aktivität nach 96 h Inkubation mit dem PKC-Stimulans PMA und dem PKC-Inhibitor BIM. Als Vergleich wurde mit 5 mM Glucose (Kontrolle) und 30 mM Glucose (HG) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  Einzelerperimenten. \*  $p<0,05$ ; One-way ANOVA.*

Unter Einfluss des PKC-Aktivators PMA erhöhte sich die Aktivität der ecSOD von  $0,131 \pm 0,013$  U / min / ng DNA auf  $0,373 \pm 0,088$  U / min / ng DNA, und zeigt damit ein ähnliches Ausmaß wie durch Inkubation der Zellen mit hoher Glucose erreicht wurde (s. Abb. 4.13). Die glucoseabhängige Erhöhung der ecSOD-Aktivität wurde durch den PKC-Inhibitor BIM nahezu vollständig blockiert.

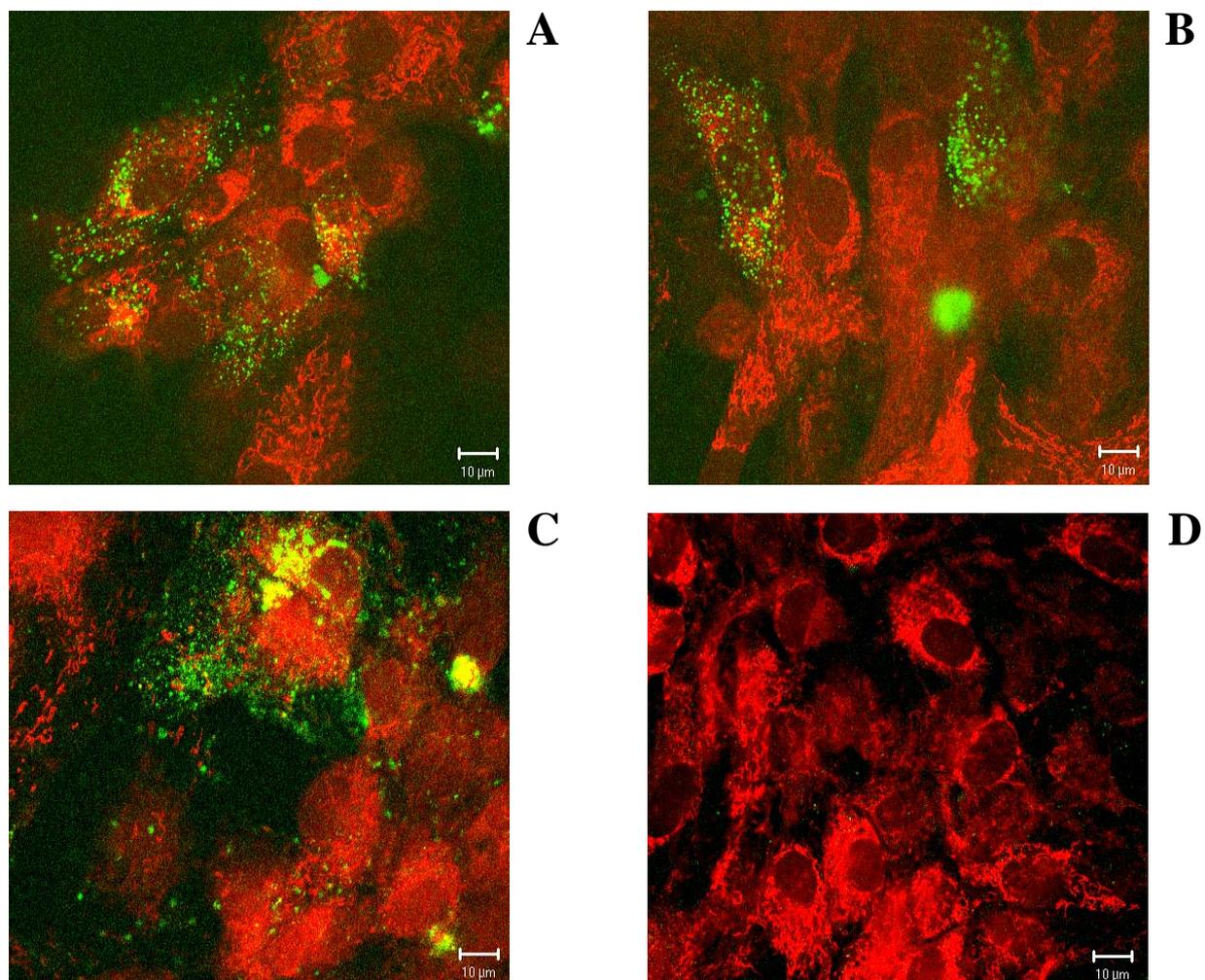


**Abb. 4.14** *ecSOD-Protein im Medium nach Inkubation der RASMC mit PKC regulierenden Substanzen*

Veränderung der *ecSOD*-Expression nach 96 h Inkubation mit dem PKC-Stimulans PMA und dem PKC-Inhibitor BIM. Als Vergleich wurde mit 5 mM Glucose (Kontrolle) und 30 mM Glucose (HG) inkubiert. Die Bestimmung erfolgt aus dem Medium. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (A) und die densitometrische Auswertung als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  einzelnen Experimenten (B). \*  $p < 0,05$ ; One-way-ANOVA.

Nicht nur die Zunahme der *ecSOD*-Aktivität durch hohe Glucosekonzentrationen wurde durch die Inhibition der PKC reduziert, sondern auch die unter Glucose beobachtete gesteigerte Expression des *ecSOD*-Proteins wurde gesenkt (s. Abb. 4.14). Die unter Einfluss von PMA erhöhte Aktivität ließ sich im Western Blot nicht bestätigen.

Bei der Überlagerung der beiden Farbstoffe CMXRos™ (Mitotracker Red) und DCF resultiert eine Gelbfärbung, die eine Bildung von Sauerstoffradikalen durch die Mitochondrien anzeigt (s. Abb. 4.15C). Ein weiterer Befund, der aus Abb. 4.15C hervorgeht, ist, dass neben der Generation der ROS in den Mitochondrien der RASMC (Gelbfärbung) diese Zellen ebenfalls cytosolisch Sauerstoffradikale bilden (Grünfärbung). Wird der Elektronentransport in den Mitochondrien durch Blockade des Komplex II mittels TTFA inhibiert, ist keine Gelbfärbung zu erkennen, d.h. die mitochondrielle Generation von ROS ist unterbunden (Abb. 4.15A und B).



**Abb. 4.15** Färbung der RASMC nach Inkubation mit Glucose, Apocynin und TTFA

RASMC wurden 60 min gleichzeitig mit TTFA und 5 mM Glucose (A) bzw. 30 mM Glucose (B) inkubiert. In einem anschließenden Versuch wurden RASMC 96 Stunden mit 30 mM Glucose (C) bzw. gleichzeitig mit 30 mM Glucose + 30  $\mu$ M Apocynin und 10  $\mu$ M TTFA (in der letzten Stunde vor Färbung) (D) inkubiert. Die Zellen wurden mit Mitotracker (rot) und DCF (grün) gefärbt. Objektiv: Plan-Apochromat 100x/1.4 Oil.

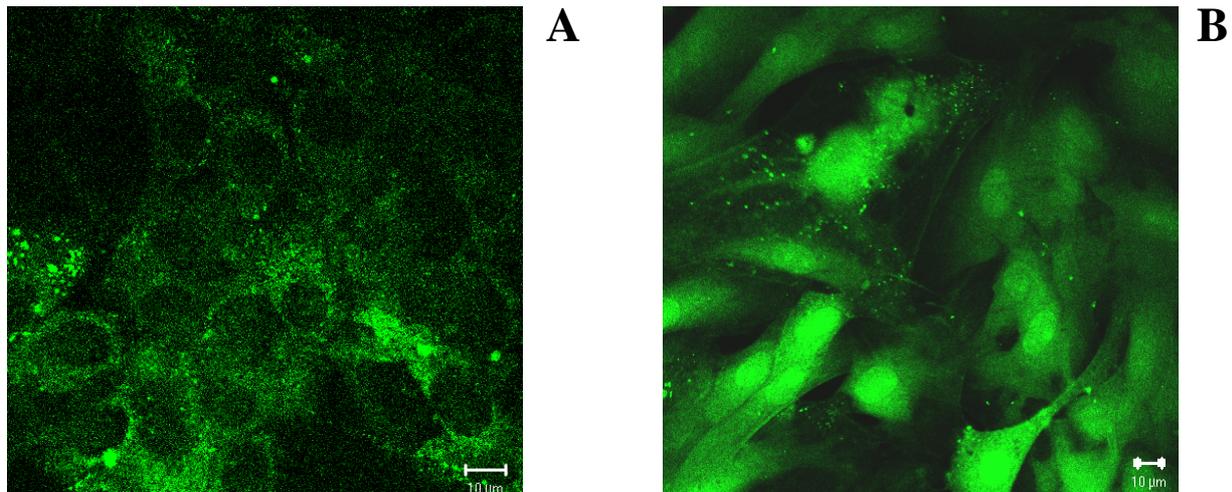
Zusätzlich war eine vermehrte grüne Fluoreszenz vorhanden. Das deutet daraufhin, dass es durch die Inhibition der mitochondrialen Elektronentransportkette zu einer verstärkten cytosolischen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt.

Als eine weitere potente Quelle der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies könnte die NADPH-Oxidase, ein Zielprotein der PKC, beteiligt sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden im Folgenden RASMC mit dem Inhibitor der NADPH-Oxidase Apocynin behandelt. Die Ergebnisse gibt Abb. 4.15D wider. Als Kontrolle wurde 96 Stunden mit 30 mM Glucose inkubiert (Abb. 4.15C). Unter Einfluss von Apocynin und TFA konnte die glucoseinduzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies supprimiert werden. Dies zeigt sich daran, dass nur noch die rote Mitochondrienfärbung sichtbar ist.

#### 4.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von NO<sup>•</sup> auf ecSOD in RASMC

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass NO<sup>•</sup> möglicherweise ein wichtiger Regulator der ecSOD ist<sup>92</sup>. Dabei wurde eine Aktivierung der eNOS ursächlich für eine verstärkte Expression und erhöhte Aktivität der ecSOD diskutiert. Über eine Aktivierung der eNOS kommt es zu einer vermehrte Synthese von NO<sup>•</sup>, was daraufhin die antioxidative Wirkung der ecSOD erhöhen könnte und somit unter Umständen die Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> verbessert. Vor diesem Hintergrund sollten als nächstes zwei Fragen geklärt werden: zum einen sollte untersucht werden, ob die NO<sup>•</sup>-Bildung in RASMC ähnlich wie in Endothelzellen gezeigt werden kann und ob die NOS durch hohe Glucosekonzentrationen stimuliert werden kann. Zum anderen sollte geklärt werden, ob die nachgewiesene Erhöhung der ecSOD-Aktivität unter hohen Glucosekonzentrationen auf eine vermehrte NO<sup>•</sup>-Bildung zurückgeführt werden kann.

Um die Bildung von NO<sup>•</sup> in RASMC nachzuweisen wurden RASMC 96 Stunden mit 30 mM Glucose bzw. 5 mM Glucose (Kontrollbedingungen) inkubiert und anschließend mit DAF-DA zum Nachweis des NO<sup>•</sup> gefärbt. DAF-DA reagiert mit cytosolischem Stickstoffmonoxid zu einem fluoreszierenden Farbstoff.

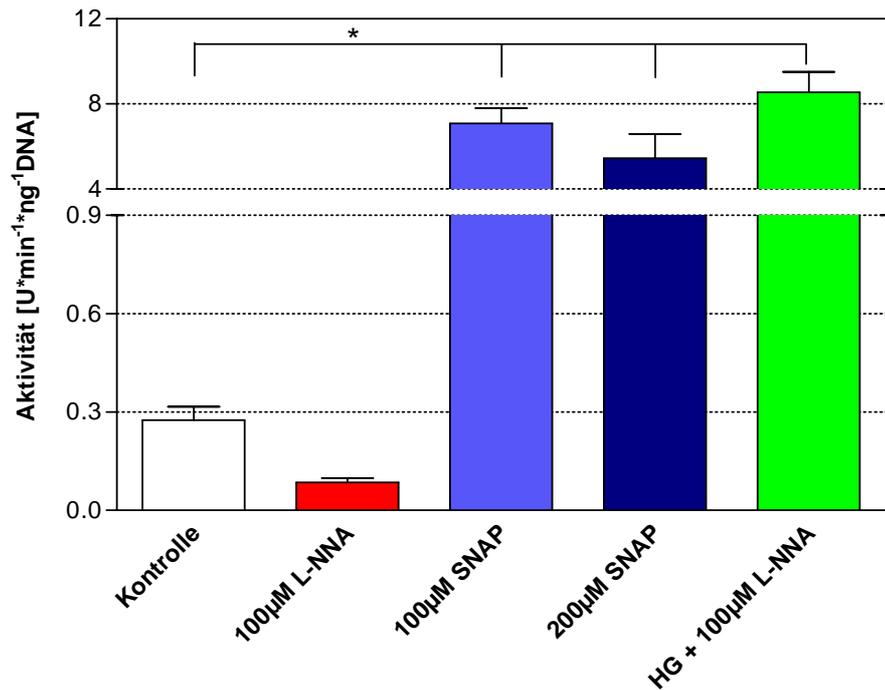


**Abb. 4.16** DAF-Färbung von RASMC

Färbung von RASMC mit dem Fluorescein-Derivat DAF zum Nachweis von Sauerstoffradikalen nach 96 Stunden Inkubation mit 5 mM Glucose (A) und 30 mM Glucose (B). Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil.

Die DAF-Färbung zeigte, dass die glatten Muskelzellen unter hoher Glucose (30 mM) mehr  $\text{NO}^\bullet$  produzierten als unter Kontrollbedingungen (5 mM Glucose) (s. Abb. 4.16).

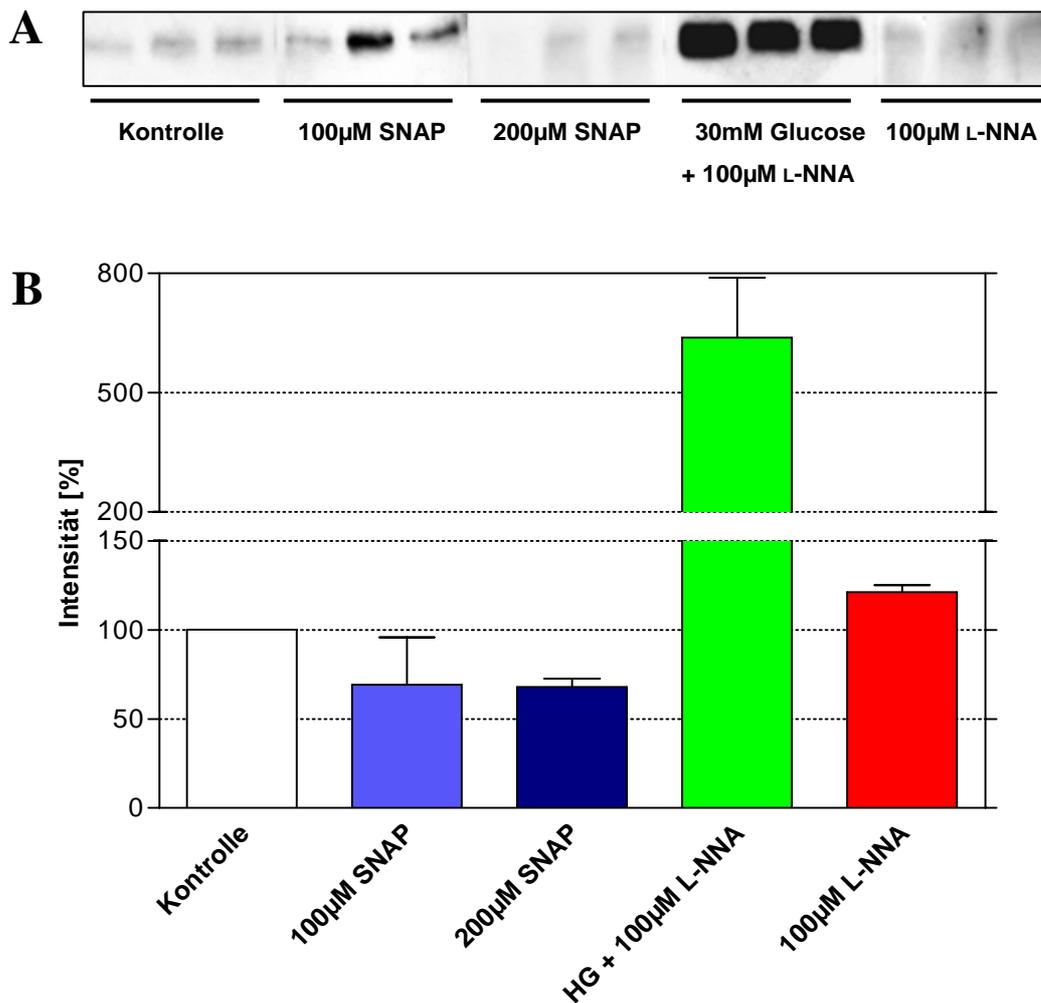
Um zu untersuchen, ob und in wie weit die ecSOD durch  $\text{NO}^\bullet$  reguliert wird, wurde die Konzentration an  $\text{NO}^\bullet$  im Medium durch Zusatz eines  $\text{NO}^\bullet$ -Donors (SNAP) bzw. durch Inhibition der NOS durch L-Nitroarginin (L-NNA) modifiziert. Die Glucosekonzentration in diesen Untersuchungen betrug 5 mM. Weiterhin wurde überprüft, ob die durch Glucose ausgelöste Hochregulation der ecSOD-Aktivität  $\text{NO}^\bullet$ -abhängig ist. Dazu wurden Zellen mit hoher Glucose (30 mM) bei gleichzeitiger Hemmung der NOS inkubiert.



**Abb. 4.17** *ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit SNAP und Nitroarginin*

*Bestimmung der ecSOD-Aktivität im Medium nach Behandlung der RASMC über 96 h mit 100 µM SNAP bzw. 200 µM SNAP, 100 µM Nitroarginin (L-NNA) sowie 30 mM Glucose (HG) + 100 µM Nitroarginin (L-NNA). Dargestellt sind Mittelwerte (± SEM) aus n=3 Einzelerperimenten. \* p<0,001; One-way ANOVA.*

Unter Einfluss von SNAP wurde die ecSOD-Aktivität um das 35fache (100 µM SNAP) bzw. 25fache (200 µM SNAP) erhöht (Abb. 4.17). Bei Inhibition der NOS durch L-Nitroarginin (L-NNA) kommt es tendenziell zu einer Reduktion der ecSOD-Aktivität um 50 %. Dieser Effekt ist jedoch nach Anwendung der One-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-Test nicht signifikant. Daraus folgt, dass die Hochregulation der ecSOD-Aktivität eindeutig durch NO<sup>•</sup> mediiert wird. Die Steigerung der ecSOD-Aktivität durch hohe Glucosekonzentrationen wird allerdings durch L-Nitroarginin nicht blockiert. Trotz Inhibition der NOS steigt die Aktivität der ecSOD von  $0,131 \pm 0,013$  U / min / ng DNA auf  $8,583 \pm 0,968$  U / min / ng DNA an (s. Abb. 4.17). Der Glucose-Effekt ist durch L-Nitroarginin nicht hemmbar.



**Abb. 4.18** Expression der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit SNAP und Nitroarginin

Bestimmung der ecSOD-Expression im Medium nach 96 h Inkubation mit 100 µM SNAP bzw. 200 µM SNAP, 100 µM Nitroarginin (L-NNA) und 30 mM Glucose (HG) + 100 µM Nitroarginin (L-NNA). Die Proteinexpressionen wurden auf Kontrollbedingungen normiert. Repräsentativer Western Blot (A) mit densitometrischer Auswertung in der Darstellung der Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=3$  Einzelerperimenten (B).

Im Gegensatz zur Aktivität wird die Expression der ecSOD nicht durch  $\text{NO}^\bullet$  beeinflusst. Weder eine Erhöhung der  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration im Medium durch Zusatz eines  $\text{NO}^\bullet$ -Donors noch die Hemmung der NOS durch L-Nitroarginin beeinflussen die Expression signifikant. Nach 96 h Inkubation mit 100 µM bzw. 200 µM SNAP und 100 µM L-Nitroarginin unterschied sich die Proteinmenge der ecSOD nicht zur Menge unter Kontrollbedingungen (s. Abb. 4.18).

Während  $\text{NO}^\bullet$  im wesentlichen die Aktivität der ecSOD zu beeinflussen scheint, wird bei Inkubation der RASMC mit 30 mM Glucose sowohl eine erhöhte Enzymaktivität als auch eine vermehrte Proteinexpression beobachtet, die durch L-Nitroarginin nicht hemmbar ist. Diese Befunde deuten darauf hin, dass unterschiedliche Mechanismen für die Wirkung von  $\text{NO}^\bullet$  bzw. hoher Glucose auf die ecSOD verantwortlich sind.

### 4.3 STZ-Ratten – ein diabetisches Tiermodell

Zwar ist Diabetes mellitus durch Hyperglycämie gekennzeichnet, jedoch handelt es sich hierbei um eine multifaktorielle Erkrankung, bei der verschiedene Stoffwechselwege beeinflusst werden. In den vorangegangenen *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass einzelnen Komponenten, die für die Manifestation des Diabetes von Bedeutung sind, die Aktivität und Expression der ecSOD beeinflussen. Da das Ausmaß des oxidativen Stress nicht nur von der Generation von Sauerstoffradikalen abhängt, sondern auch wesentlich durch die antioxidative Kapazität der betroffenen Organe bestimmt wird, sollt *in vivo* geklärt werden, wie sich der Diabetes auf die Aktivität und Expression der ecSOD auswirkt, und ob diese Veränderungen mit den *in vitro* beobachteten Veränderungen korrelieren.

Bei der Datenerhebung waren insbesondere Untersuchungen an Nieren, Herzen, Aorten und Plasma wichtig, da untersucht werden sollte, welche Bedeutung das physiologische antioxidative Enzymsystem der ecSOD für die Entwicklung diabetischer Vaskulopathien in relevanten Organen besitzt.

Dabei war die Niere von besonderer Bedeutung, da in diesem Organ bereits nachgewiesen werden konnte, dass oxidativer Stress zu einer Schädigung der Glomeruli führt. Durch diese glomerulären Läsionen wird die renale Filtration beeinträchtigt, was eine Proteinurie zur Folge hat. Diese wird als Ursache der tubulointerstitiellen Schädigung diskutiert, so dass die Progression der Nephropathie beschleunigt wird.

Herzen sind von besonderem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass Diabetes mellitus als ein unabhängiger Faktor für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko angesehen werden kann<sup>93;94</sup>. Es kommt zu einer erhöhten Mortalität der diabetischen Patienten im Vergleich zu Personen ohne Risikofaktoren.

Da die Strombahnen von Niere und Herzen wesentlich durch ihren großen mikrovaskulären Anteil bestimmt werden und zudem bekannt ist, dass oxidativer Stress auch an der Entwicklung diabetischer Makroangiopathien beteiligt ist<sup>95</sup>, sollten die Untersuchungen der ecSOD nicht nur an Nieren und Herzen sondern auch an Aorten als Beispiel einer makrovaskulären Strombahn untersucht werden.

Als Diabetes-Modell wurde die Streptozotozin-diabetischen Ratte gewählt. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes und in der Vergangenheit gut beschriebenes Tiermodell zur experimentellen Induktion eines dem humanen Typ I vergleichbaren Diabetes<sup>96-99</sup>.

Streptozotozin (STZ) ist ein Zuckerderivat (*N*-[Methylnitrosocarbamoyl]- $\alpha$ -D-Glucosamin; Struktur s. Abb. 4.19), das von den Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas aufgenommen wird<sup>83;96</sup>. In den Zellen kommt es zur Methylierung der DNA und in Folge dessen zum Zelltod<sup>100</sup>.

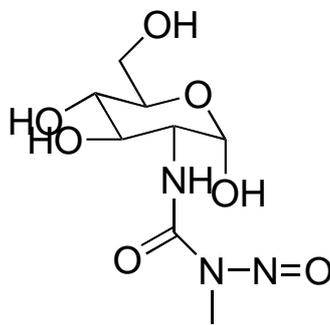
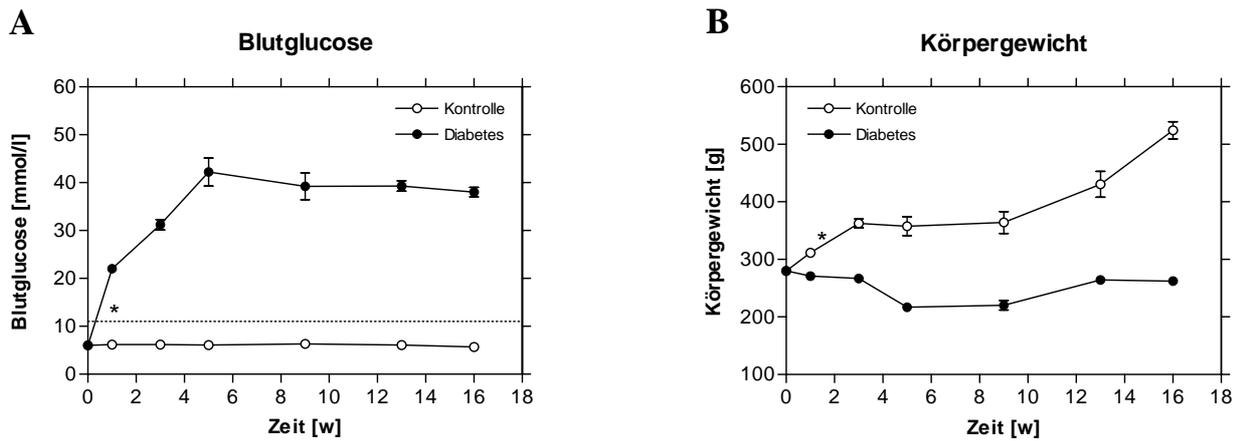


Abb. 4.19 Strukturformel von Streptozotozin

In Abb. 4.20 sind die Entwicklung der Blutglucosespiegel und die Veränderungen des Körpergewichts über eine Diabetesdauer von 16 Wochen dargestellt. Der Diabetes mellitus manifestierte sich bereits eine Woche nach i.p.-Injektion von Streptozotocin, was an den erhöhten Blutglucosespiegeln von über 11 mmol/l erkennbar ist. Nach drei Wochen zeigte sich neben der hyperglycämischen Stoffwechsellage zusätzlich eine deutlich verringerte Gewichtszunahme.



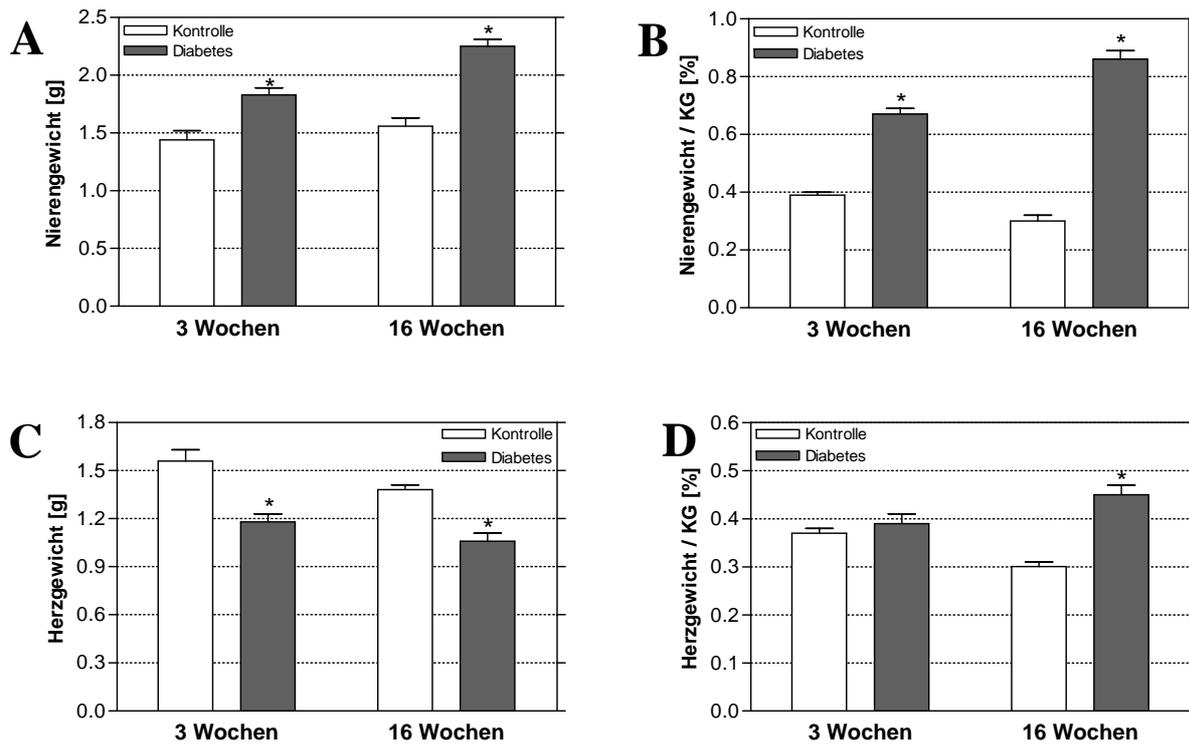
**Abb. 4.20 Blutglucose und Körpergewicht bei männlichen Wistar-Ratten**

Einfluss von STZ-Diabetes auf die Entwicklung von Blutglucose und Körpergewicht bei männlichen Wistar-Ratten während einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Einschlusskriterium zur Verifizierung der diabetischen Stoffwechsellage war ein postprandialer Blutglucosespiegel von  $> 11$  mmol/l (gepunktete Linie). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der Blutglucose(A) und des Körpergewichts (B) von Ratten nach STZ-Injektion ( $\bullet$ ,  $n=13$ ) und unbehandelten Tieren ( $\circ$ ;  $n=12$ ), \*  $p<0,05$ , t-Test.

Nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen zeigten sich neben der Hyperglycämie auch weitere für eine diabetische Stoffwechsellage typische pathophysiologische Veränderungen wie Polyurie, Glucosurie und Polydipsie. Mehr als drei viertel der diabetischen Tiere (80 %) wiesen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen außerdem Katarakte und Nierenödeme auf.

Sowohl die absoluten als auch die relativen Feuchtgewichte (Organgewicht bezogen auf das Körpergewicht) der Nieren waren bereits nach 3 Wochen Diabetes in der Gruppe der diabetischen Tiere gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöht. Dieser Effekt trat nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen noch deutlicher hervor (s. Abb. 4.21A und B).

Im Gegensatz zur Niere war das absolute Feuchtgewicht der Herzen von diabetischen Tieren im Vergleich zu den Organen aus Kontrolltieren sowohl nach 3 als auch nach 16 Wochen signifikant erniedrigt. Aufgrund der starken Gewichtsabnahme stieg das relative Feuchtgewicht der Herzen allerdings erst nach 16 Wochen an (vgl. Abb. 4.21C und D).

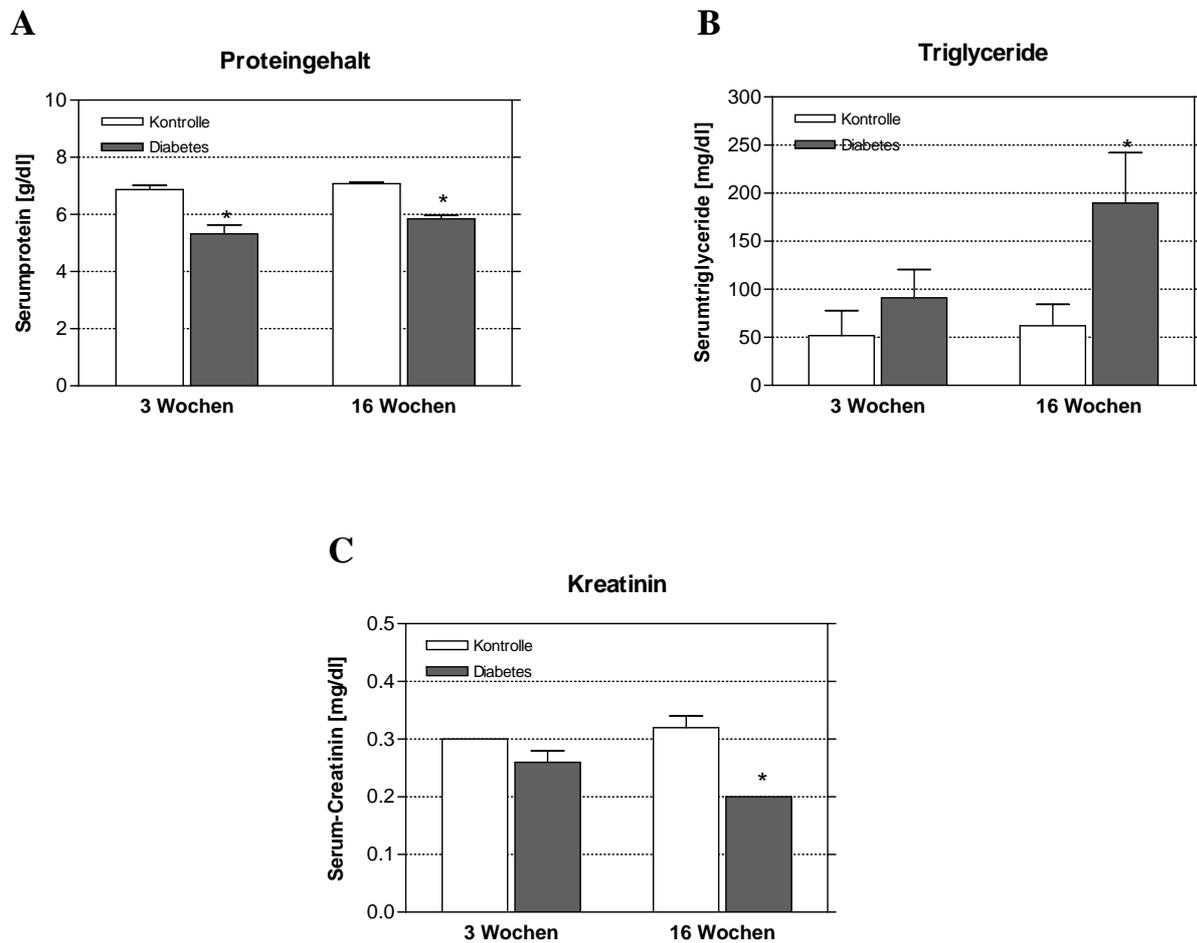


**Abb. 4.21 Organgewichte bei Wistar-Ratten**

Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten (A) und relativen (B) Nierengewichte sowie der absoluten (C) und relativen (D) Herzgewichte von Wistar-Ratten,  $n=5-7$ . Es wurden jeweils STZ-behandelte Tiere mit entsprechend alten Kontrolltieren nach einer Diabetesdauer von 3 und 16 Wochen verglichen. \*  $p < 0,05$ , t-Test für Kontrolle vs. Diabetes.

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage wurde das Serum von diabetischen Ratten und entsprechenden Kontrolltieren untersucht. Dabei war zunächst eine Erniedrigung des Serumproteingehalts bei diabetischen Tieren erkennbar. Diese Erniedrigung zeigte sich sowohl nach 3 Wochen als auch nach 16 Wochen Diabetes (s. Abb. 4.22A). Gleichzeitig kam es zu einer Erhöhung der Serumtriglyceride (s. Abb. 4.22B). Nach 16 Wochen Diabetes waren die Triglyceride stärker erhöht als nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen. Aufgrund der Streuung der Einzelwerte wurde jedoch erst nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen das Signifikanzniveau erreicht. Bei den Kreatininwerten zeigte sich 3 Wochen nach Diabetes-Induktion im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollsera noch kein Unterschied. Nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen waren die Creatininwerte bei diabetischen Tieren signifikant erniedrigt (s. Abb. 4.22C).

Zusammen mit dem Verlust an Körpergewicht deuten die erniedrigten Kreatininwerte auf einen Abbau von Muskeln hin.



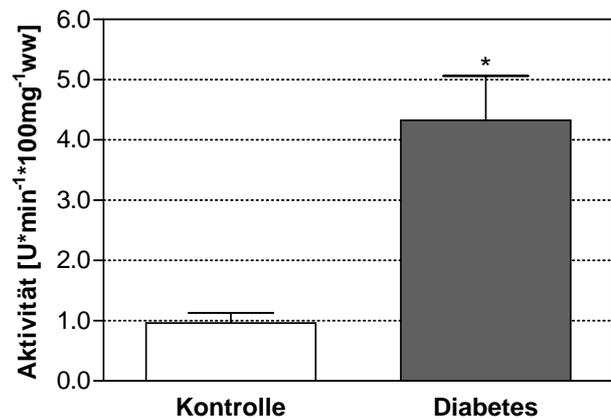
**Abb. 4.22** Ausgewählte Serumparameter bei Wistar-Ratten

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Serumparameter Proteingehalt (A), Triglyceridkonzentration (B) und Kreatinin (C) von männlichen Wistar-Ratten 3 und 16 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=7$ ) und Kontrolltieren entsprechenden Alters ( $n=5$ ). \*  $p < 0,05$ ,  $t$ -Test für Kontrolle vs. Diabetes.

## 4.4 Untersuchungen zum oxidativen Stress in ausgewählten Organen STZ-diabetischer Ratten

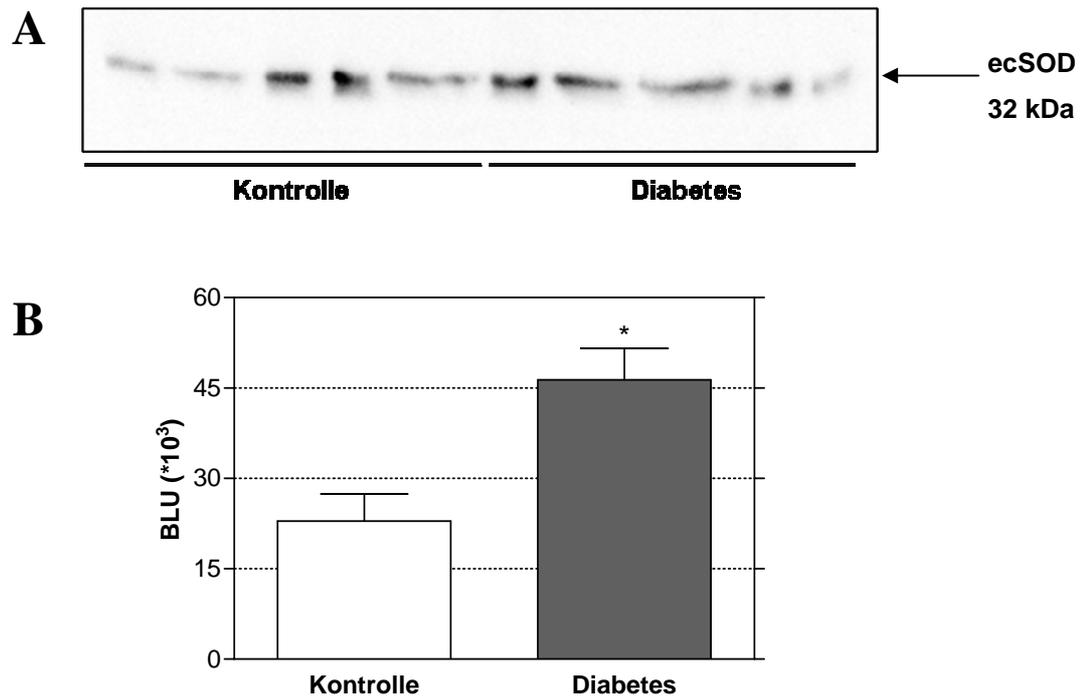
### 4.4.1 ecSOD in Nieren von STZ-diabetischen Ratten

3 Wochen nach STZ-Injektion wiesen Nieren diabetischer Ratten eine um das 4,5fach erhöhte ecSOD-Aktivität im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren auf (s. Abb. 4.23).



**Abb. 4.23** Aktivität der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes

Einfluss des Diabetes auf die ecSOD-Aktivität in Nieren männlicher Wistar-Ratten 3 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=5$ ) und Kontrolltieren entsprechenden Alters ( $n=5$ ). Darstellung als Mittelwerte ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$ ,  $t$ -Test.

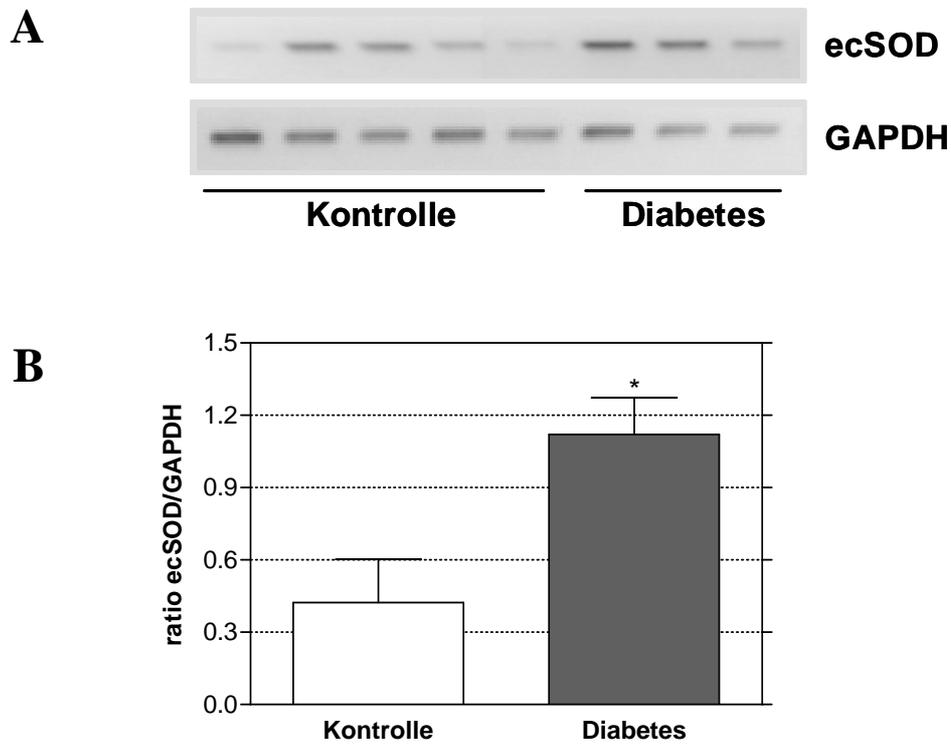


**Abb. 4.24** Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes

**A.** Repräsentativer Western Blot nach Auftragen der ConA-affinen Fraktionen aus Nierenhomogenat männlicher Wistar-Ratten 3 Wochen nach STZ-Injektion und dazugehöriger Kontrolltiere. **B.** Densitometrische Auswertung des Western Blots. Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=4-5$  Einzelerperimenten. \*  $p<0,05$ ; t-Test.

Die erhöhte Aktivität in Nieren diabetischer Ratten korreliert mit einer erhöhten Expression des ecSOD-Proteins in den Nieren dieser Tiere. Nach densitometrischer Auswertung ergab sich in den Fraktionen der diabetischen Tiere eine Erhöhung der ecSOD-Expression um ca. 100 % (s. Abb. 4.24).

In Abb. 4.25 ist die mRNA-Expression der ecSOD nach RT-PCR dargestellt. Auch die ecSOD-mRNA war in Nieren von diabetischen Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich erhöht.

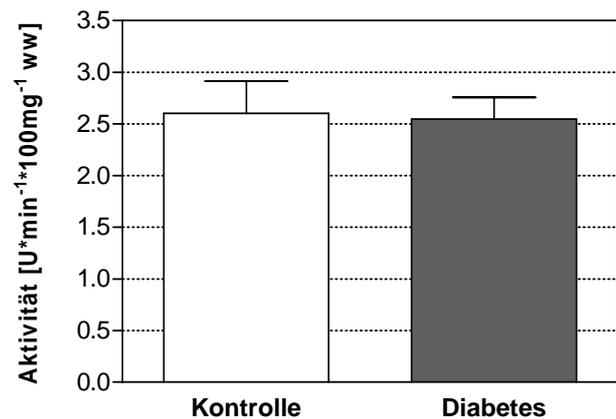


**Abb. 4.25 mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes**

*Einfluss von Diabetes auf die mRNA-Expression der ecSOD in Nierengeweben von Kontrolltieren und diabetischen Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen. A: Ethidiumbromidgel 2 %. B: Densitometrische Auswertung des Ethidiumbromidgels als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) mit  $n=5$  für Kontrolle und  $n=3$  für Nieren diabetischer Tiere. \*  $p<0,05$ ; t-Test.*

Somit sind in der Niere diabetischer Ratten die Aktivität, Protein- und mRNA-Expression der ecSOD nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen erhöht, was den Schluss einer erhöhten Transkriptionsrate nahe legt.

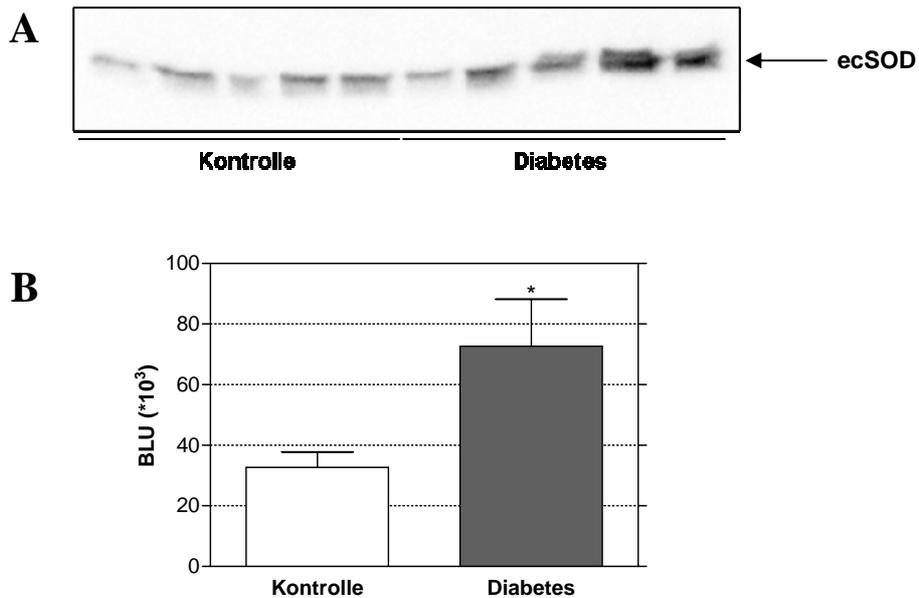
16 Wochen nach STZ-Injektion, einem Zeitpunkt, zu dem neben einer Proteinurie auch morphologische Veränderungen im Bereich der Glomeruli und Tubuli nachweisbar sind<sup>101;102</sup>, ergab sich allerdings ein partiell anderes Bild. Die Aktivität war vergleichbar mit der Aktivität in Kontrolltieren (s. Abb. 4.26), während die Expression der ecSOD wie bereits nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen erhöht war (s. Abb. 4.27).



**Abb. 4.26** Aktivität der ecSOD in Rattennieren nach 16 Wochen Diabetes

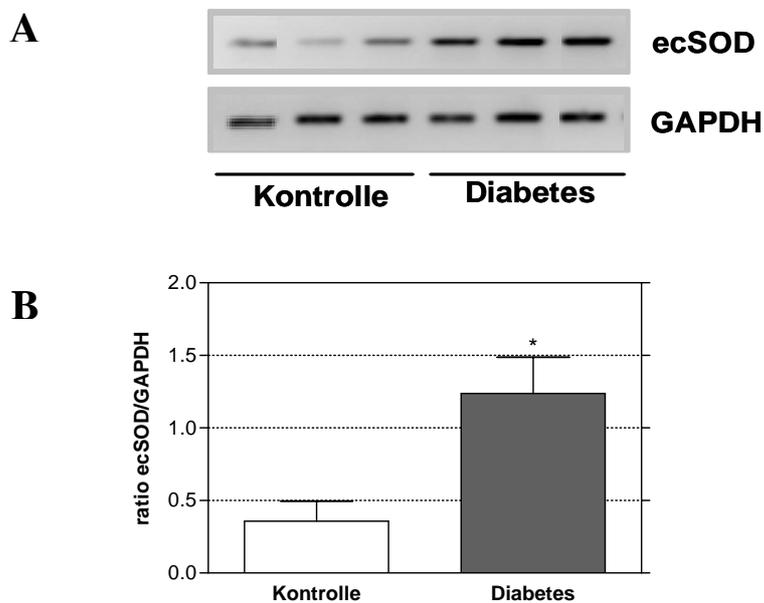
Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der ecSOD-Aktivität in männlichen Wistar-Ratten 16 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=7$ ) und Kontrolltieren entsprechenden Alters ( $n=8$ ). \*  $p<0,05$ ,  $t$ -Test.

Auch die Expression der ecSOD-mRNA wies eine Erhöhung des Verhältnisses ecSOD zu GAPDH von  $0,358 \pm 0,139$  in Kontrolltiere auf  $1,238 \pm 0,249$  in diabetischen Tieren auf (s. Abb. 4.28). Protein- und m-RNA-Expression blieben somit unabhängig von der Diabetesdauer erhöht, allerdings nahm die Aktivität der ecSOD ab, was den Schluss nahe legt, dass die diabetesbedingte *Up-Regulation* erhalten bleibt, jedoch die Aktivität aufgrund sekundärer Ereignisse vermindert wird.



**Abb. 4.27 Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 16 Wochen Diabetes**

**A.** Repräsentativer Western Blot der ecSOD-Expression nach Auftrag der ConA-affinen Fraktion aus Nierenhomogenat nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen und aus Nierenhomogenat entsprechender Kontrollratten. **B.** Densitometrische Auswertung der Western Blots von n=5 Einzelexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte (± SEM). \* p < 0,05; t-Test.



**Abb. 4.28 mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren nach 16 Diabetes**

Einfluss von Diabetes auf die mRNA-Expression der ecSOD in Nierengewebe von Kontrolltieren und diabetischen Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Ethidiumbromidgel 2 %. **B.** Densitometrische Auswertung des Ethidiumbromidgels als Mittelwerte (± SEM). \* p < 0,05; t-Test.

#### 4.4.2 ecSOD in Herzen von STZ-diabetischen Ratten

In Herzen war die Aktivität der ecSOD nach einer Diabetesdauer sowohl von 3 Wochen als auch nach 16 Wochen im Vergleich zu Kontrolltieren um 50 % verringert (s. Abb. 4.29).

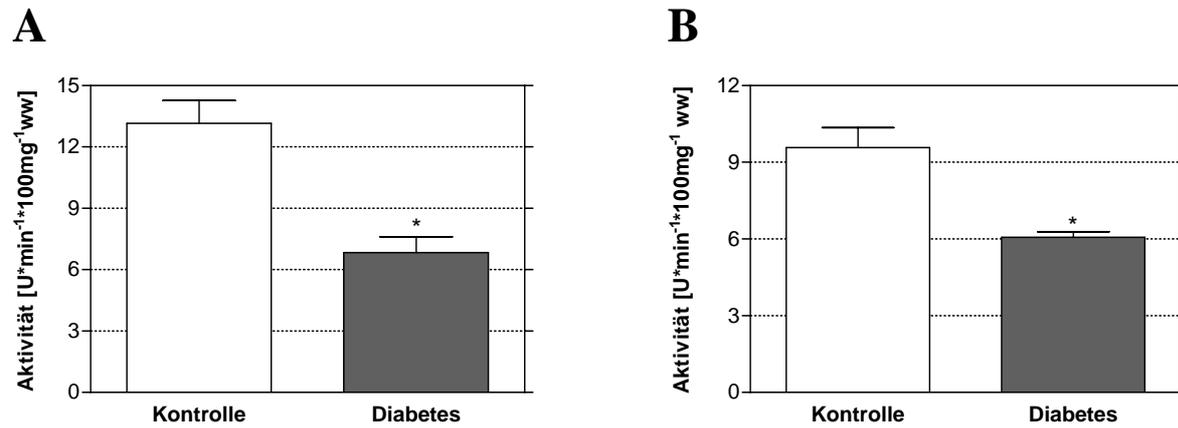
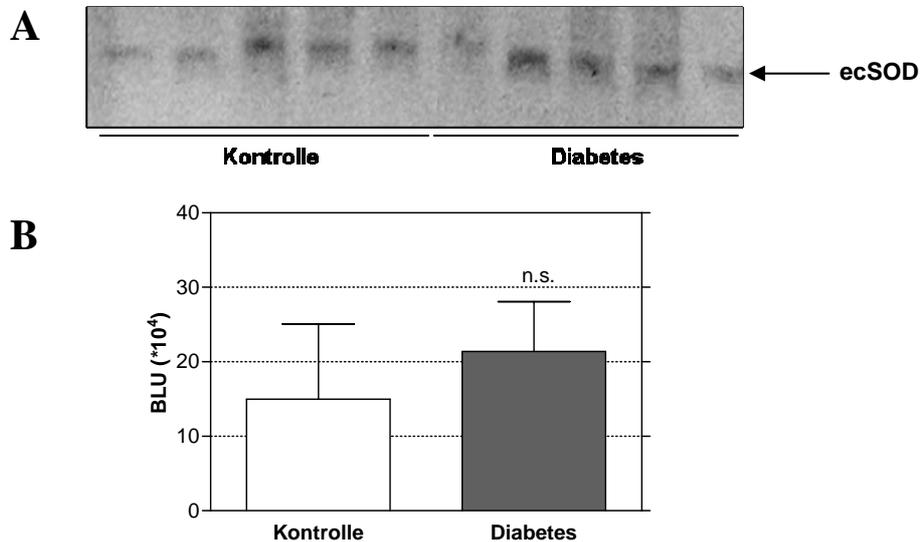


Abb. 4.29 Aktivität der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetes

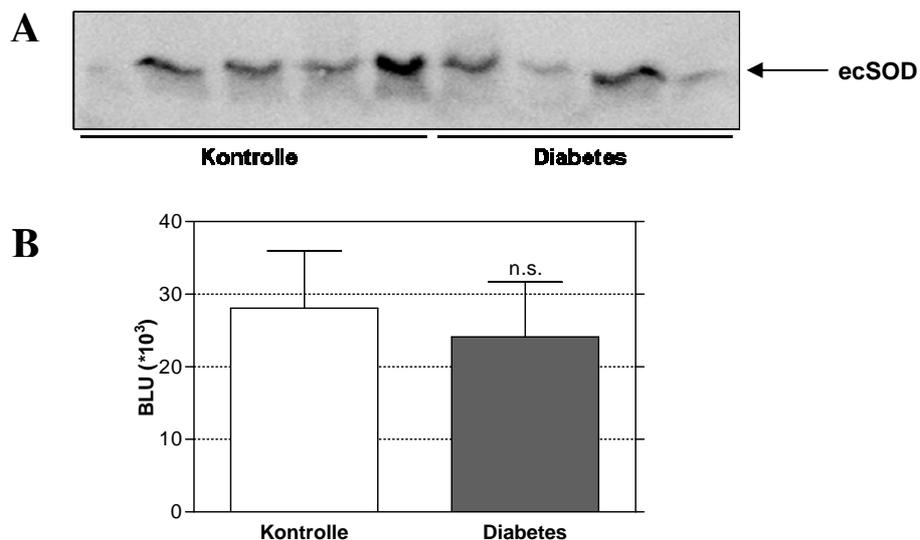
Einfluss des Diabetes auf die ecSOD-Aktivität in Herzen männlicher Wistar-Ratten 3 Wochen (A) und 16 Wochen (B) nach STZ-Injektion ( $n=3-4$ ) und Kontrolltieren entsprechenden Alters ( $n=4-5$ ); (jeweils Mittelwerte ( $\pm$  SEM)). \*  $p < 0,05$ ,  $t$ -Test.

Im Gegensatz zur Aktivität konnte im Herzen unabhängig von der Diabetesdauer weder ein Unterschied in der Proteinexpression (Abb. 4.30) noch unterschiedliche mRNA-Level des Enzyms (Abb. 4.32) nachgewiesen werden.



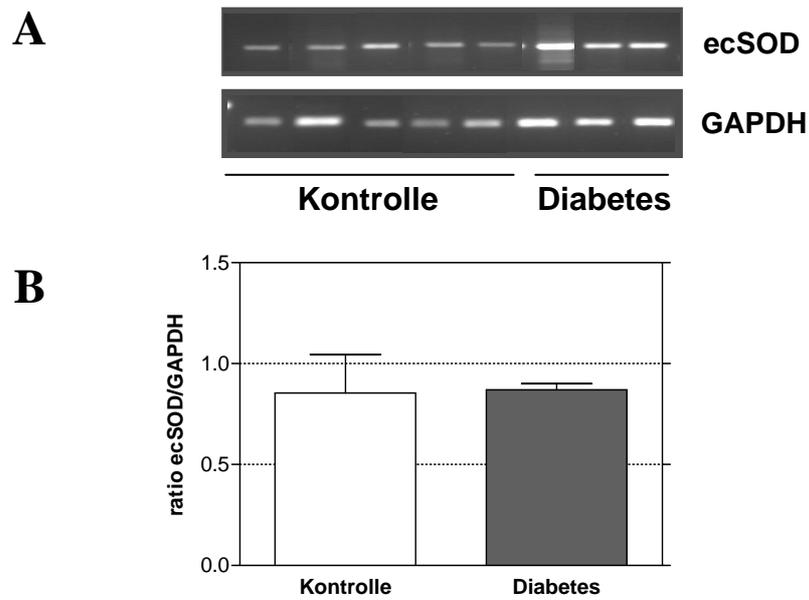
**Abb. 4.30** *Proteinexpression der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen Diabetes*

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der ConA-affinen Fraktion aus Homogenaten des Herz von Wistar-Ratten nach 3 Wochen Diabetesdauer und dazugehöriger nicht diabetischer Wistar-Ratten (A) und die densitometrische Auswertung der Western Blots (B) in Form von Mittelwerten ( $\pm$  SEM) aus  $n=5$  Einzelerperimenten.



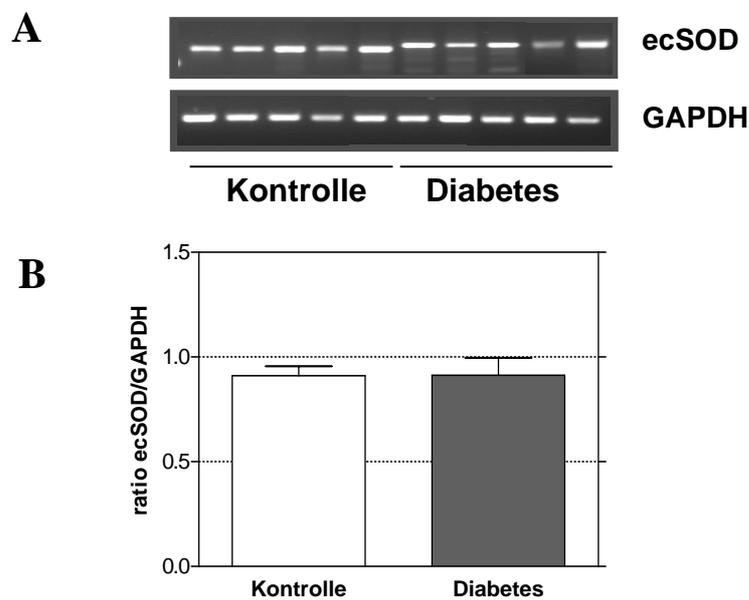
**Abb. 4.31** *Proteinexpression der ecSOD in Rattenherzen nach 16 Wochen Diabetes*

Analyse der ConA-affinen Fraktionen aus Homogenaten des Herzens von Ratten 16 Wochen nach STZ-Injektion und entsprechender Kontrolltiere (A). Densitometrische Auswertung der Signale im Western Blot; dargestellt als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=4$  Einzelerperimenten (B).



**Abb. 4.32** mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen Diabetes

Einfluss von Diabetes auf die mRNA-Expression der ecSOD in Herzgewebe von Kontrolltieren ( $n = 5$ ) und diabetischen ( $n = 3$ ) Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen. **A.** Ethidiumbromidgel 2 %. **B.** Densitometrische Auswertung des Ethidiumbromidgels als Mittelwert ( $\pm$  SEM).

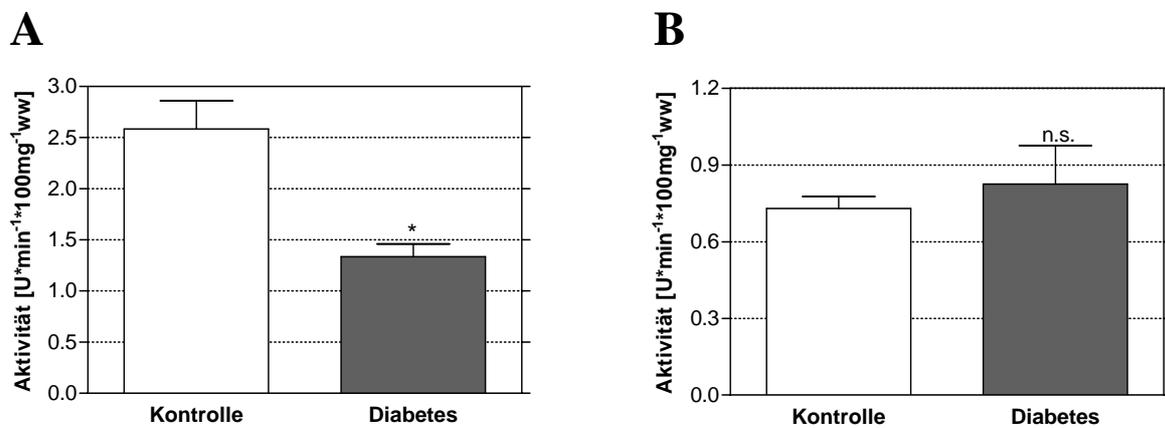


**Abb. 4.33** mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen nach 16 Wochen Diabetes

Gezeigt ist ein repräsentatives Ethidiumbromidgel (2 %) (**A**) mit dessen densitometrischer Auswertung (**B**; Mittelwert ( $\pm$  SEM)) der mRNA-Expression aus Herzen männlicher Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen ( $n=5$ ) und entsprechenden Kontrolltieren ( $n=5$ ).

### 4.4.3 ecSOD in Aorten von STZ-diabetischen Ratten

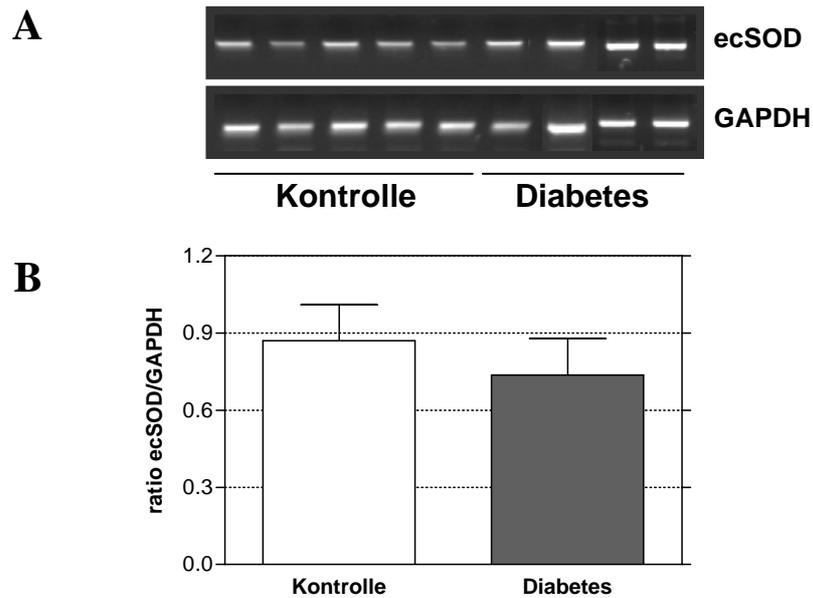
In Aorten diabetischer Ratten wurde zunächst eine Reduktion der ecSOD-Aktivität um 50 % beobachtet, wohingegen bei längerer Diabetesdauer dieser Unterschied aufgehoben wurde (s. Abb. 4.34), da in Aorten von Kontrolltieren die ecSOD-Aktivität rasch altersabhängig abnahm, so dass nach 16 Wochen kein Unterschied mehr zwischen den Aktivitäten diabetischer und nicht-diabetischer Ratten nachweisbar war.



**Abb. 4.34** Aktivität von ecSOD in Rattenaorten nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetes

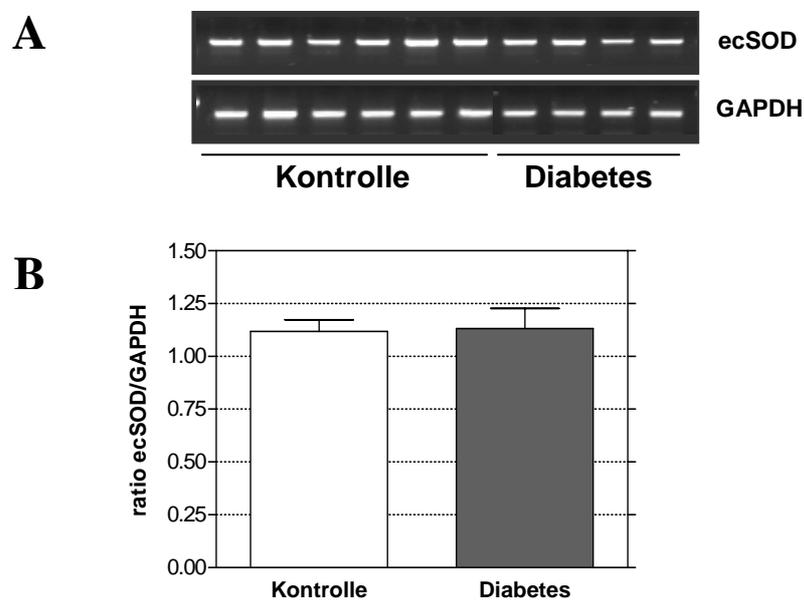
Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der ecSOD-Aktivität in Aorten aus männlichen Wistar-Ratten 3 Wochen (A) und 16 Wochen (B) nach STZ-Injektion ( $n=4-5$ ) und zugehöriger Kontrolltiere ( $n=5$ ). \*  $p < 0,01$ ;  $t$ -Test.

Auf mRNA-Ebene hatte der Diabetes weder nach einer Dauer von 3 Wochen noch nach einer Dauer von 16 Wochen Auswirkungen auf die Expression (s. Abb. 4.35 und Abb. 4.36).



**Abb. 4.35** mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorten nach 3 Wochen Diabetes

Einfluss des Diabetes auf die mRNA-Expression der ecSOD in männlichen Wistar-Ratten 3 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=4$ ) und zugehöriger Kontrolltiere ( $n=5$ ). Dargestellt ist das Ethidiumbromidgel (A) mit seiner densitometrischen Auswertung (B) in Form von Mittelwerten ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$ ;  $t$ -Test.



**Abb. 4.36** mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorten nach 16 Wochen Diabetes

Einfluss von Diabetes auf die mRNA-Expression in Aorten männlicher Wistar-Ratten 16 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=4$ ) und ihrer entsprechenden Kontrolltiere ( $n=6$ ). A. Ethidiumbromidgel. B. Densitometrische Auswertung des EtBr-Gels in der Darstellung als Mittelwerte ( $\pm$  SEM).

### 4.5 Einfluss der Inhibition der NO-Synthase auf die ecSOD

In Abschnitt 4.2.4 wurde gezeigt, dass NO<sup>•</sup> eine wichtige Rolle bei der Regulation der ecSOD in RASMC spielt und die Aktivität des Enzyms hochreguliert. Um zu untersuchen, ob NO<sup>•</sup> nicht nur unter *in vitro* Bedingungen der Zellkultur sondern auch *in vivo* an der Regulation der ecSOD beteiligt ist, wurde die NO-Synthase in Wistar-Ratten durch Gabe von L-NAME inhibiert.

Männliche Wistar-Ratten wurden randomisiert vier Gruppen zugewiesen. Die Charakterisierung der einzelnen Gruppen stellt Tab. 4.1 dar.

	1	2	3	4
L-NAME	-	+	-	+
STZ	-	-	+	+

Tab. 4.1 Charakterisierung der Tiergruppen im Fütterversuch

Auch in dieser Versuchsreihe wurden die ecSOD in Nieren, Herzen und Aorten untersucht. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse zusammenfassend in Form einer Tabelle dargestellt (Tab. 4.2).

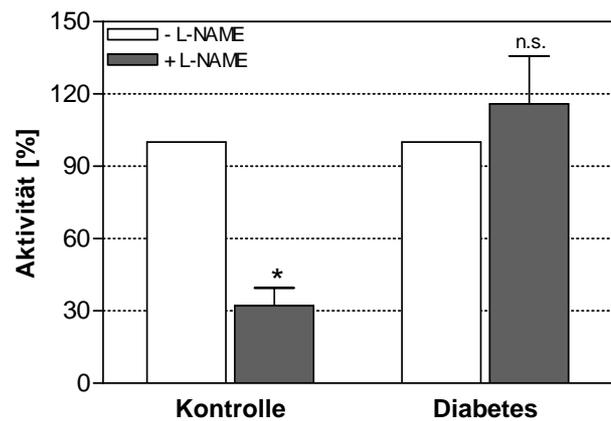
	Aktivität		Proteinexpression		mRNA-Expression	
	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes
Niere	↓	→	∅	∅	↓	↑
Herz	↓	∅	→	→	↑	↑
Aorta	↑	↑			↓	↑
Plasma	∅	∅	∅	∅		

Tab. 4.2 Zusammenfassung der Veränderungen der ecSOD unter Einfluss von L-NAME

Dabei zeigt ↑ eine Erhöhung, ↓ eine Erniedrigung und Ø keine Veränderung an, im Vergleich mit L-NAME-Fütterung vs. ohne L-NAME-Fütterung.

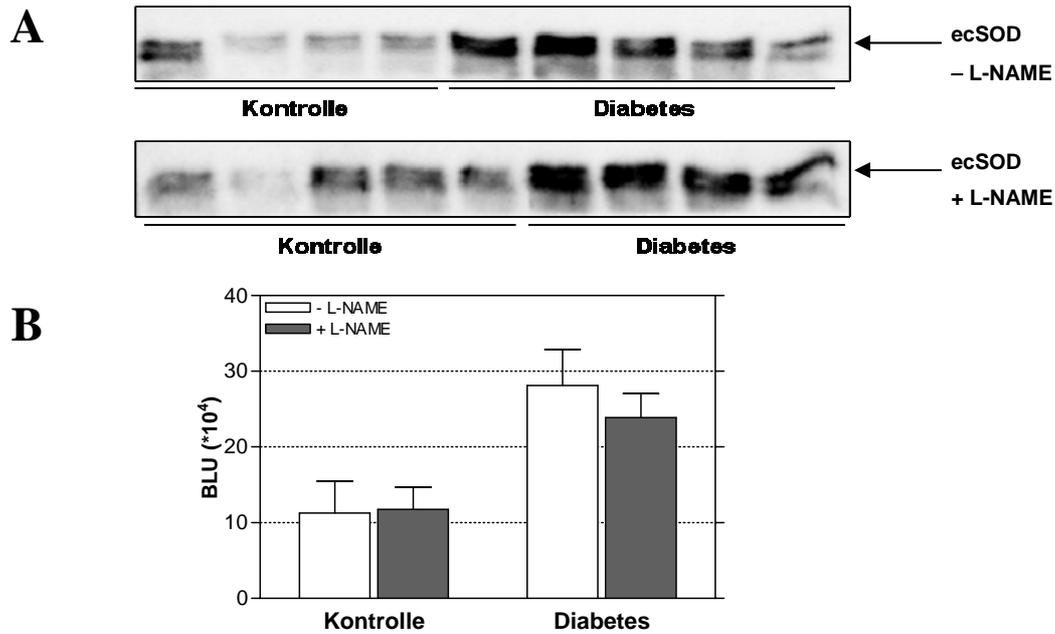
Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die ecSOD durch den NOS-Inhibitor L-NAME nicht einheitlich reguliert wurde, sondern es zu heterogenen Veränderungen der Merkmale in den einzelnen Organen kam.

In Nieren von Kontrolltieren war nach L-NAME-Fütterung sowohl die Aktivität (Abb. 4.37) als auch die mRNA-Expression (Abb. 4.39) der ecSOD um 30 % bzw. 60 % vermindert, während die Proteinexpression nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.38). Im Gegensatz dazu hatte L-NAME keinen Einfluss auf die Aktivität und Protein-Expression der ecSOD in diabetischen Tieren (vgl. Abb. 4.37 und Abb. 4.38), während die mRNA-Expression um 50 % erhöht war (s. Abb. 4.39).



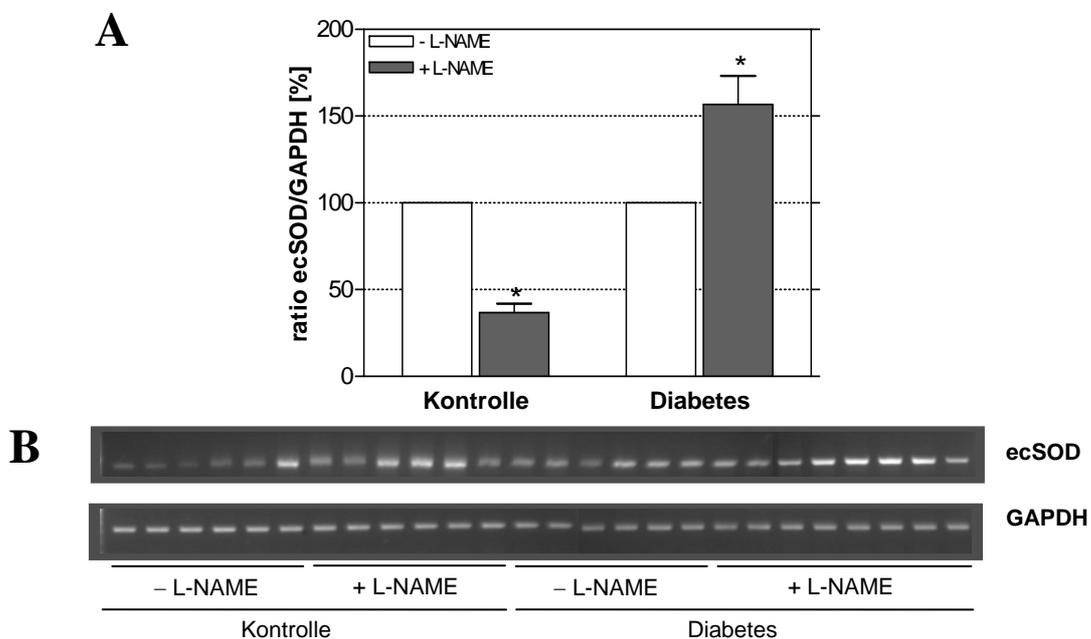
**Abb. 4.37** ecSOD-Aktivität in Rattennieren 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung

Aktivitätsmessung in Nieren männlicher Wistar-Ratten nach 3 Wochen L-NAME-Fütterung (jeweils  $n=5$ ) und ohne L-NAME-Fütterung (jeweils  $n=4$ ). Die ecSOD-Aktivität ist angegeben als Mittelwert ( $\pm$  SEM) und auf die jeweilige Gruppe ohne L-NAME-Fütterung bezogen. \*  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA.



**Abb. 4.38** Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen L-NAME-Fütterung

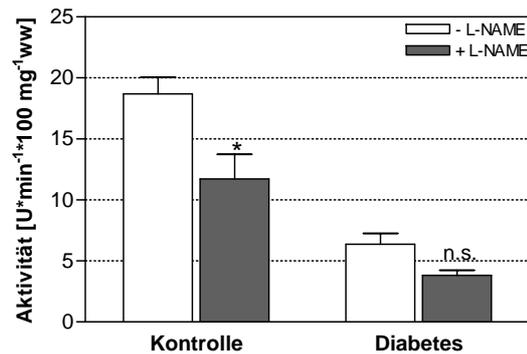
Darstellung eines Western Blots nach Auftrag der ConA-affinen Fraktion aus Nierenhomogenat von Ratten ohne L-NAME-Zusatz und mit L-NAME-Zusatz im Trinkwasser (A). Die densitometrische Auswertung gibt Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=4-5$  Einzelerperimenten an (B).



**Abb. 4.39** mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung

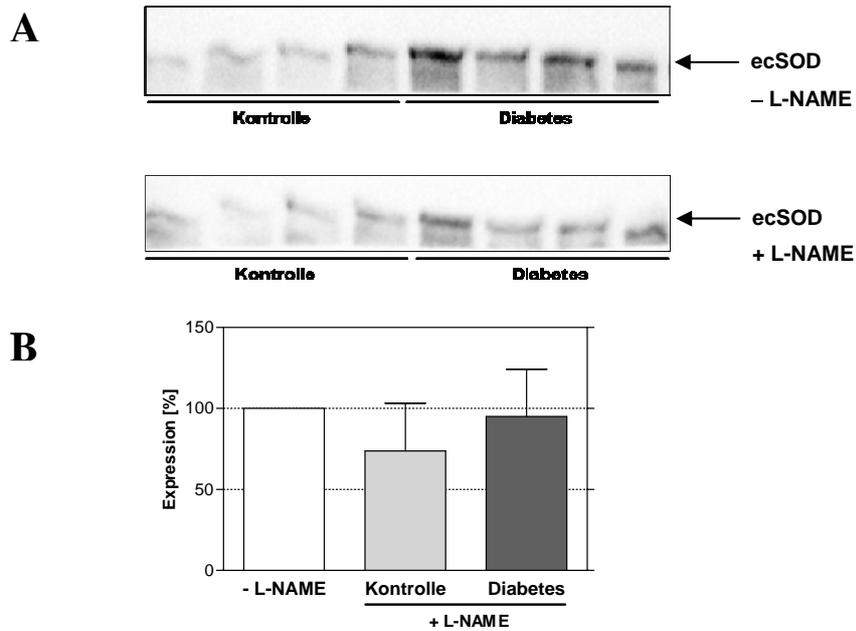
Dargestellt ist die mRNA-Expression der ecSOD im Verhältnis zur Expression von GAPDH (A) als Mittelwert ( $\pm$  SEM);  $n=8$  für Gruppe diabetischer Tiere + L-NAME-Fütterung;  $n=6$  für übrige Gruppen. Die Werte wurden jeweils auf die Gruppe ohne L-NAME-Fütterung normiert. B. Repräsentatives Ethidiumbromidgel. \*  $p<0,01$ ; One-way ANOVA.

In Herzen von Kontrolltieren verminderte sich die Aktivität der ecSOD um ca. 30 % (Abb. 4.40), während die Proteinexpression weder in Kontrolltieren noch in diabetischen Tieren durch die L-NAME-Gabe beeinflusst wurde (Abb. 4.41). Jedoch stieg die mRNA-Expression sowohl in Herzen von nicht-diabetischen Tieren als auch in Herzen von diabetischen Tieren signifikant an (Abb. 4.42).



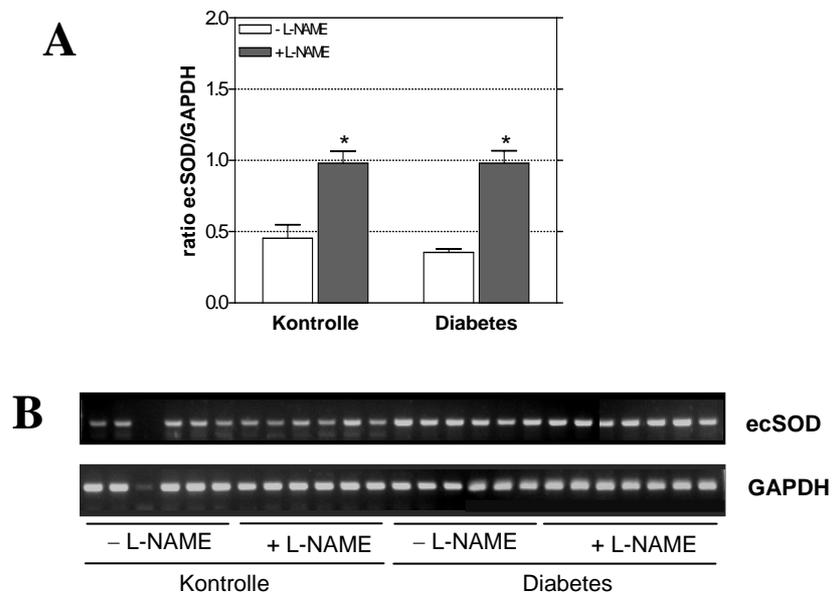
**Abb. 4.40** Aktivität der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung

Gezeigt ist die Entwicklung der ecSOD-Aktivität in diabetischen und nicht diabetischen Tieren nach 3-wöchiger Fütterung mit L-NAME und einer entsprechenden Gruppe ohne L-NAME-Fütterung. Die Darstellung erfolgte als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus jeweils  $n=3$  Einzelerperimenten. \*  $p<0,01$ ; One-way ANOVA.



**Abb. 4.41 Protein-Expression der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung**

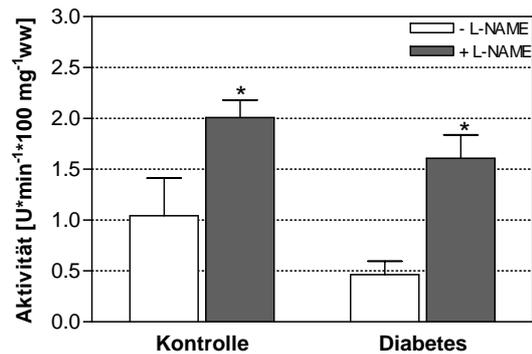
Darstellung eines repräsentativen Western Blots nach Auftrag der ConA-affinen Fraktion aus Herzhomogenaten von Ratten ohne L-NAME-Zusatz und mit L-NAME-Zusatz im Trinkwasser (A). Die densitometrische Auswertung gibt Mittelwerte ( $\pm$  SEM) bezogen auf die jeweilige Gruppe ohne L-NAME Fütterung aus  $n=4$  Einzelexperimenten an (B).



**Abb. 4.42 mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung**

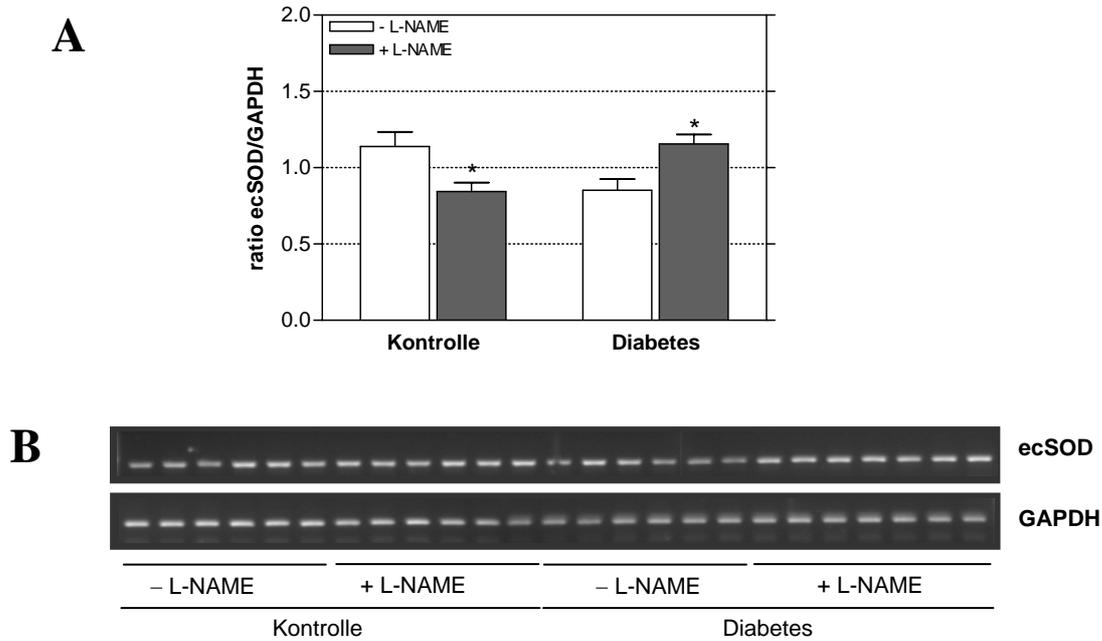
Dargestellt ist die Expression der mRNA von ecSOD im Verhältnis zur Expression von GAPDH (A) als Mittelwert ( $\pm$  SEM;  $n=7$  für diabetische Gruppe + L-NAME-Fütterung;  $n=6$  für übrige Gruppen). B. Repräsentatives Ethidiumbromidgel. \* $p<0,001$ ; One-way ANOVA.

Ein differentes Bild ergab sich bei der Analyse der ecSOD in Aorten nach L-NAME-Fütterung. In Kontrolltieren und diabetischen Tieren war die Aktivität der ecSOD deutlich erhöht. Die Expression der mRNA nahm in Kontrollen jedoch leicht ab, während unter einer diabetischen Stoffwechsellage eine geringe Hochregulation zu verzeichnen war (vgl. Abb. 4.43 und Abb. 4.44).



**Abb. 4.43** Aktivität der ecSOD in Rattenaorten 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung

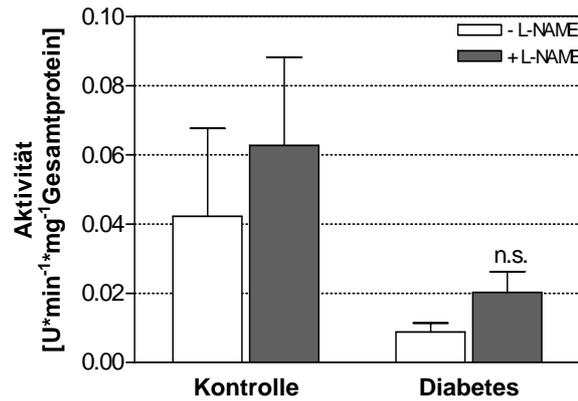
Bestimmung der ecSOD-Aktivität in Aorten aus männlichen Wistar-Ratten 3 Wochen nach Fütterung mit L-NAME und einer entsprechenden Altergruppe ohne L-NAME. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n=3$  (Kontrollen) bzw.  $n=4$  (Diabetes) Einzelexperimenten ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA.



**Abb. 4.44 mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorta 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung**

Dargestellt ist die mRNA-Expression der ecSOD im Verhältnis zur Expression von GAPDH (A) als Mittelwert ( $\pm$  SEM;  $n=8$  für diabetische Gruppe + L-NAME-Fütterung;  $n=6$  für übrige Gruppen). B. Repräsentatives Ethidiumbromidgel. \*  $p<0,05$ ; One-way ANOVA.

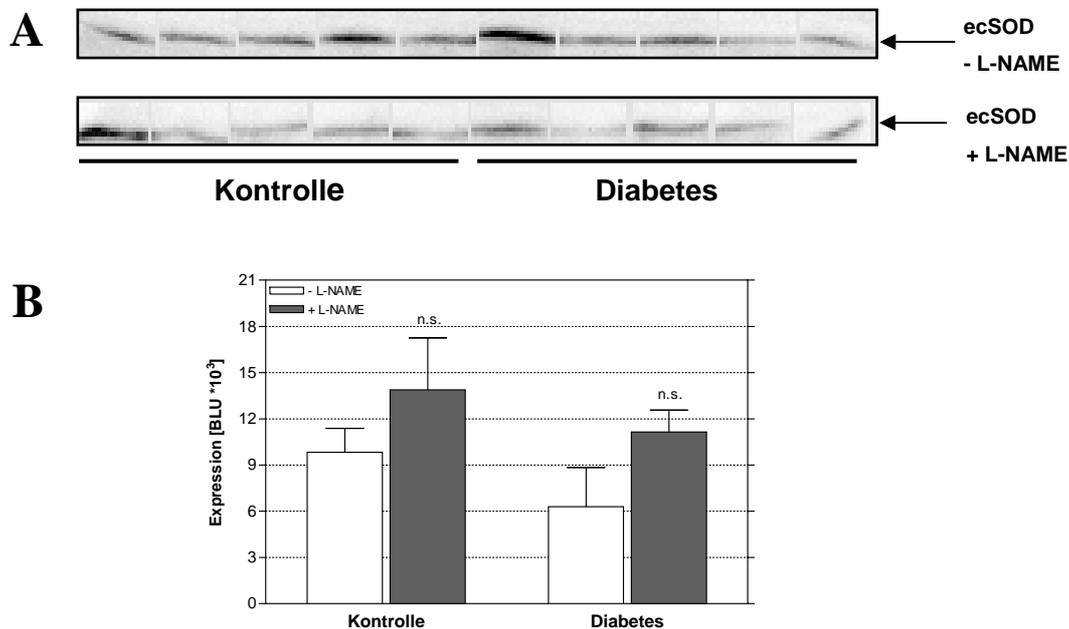
Die veränderten Aktivitäten der ecSOD in den Aorten der Ratten legte die Überlegung nahe, dass es unter Einfluss des *Status diabeticus* zu einer veränderten Aktivität des Enzyms im Plasma kommt. Dabei ist anzumerken, dass die ecSOD-Aktivität im Plasma grundsätzlich in einem sehr viel geringeren Ausmaß vorliegt als im Gewebe<sup>103</sup>. Um die Hypothese zu überprüfen, wurden sowohl die Aktivität als auch die Proteinmenge im Plasma dieser Tiere untersucht.



**Abb. 4.45** *ecSOD-Aktivität im Plasma von Ratten nach 3 Wochen L-NAME-Fütterung*

Bestimmung der ecSOD-Aktivität im Plasma aus männlichen Wistar-Ratten 3 Wochen nach Fütterung mit L-NAME und einer entsprechenden Altergruppe ohne L-NAME. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n=5$  (Kontrollen) bzw.  $n=6$  (Diabetes) unabhängigen Einzelerperimenten ( $\pm$  SEM).

Während die Aktivität der ecSOD im Plasma diabetischer Tiere verglichen mit Kontrolltieren deutlich vermindert war, beeinflusste die Inhibition der NOS durch L-NAME weder die Aktivität (Abb. 4.45) noch das Enzymprotein (Abb. 4.46).



**Abb. 4.46** *Protein-Expression der ecSOD im Plasma 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung*

Darstellung eines repräsentativen Western Blots nach Auftrag des Plasma aus Ratten ohne L-NAME-Zusatz und mit L-NAME-Zusatz im Trinkwasser (A). Die densitometrische Auswertung gibt Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus  $n=5$  Einzelerperimenten an (B).

### 4.6 Untersuchungen zum Einfluss des eNOS knock out auf die ecSOD

Durch die Behandlung mit L-NAME wird die NOS nicht subtypspezifisch inhibiert. Dies wird jedoch durch einen gentechnischen Eingriff möglich, in dem das interessierende Gen ausgeschaltet wird (knock out). In dieser Arbeit sollte an einem transgenen Mausstamm (eNOS knock out) untersucht werden, in wie fern sich Aktivität und mRNA-Expression der ecSOD verhalten, wenn spezifisch die endotheliale NOS ausgeschaltet und so deren NO<sup>•</sup>-Bildung unterbunden ist. Die Mäuse wurden randomisiert in Gruppen eingeteilt, die mit STZ behandelt wurden bzw. eine Vehikelinjektion erhielten.

V. Schmitz beschrieb in ihrer Dissertation detailliert die Genotypisierung und die Charakterisierung der Stoffwechsellage der Mäuse<sup>79</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Herzen und Nieren von Wildtyptieren und transgenen homozygoten eNOS k.o. Tieren zurückgegriffen.

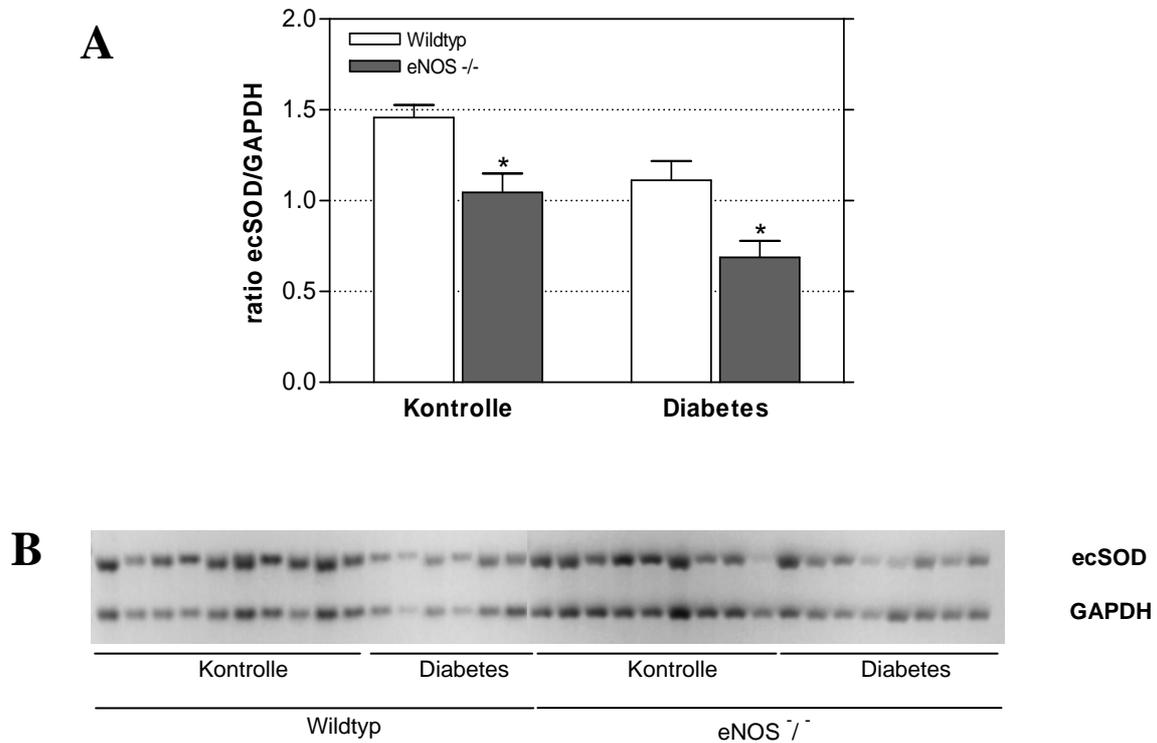
Auch in diesem Kapitel werden die Ergebnisse zum besseren Verständnis tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. 4.3).

	Aktivität		mRNA-Expression	
	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes
Niere	→	→	↓	↓
Herz	↓	↓	↓	∅

Tab. 4.3 Zusammenfassung der Veränderungen der ecSOD nach eNOS knock out

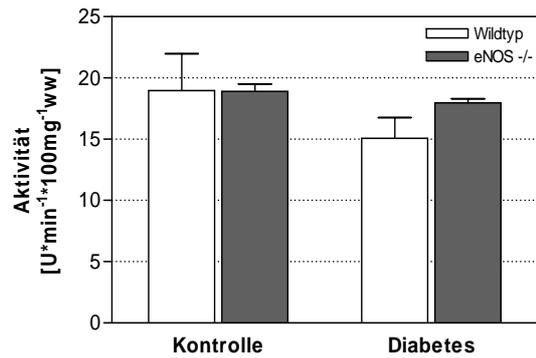
Dabei bedeutet ↑ eine Erhöhung, ↓ eine Erniedrigung und ∅ keine Veränderung der ecSOD im Vergleich von eNOS <sup>-/-</sup> vs. Wildtyp.

In Nieren von k.o.-Tieren war die mRNA-Expression der ecSOD unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes um 25 – 30 % im Vergleich zu Nieren aus Wildtyp-Tieren erniedrigt (s. Abb. 4.47), während sich die ecSOD-Aktivität nicht unterschied (s. Abb. 4.48).



**Abb. 4.47** mRNA-Expression der ecSOD in Nieren von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens

**A.** Graphische Darstellung der ecSOD mRNA-Expression in Nieren von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens, jeweils unter Kontrollbedingungen ( $n=10$ , WT;  $n=9$ , Mutante) und 16 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=6$ , WT;  $n=8$ , Mutante) als Mittelwerte ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA. **B.** Repräsentatives Ethidiumbromidgel.

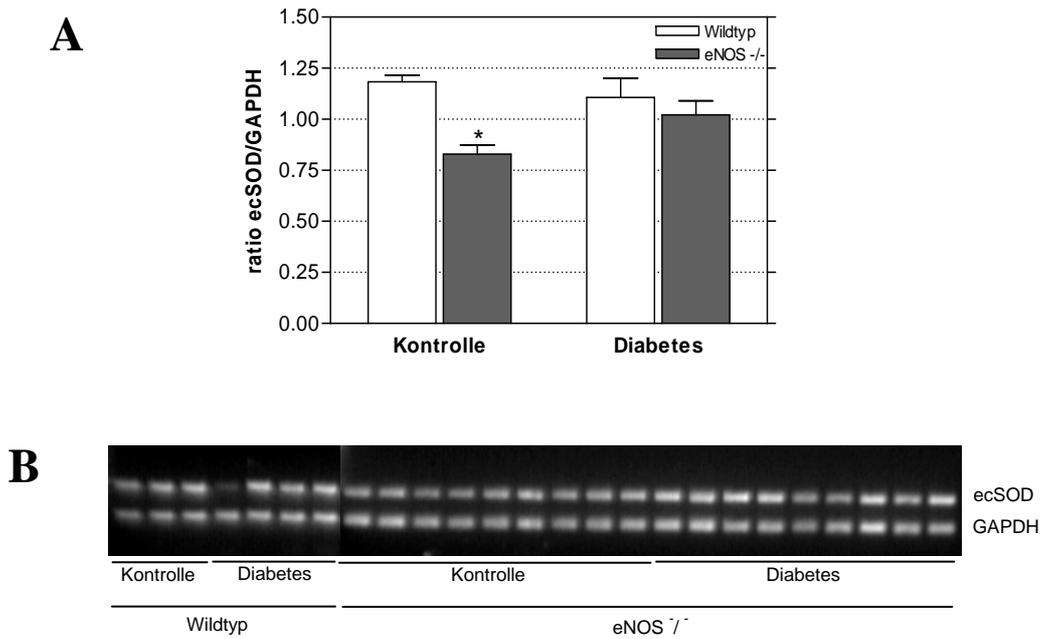


**Abb. 4.48** *ecSOD-Aktivität in Nieren von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens*

*Darstellung der ecSOD-Aktivität in Nieren von Wildtypmäusen und transgenen Mäusen nach eNOS knock out, jeweils unter Kontrollbedingungen (n=4) und 16 Wochen nach STZ-Injektion (n=4). Angezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM).*

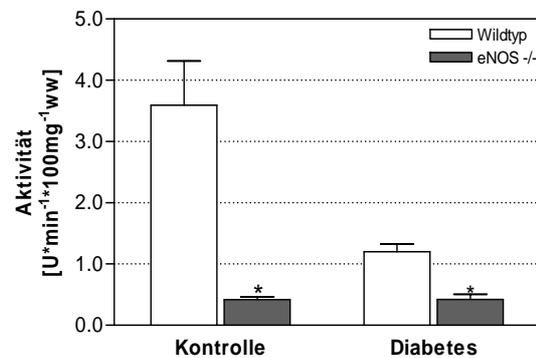
Im überwiegend mikrovaskulären Gewebe des Herzens hatte die Deletion der eNOS bei den diabetischen Tieren im Vergleich zum Wildtyp keinen Einfluss auf die mRNA-Expression (Abb. 4.49). In beiden Fällen war jedoch die Aktivität der ecSOD stark verringert (Abb. 4.50).

Die Regulation der ecSOD in Abhängigkeit von der eNOS-Deletion konnte in Aorten der Mäuse nicht untersucht werden, da die Gewebe nicht zur Verfügung standen



**Abb. 4.49** mRNA-Expression der ecSOD in Herzen von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens

**A.** Graphische Darstellung der ecSOD mRNA-Expression in Herzen von Mäusen des Wildtyps (je  $n=3$ ) und nach Deletion des eNOS-Gens (je  $n=9$ ), jeweils unter Kontrollbedingungen und 16 Wochen nach STZ-Injektion als Mittelwerte ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,001$ ; One-way ANOVA. **B.** Repräsentatives Ethidiumbromidgel.



**Abb. 4.50** ecSOD-Aktivität in Herzen von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens

Darstellung der ecSOD-Aktivität in Herzen von Wildtypmäusen und transgenen Mäusen nach eNOS knock out, jeweils unter Kontrollbedingungen ( $n=4$ ) und 16 Wochen nach STZ-Injektion ( $n=5$ ). Angezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM). \*  $p < 0,05$ ; One-way ANOVA.





## **5 DISKUSSION**

---



Ziel der vorgelegten Dissertation war die Untersuchung der Bedeutung der extrazellulären Isoform der Superoxiddismutasen (ecSOD) bei Diabetes mellitus und Hyperglycämie. Die Modulation dieses Enzyms ist vor allem im Hinblick auf die im Diabetes bzw. unter Hyperglycämie auftretenden Vaskulopathien von zentraler Bedeutung, da es im Extrazellulärraum lokalisiert ist und vermutlich – so die Eingangshypothese – eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> spielt.

Im Folgenden sollen drei Bereiche diskutiert werden:

1. die angewendeten Methoden der ecSOD-Aufarbeitung und Bestimmung der Enzymaktivität sowie die Etablierung des Zellmodells
2. die Regulation der ecSOD im *in vitro* Zellmodell der glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorta
3. die Regulation der ecSOD im *in vivo* Tiermodell der Streptozotizin-diabetischen Ratte

## 5.1 Methoden zur Untersuchung der extrazellulären Superoxid-dismutase

### 5.1.1 RASMC als *in vitro* Zellmodell zur Untersuchung des antioxidativen Enzyms ecSOD

Um Faktoren zu identifizieren, die für die Regulation der ecSOD von Wichtigkeit sein können, wurde zunächst das Modell der glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten (RASMC) etabliert.

Wie in Kapitel 4 beschrieben, konnte durch RT-PCR gezeigt werden, dass die ecSOD von glatten Muskelzellen, nicht aber von Endothelzellen der Gefäße gebildet wird. Dies steht im Einklang mit Befunden von *Strålin et al.*<sup>74</sup>, die humane arterielle, glatte Muskelzellen von Aorten und Koronararterien immunhistochemisch als Hauptquelle der Bildung von ecSOD identifizierten. In späteren Untersuchungen von *Oury et al.* wurde bestätigt, dass vaskuläre glatte Muskelzellen auch in anderer Spezies, wie beispielsweise der Ratte, die Hauptquelle der ecSOD in arteriellen Gefäßen darstellen<sup>76</sup>. Aufgrund der genannten Ergebnisse werden glatte Muskelzellen aus der Aorta von Ratten als ein geeignetes und gut verfügbares Modell zur Untersuchung des antioxidativen Enzyms ecSOD angesehen.

Die Bestimmungen von Aktivität und Proteinexpression wurden dadurch erleichtert, dass die Zellen das Enzym nicht speichern, sondern in das sie umgebende Medium sezernieren. Vergleichende Aktivitätsbestimmungen ergaben eine im Medium 3fach höhere Aktivität als im Zelllysate (vgl. Abb. 4.3).

### 5.1.2 Die Bestimmung der ecSOD-Aktivität mit der NBT-Methode

Die Familie der Superoxiddismutasen katalysieren unabhängig von ihrer Lokalisation und der jeweiligen Zentralatome in ihren aktiven Zentren die Umsetzung von Superoxidradikalen ( $O_2^{\bullet}$ ) zu Wasserstoffperoxid in einer Reaktion pseudo-erster Ordnung ( $k_m = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>104</sup>. Diese Reaktion stellt die Grundlage für die meisten zur Bestimmung der ecSOD-Aktivität verwendeten Methoden dar. Diese beruhen auf der Inaktivierung von Superoxidanionen und einer von ihnen abhängigen Farbreaktion (indirekte Bestimmung). Eine Übersicht über die gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der SOD-Aktivität gibt Tab. 5.1 an.

Methode	pH-Bereich	1U SOD = Protein [µg/ml]	Literatur
Cytochrom <i>c</i>	7,8	0,20	<i>McCord JM, Fridovich I</i> <sup>63;105</sup>
Chemiluminiszenz	7,8	0,05	<i>McPhail LC et al.</i> <sup>106</sup>
KO <sub>2</sub>	9,5	0,004 – 0,07	<i>Marklund SL</i> <sup>107</sup>
NBT	7,8	0,68	<i>Beauchamp C, Fridovich I</i> <sup>85</sup>
NBT + BCS	7,8	0,018	<i>Spitz DR, Oberley LW</i> <sup>86</sup>
Nitrit	7,8 – 8,2	0,06 – 0,12	<i>Elstner EF, Heupel A</i> <sup>108</sup> , <i>Oyanagui Y.</i> <sup>109</sup>

**Tab. 5.1** Übersicht der gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der SOD-Aktivität

Modifiziert nach *Beyer, W.F.*<sup>110</sup>

1985 beschrieb *Marklund* erstmals einen direkten Assay zur Bestimmung der SOD-Aktivität<sup>107</sup>, der zwar eine hohe Sensitivität aufweist, gleichzeitig jedoch äußerst störanfällig ist. Aufgrund der Ergebnisse methodischer Vorversuche wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Aktivität der extrazellulären Superoxiddismutase die indirekte Methode von *Beauchamp* und *Fridovich*<sup>85</sup> in einer modifizierten Form nach *Spitz* und *Oberley*<sup>86</sup> angewendet. Diese Bestimmungsmethode zeichnet sich sowohl durch eine hohe Sensitivität als auch durch eine unkomplizierte Durchführung ohne Interferenzen aus.

Der angewandte Assay bedient sich des Farbstoffs Nitrotetrazoliumblau (NBT) als Detektor für Superoxidradikale<sup>85</sup>. Die SOD-Aktivität ist definiert als ihre Fähigkeit die superoxidanionenabhängige NBT-Reduktion zu inhibieren. Als radikalinduzierendes System wird ein Gemisch aus Xanthin und Xanthinoxidase (XOD) eingesetzt (Reaktionsschema s. Abb. 3.4 in Kapitel 3.4.3). Es ist bekannt, dass NBT durch Superoxidanionen zu Formazan reduziert wird, eine Reaktion, die durch Superoxiddismutase gehemmt werden kann<sup>85</sup>. Nach *Beauchamp et al.* ist die Formazanbildung zu 90 % durch den Zusatz von SOD hemmbar.

*Spitz* und *Oberley* modifizierten die von *Beauchamp et al.* beschriebene Methode<sup>86</sup>. Durch den Zusatz von Bathocuproinsulfonsäure (BCS) als Eisenchelatbildner wird die mitochondrielle Elektronentransportkette blockiert, so dass mitochondriell entstandene Elektronen nicht zur Reduktion des NBT beitragen.

Im Gegensatz zu anderen Isoformen wird die ecSOD durch Natriumcyanid inhibiert. Cyanid komplexiert das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum<sup>111</sup>, woraus der Verlust der Enzymaktivität resultiert<sup>65;112</sup>. Diese Reaktion ermöglicht die generelle Unterscheidung zwischen kupfer- und zinkhaltigen Isoformen der SOD und der mitochondrialen manganhaltigen Isoform. Um die ecSOD von der cytosolischen Cu/ZnSOD unterscheiden zu können, wurde die ecSOD über eine Concanavalin A-Sepharose-Säule (ConA-Sepharose) angereichert, da sie im Gegensatz zur cytosolischen Isoform als Glycoprotein an Lectine wie Concanavalin A bindet<sup>75</sup>. Die Elution erfolgte mit  $\alpha$ -Methylmannosid. Die Wiederfindungsrate beträgt dabei 70 – 90 %<sup>75</sup>.

Für die Aktivitätsbestimmung in Gewebehomogenaten erwies sich die Anreicherung der ecSOD als essentiell, während für die Bestimmung in Zellüberständen die Anreicherung nicht notwendig war, da im Medium ausschließlich die ConA-affine Form, d.h. die ecSOD, nachgewiesen werden konnte.

## 5.2 Regulation der ecSOD im *in vitro* Zellmodell der RASMC

Um bestimmte Mediatoren zu untersuchen, die für die Regulation der ecSOD im Diabetes mellitus bedeutsam sind, wurden RASMC mit diesen inkubiert und anschließend die Aktivität der ecSOD im Medium bestimmt.

Zur Erleichterung der Diskussion sind die wichtigsten Ergebnisse kurz zusammengefasst:

- Die ecSOD wird durch hohe Glucosekonzentrationen (30 mM) aktiviert.
- Bei Inkubation mit dem Radikalbildner tert.-Butylhydroperoxid (t-BHP) wird die Aktivität der ecSOD signifikant erhöht.
- Stickstoffmonoxid aktiviert unter normoglycämischen Bedingungen die ecSOD, nicht aber unter hyperglycämischen Bedingungen (30 mM Glucose).
- Die Aktivierung der PKC verursacht eine Aktivierung der ecSOD, Hemmung eine Reduktion. Diese Modulation der ecSOD-Aktivität erfolgt sowohl unter normo- als auch unter hyperglycämischen Konditionen.

Die dargestellten Ergebnisse an glatten Gefäßmuskelzellen legen den Schluss nahe, dass eine Aktivierung und vermehrte Expression der ecSOD über drei Wege möglich ist:

- (1) NO<sup>•</sup>-abhängige Regulation;
- (2) durch Cytokine (IL-1 $\alpha$ ) induzierte Regulation oder
- (3) Modulation durch reaktive Sauerstoffspezies.

Dabei scheinen allerdings nur die beiden letztgenannten Mechanismen unter hyperglycämischen Bedingungen von Bedeutung zu sein.

### 5.2.1 Die Bedeutung von NO<sup>•</sup> bei der Regulation der ecSOD

Aus den Untersuchungen an RASMC nach Inkubation mit dem NOS-Inhibitor *N*<sup>0</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA) und dem NO<sup>•</sup>-Donor *S*-Nitroso-Aminopenicillin (SNAP) folgt, dass Stickstoffmonoxid die ecSOD reguliert. Beide Substanzen beeinflussten nicht die Proteinexpression, führten jedoch zu einer signifikanten Modulation der ecSOD-Aktivität. Unter L-NNA war die Aktivität um ca. 50% vermindert; bei Zufuhr von NO<sup>•</sup> durch SNAP wurde eine massive Steigerung der Aktivität um das ca. 30fache beobachtet. Diese Befunde werden durch Literaturdaten unterstützt, denen zufolge ebenfalls exogen zugeführtes NO<sup>•</sup> zu einer Hochregulation der ecSOD in vaskulären glatten Muskelzellen führt<sup>92</sup>.

*Fukai* konnte eine Erniedrigung der ecSOD-Expression auch *in vivo* in Aorten von eNOS knock out Mäusen nachweisen<sup>113</sup>. Dies steht im Einklang mit den eigenen Befunden, in denen gezeigt werden konnte, dass in Herzen und Nieren von Ratten bzw. Mäusen nach Inhibition der NOS durch L-NAME respektive Deletion des eNOS-Gens die ecSOD-Aktivität in diesen Organen verringert ist.

Allerdings konnte in den *in vitro* Versuchen die glucoseinduzierte Steigerung der ecSOD-Aktivität nicht durch L-NNA inhibiert werden. Auch die entsprechenden *in vivo* Daten aus Herzen und Nieren diabetischer Tiere zeigten keine Veränderung der ecSOD-Aktivität nach Inhibition bzw. Deletion der NO-Synthase. Dies legt den Schluss nahe, dass unter Vorliegen hoher Glucosekonzentrationen die ecSOD nicht durch die endotheliale NO<sup>•</sup>-Freisetzung, sondern durch andere hyperglycämieinduzierte Mechanismen reguliert wird.

Obwohl es zu einer Aktivierung der eNOS und damit zu einer gesteigerten NO<sup>•</sup>-Produktion kommt<sup>33;34</sup>, ist im Diabetes mellitus die NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit vermindert<sup>32</sup>. Dabei wird jedoch gleichzeitig mehr Superoxid produziert, das mit NO<sup>•</sup> zu Peroxynitrit abreagieren kann. Dies würde die Peroxynitritbildung und in der Folge auch die damit verbundene Bildung von Nitrotyrosin fördern<sup>46;114</sup>. Klinische Untersuchungen, in denen ein Anstieg des Nitrotyrosins im Plasma nach hyperglycämischer Belastung nachgewiesen wurde, stehen im Einklang mit diesen Annahmen<sup>115</sup>.

Neben den cytotoxischen Wirkungen über die Nitrierung von Tyrosinresten kann Peroxynitrit auch zu einer Steigerung des vaskulären oxidativen Stress beitragen, indem es den Kofaktor der NO-Synthase Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) zu Dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) oxidiert. Dadurch wird die NOS "entkoppelt" und somit zu einer potenten Quelle der ROS-Produktion.

### 5.2.2 Cytokine induzieren die ecSOD-Aktivität

Nach Behandlung der vaskulären glatten Muskelzellen mit Cytokinen konnte eine erhöhte Aktivität und Proteinexpression der ecSOD unter IL-1 $\alpha$  nachgewiesen werden, während es unter TNF- $\alpha$  zu einer Verringerung der Aktivität kam. Diese Befunde stimmen überein mit Ergebnissen von *Marklund* und *Strålin*, die in Fibroblasten<sup>116</sup> und vaskulären glatten Muskelzellen<sup>117</sup> ebenfalls eine vermehrte ecSOD-Aktivität unter Einfluss von IL-1 $\alpha$  bzw. eine verringerte Aktivität nach Exposition gegenüber TNF- $\alpha$  nachwiesen. Die cytokininduzierte Regulation der ecSOD ist unter Umständen auf die Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGE) zurückzuführen. Eine diabetische Stoffwechsellage bzw. das Vorliegen einer Hyperglycämie führt bekanntermaßen zu einer vermehrten Bildung von AGE, die als Auslöser einer verstärkten Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (z.B. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) beschrieben werden<sup>118-120</sup>. Die durch reaktive Carbonylverbindungen veränderten Plasmaproteine (AGE) interagieren auch mit für sie spezifischen Rezeptoren an der Oberfläche von Endothelzellen, Mesangialzellen und Makrophagen. Diese Bindung von AGE an seinen Rezeptor RAGE (Rezeptor für AGE) stellt ebenfalls eine mögliche Ursache der ecSOD-Regulation unter hyperglycämischer Belastung dar, da es über eine anschließende Aktivierung des MAP-Kinaseweges zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate kommt, die letztendlich für die Aktivierung der ecSOD verantwortlich sind<sup>52</sup>. Die Bedeutung der Sauerstoffradikale bei der Regulation der ecSOD wird im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

### 5.2.3 ROS-abhängige Regulation der ecSOD

In der DCCT-Studie konnte gezeigt werden, dass hohe Glucosekonzentrationen einen wichtigen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung diabetischer Sekundärkomplikationen darstellen<sup>3</sup>. Zu den Sekundärkomplikationen zählt vor allem die Entwicklung von Vaskulopathien. Es wird heute als sicher angenommen, dass eine endotheliale Dysfunktion ein wichtiger primärer Schritt bei der Entwicklung von Gefäßkomplikationen darstellt, wobei der oxidative Stress als eine mögliche Ursache diskutiert wird<sup>53;89</sup>.

In dieser Arbeit wurde durch die Inkubation von RASMC mit dem Radikalbildner tertiäres Butylhydroperoxid (t-BHP) gezeigt, dass die Aktivität der ecSOD durch die daraus entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies gesteigert wird. Unter Behandlung mit dem organischen Hydroperoxid t-BHP wurde in RASMC eine 20fach gesteigerte Aktivität der ecSOD beobachtet, wohingegen die Proteinexpression unbeeinflusst blieb. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen an Fibroblasten, bei denen eine Reduktion der ecSOD-Aktivität unter t-BHP beobachtet wurde<sup>121</sup>. Der im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Dissertation kontroverse Bericht ist unter Umständen darauf zurückzuführen, dass die von *Strålin et al.* eingesetzte Konzentration mit 300 µM t-BHP so hoch gewählt wurde, dass daraus letztendlich eine irreversible Schädigung der Zellen resultieren könnte. Die für diese Arbeit gewählte Konzentration von 100 µM t-BHP führte weder zu apoptotischen Veränderungen der Zellen noch zum Zellverlust. Möglicherweise sind die gegensätzlichen Beobachtungen auch auf die Unterschiede der verwendeten Zelllinien zurückzuführen.

Die Aktivierung der ecSOD durch reaktive Sauerstoffintermediate ist von Bedeutung, da in verschiedenen Zellsystemen vermehrt die Bildung von Sauerstoffradikalen unter hyperglycämischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte<sup>122;123</sup>. Durch die Färbung von RASMC mit dem Fluorescein-Derivat DCF-DA wurde ebenfalls in der verwendeten Zellkultur unter 30 mM Glucose eine massive Bildung von Sauerstoffradikalen beobachtet. Dabei ist anzumerken, dass dieser Effekt mittelfristig (nach 96 Stunden), nicht aber nach einer kurzfristigen Behandlung (1 Stunde) mit 30 mM Glucose auftrat.

Dass freie Sauerstoffradikale für die diabetesassoziierte endotheliale Dysfunktion verantwortlich sind, wurde von *Tesfamariam* Anfang der 1990er Jahre erstmals beschrieben<sup>42;43</sup>. Die gefäßschädigende Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies hängt aber nicht nur von ihrer Bildung ab, sondern wird auch wesentlich von der Aktivität antioxidativer Schutzsysteme wie der Glutathionreduktase, der Catalase und in besonderem Maße der Superoxiddismutase bestimmt<sup>124;125</sup>. Obwohl die extrazelluläre Isoform der Superoxiddismutasen wahrscheinlich eine besondere Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gefäßreaktivität und der NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit besitzt, wurde ihre Aktivität und Regulation bisher wenig untersucht. Jedoch kann vermutet werden, dass Glucose einen vergleichbaren Effekt auf die extrazelluläre Isoform der SOD besitzt, wie er bereits für das cytosolische und das mitochondrielle Isoenzym nachgewiesen wurde<sup>124;125</sup>.

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass in einer Kultur von glatten Muskelzellen aus Rattenaorta (RASMC) die ecSOD-Aktivität dosisabhängig durch Glucose gesteigert wird. Hierbei handelt es sich um einen Effekt der hohen Glucosekonzentrationen und nicht um eine Regulation aufgrund des hohen osmotischen Drucks. Der Beweis wurde durch Exposition der glatten Muskelzellen gegenüber hohen Glucosekonzentrationen vergleichbaren isomolaren Mengen an Mannitol erbracht. Es konnte dabei weder auf Proteinebene noch bei der Aktivitätsbestimmung eine Veränderung der ecSOD beobachtet werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte weiter untersucht werden, inwiefern eine glycolytische Verstoffwechslung des Zuckers für die Regulation der ecSOD von Bedeutung ist. Dabei wurde gezeigt, dass es neben hohen Glucosekonzentrationen (30 mM) ebenfalls durch das nicht verstoffwechselbare Zuckerderivat 3-O-Methylglucose (3-OMG) zu einer Steigerung der ecSOD-Aktivität kommt. Die Hochregulation zeigte jedoch ein geringeres Ausmaß im Vergleich zur erhöhten ecSOD-Aktivität unter 30 mM Glucose. Dies deutet auf eine partielle Notwendigkeit des Glucosemetabolismus über die Glycolyse hin.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse der Regulation durch Radikalbildner und Glucose bzw. 3-OMG sowie der Befund, dass durch hohe Glucosekonzentrationen (30 mM) die Generierung der ROS gefördert wird, zeigen, dass die hyperglycämieassoziierte *Up-Regulation* der ecSOD durch Sauerstoffradikale mediiert wird. Dies legt die Frage nahe, über welche Mechanismen es unter hyperglycämischen Konditionen und nach Behandlung mit

3-OMG zu einer Generierung von Sauerstoffradikalen kommt. Als Antwort können vier Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

- i) ROS-Generierung über den Polyolweg;
- ii) die Mitochondrien als potentielle Radikalquelle,
- iii) die "entkoppelte" NOS (vgl. Kap. 5.2.1) und
- iv) die NAD(P)H-Oxidase als potenter Radikalbildner.

Die Bedeutung des **Polyolwegs** ergibt sich aus der Beobachtung, dass nach Inkubation von RASMC mit dem nicht verstoffwechselbaren Glucose-Derivat 3-OMG eine Erhöhung der ecSOD-Aktivität nachgewiesen wurde. Der Polyolmetabolismus trägt über einen Mechanismus entscheidend zur Entstehung von oxidativem Stress und damit zu einer möglichen ecSOD-Regulation bei. Durch den erhöhten Umsatz von Glucose über diesen Stoffwechselweg wird der NADPH-Gehalt verringert. NADPH wird jedoch benötigt, um das antioxidativ wirksame Glutathion (GSH) zu regenerieren. Durch die verringerte Verfügbarkeit von Glutathion als Antioxidans können ROS nur in einem geringeren Ausmaß inaktiviert werden. So wird durch den verstärkten Glucoseflux über den Polyolweg und dem damit einhergehenden NADPH-Verbrauch die antioxidative Kapazität der Zelle reduziert.

Eine zusätzliche Möglichkeit der ROS-Generierung stellt die **mitochondrielle Atmungskette** dar. Durch eigene Versuche konnten mit Hilfe der Doppelfärbung von RASMC mit Mitotracker Red und DCF die Mitochondrien als eine Quelle der ROS-Bildung identifiziert werden. Bei einem Substratüberschuss wird Glucose vermehrt über Glycolyse und Citratcyclus umgesetzt. Die dadurch entstehenden Reduktionsequivalente NADH und FADH<sub>2</sub> gehen vermehrt in die Elektronentransportkette der Mitochondrien ein, wo sie unter physiologischen Bedingungen für die Energiegewinnung in Form von ATP benötigt werden. Daneben kann auch das über den Polyolweg entstehende NADH in die Atmungskette mit einfließen. Ein Überschuss der Reduktionsequivalente bedingt die Entkopplung der Elektronentransportkette. Dies äußert sich in einer Erhöhung der elektrochemischen Potentialdifferenz entlang der inneren Mitochondrienmembran<sup>50</sup>, woraus eine längere Halbwertszeit von superoxidbildenden Elektronentransportintermediaten wie Ubisemichinon resultiert. Die auf diesem Weg vermehrt entstehenden Sauerstoffradikale hemmen die Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Durch die Hemmung der GAPDH kommt es zum Rückstau von Glycolyseintermediaten, die vermehrt über alternative Mechanismen metabolisiert werden. Einer dieser alternativen Stoffwechselwege ist der Hexosaminweg. Die Bedeutung dieses Stoffwechselweges wurde geklärt, indem das Schlüsselenzym, die Glucosamin:Fructose-6-phosphat Amidotransferase (GFAT), durch Azaserin blockiert wurde. Dabei zeigte sich trotz Blockade des Stoffwechselweges eine massive Erhöhung der ecSOD-Aktivität. Aufgrund dieses Befunds kann eine mögliche Regulation der ecSOD in glatten Muskelzellen der Rattenaorta über eine Aktivierung des Hexosaminwegs ausgeschlossen werden.

Ein weiterer durch GAPDH-Inhibition vermittelter, vermehrt genutzter Signaltransduktionsweg stellt die **Aktivierung der Proteinkinase C** durch vermehrte DAG *de novo* Synthese dar. Die modulatorischen Eigenschaften der PKC auf die ecSOD wurden in eigenen Untersuchungen nachgewiesen. Die Inkubation mit dem PKC-Aktivator PMA steigerte die ecSOD-Aktivität, die dabei einen vergleichbaren Level aufwies wie unter 30 mM Glucose bestimmt worden war. Die Koinkubation der RASMC mit 30 mM Glucose und dem PKC-Inhibitor BIM supprimierte die glucoseinduzierte Erhöhung der ecSOD-Aktivität. Beide Versuche legen den Schluss nahe, dass der PKC eine essentielle Bedeutung der hyperglycämieinduzierten Regulation der ecSOD zukommt. Bisher existieren keinerlei Anhaltspunkte für einen unmittelbaren Einfluss der PKC auf die ecSOD, so dass die durch PKC-Aktivierung ausgelöste *Up-Regulation* der ecSOD vermutlich über die Bildung von Superoxidradikalen verläuft. Die Bildung der Sauerstoffradikale nach Stimulierung der PKC erfolgt über eines ihrer Zielenzyme: PKC aktiviert durch Phosphorylierung die NAD(P)H-Oxidase<sup>126-130</sup>. Außerdem ist bekannt, dass es unter hohen Glucosekonzentrationen bzw. im Diabetes zu einer vermehrten Aktivierung der PKC kommt<sup>131-138</sup>. In einem sich selbst verstärkenden Kreislauf können die so gebildeten ROS die PKC weiter aktivieren<sup>139</sup>. Den kausalen Zusammenhang zwischen einer diabetesassoziierten Aktivierung der PKC und der dadurch ausgelösten Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase stellten erstmals *Inoguchi et al.* her<sup>140</sup>. Die von diesen Autoren beschriebenen Ergebnisse konnten in eigenen Versuchsansätzen auch für glatte Muskelzellen aus der Rattenaorta bestätigt werden: die Inkubation der Zellen mit hohen Glucosekonzentrationen vermittelte eine massive Erhöhung der Radikalbildung in den RASMC. Durch Doppelfärbung der Zellen mit Mitotracker Red und DCF konnte neben den Mitochondrien eine weitere Quelle der Generierung von Sauerstoffradikalen identifiziert werden (s. Kapitel 4.2.1 und 4.2.5). Der Beweis ergibt sich aus der Zellfärbung nach vorheriger Inhibition der Mitochondrienatmung durch TTFA.

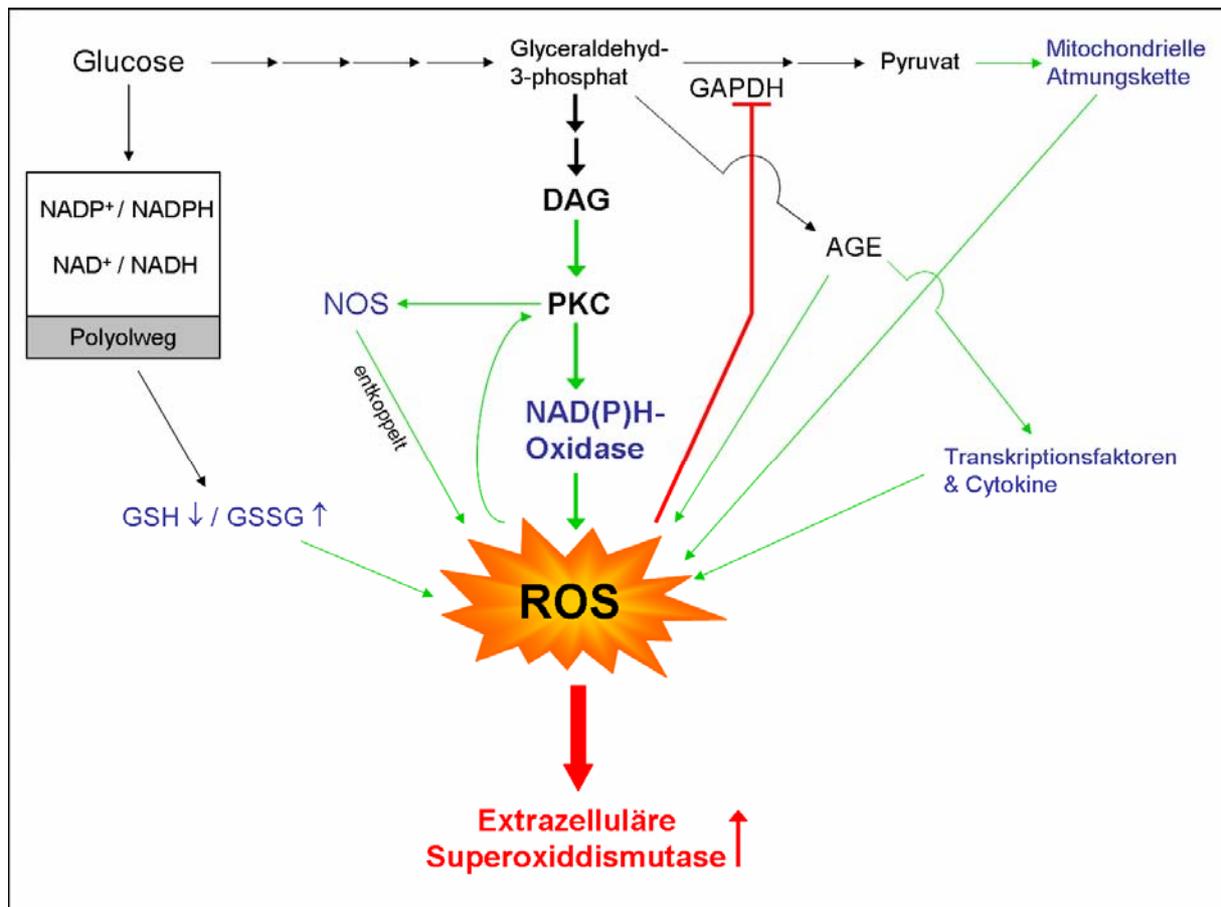
Trotz eingeschränkter Elektronentransportkette wurden weiterhin Sauerstoffradikale gebildet, was durch eine intensive grüne Fluoreszenz des DCF belegt wurde (s. Kapitel 4.2.5). NAD(P)H-Oxidase als ein sehr potentes radikalinduzierendes System rückte hier in den Focus. Wie die Zellversuche nach gleichzeitiger Inkubation der RASMC mit hoher Glucose, TTFA und dem NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Apocynin zeigten, wurde die glucoseinduzierte Radikalbildung auf diesem Weg vollständig unterbunden (vgl. Kapitel 4.2.5).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zum Einfluss der PKC auf die Regulation der ecSOD unterstützen im Zusammenhang mit den Literaturdaten die Hypothese, dass die ROS-Produktion, die zu einem Anstieg der ecSOD-Aktivität führt, auf eine PKC-abhängige Stimulation der NAD(P)H-Oxidase zurückzuführen ist. Dabei kommt es über die verstärkte DAG *de novo* Synthese aufgrund von Substratüberschuss und forcierter Glycolyse zunächst zu einer verstärkten Stimulation der PKC. Diese ist für die Phosphorylierung und anschließende Translokation der cytosolischen p47phox und p67phox-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase an die Membran der glatten Muskelzellen verantwortlich. An der Membran bilden die katalytischen Untereinheiten zusammen mit den membranverankerten Untereinheiten die aktive Oxidase<sup>54;55</sup>. Wichtig in diesem Zusammenhang ist der Befund, dass die durch die NAD(P)H-Oxidase gebildeten Sauerstoffradikale sowohl intrazellulär als auch extrazellulär sezerniert werden können<sup>141</sup>.

Zusammenfassend zeigt sich *in vitro* eine Regulation der ecSOD durch NO<sup>•</sup>, wobei dieser Mechanismus offensichtlich bei Vorliegen einer Hyperglycämie von geringer Bedeutung ist. Wichtig erscheint hier die Tatsache, dass die ecSOD durch das vermehrte Vorliegen von Sauerstoffradikalen reguliert wird. Dabei spielt die hyperglycämieinduzierte Aktivierung der Proteinkinase C und die damit einhergehende Aktivierung der ROS-bildenden NAD(P)H-Oxidase eine zentrale Rolle. Eine Übersicht gibt Abb. 5.1.

Wie im Einzelnen reaktive Sauerstoffspezies die ecSOD regulieren ist bisher wenig erforscht. Als eine mögliche Erklärung wird der Einfluss von ROS auf die pleiotropen Transkriptionsfaktoren NFκB und p21<sup>Ras</sup> diskutiert<sup>52</sup>, von denen auch bekannt ist, dass sie über entsprechende regulatorische Domänen am ecSOD-Gen dieses Enzym in seiner Aktivität und Expression beeinflussen<sup>142</sup>.

Die durch Hyperglycämie induzierte, gesteigerte Expression und Aktivität der ecSOD, wie sie hier gezeigt wurde, kann als kompensatorische Reaktion auf oxidativen Stress verstanden werden. So wäre im weiteren Verlauf die Entwicklung einer durch Sauerstoffstress ausgelösten endothelialen Dysfunktion eingeschränkt.



**Abb. 5.1** Übersicht der ecSOD-regulierenden Stoffwechselwege

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können unter hyperglycämischen Bedingungen über unterschiedliche Wege gebildet werden. In **blau** dargestellt sind die Radikal generierenden Mediatoren. Einzelheiten zu den verschiedenen ROS-induzierenden Stoffwechselwegen siehe Kapitel 5.2. In der Abbildung wurden Reaktionswege durch **schwarze** Pfeile ( $\rightarrow$ ), stimulierende bzw. aktivierende Stoffwechselwege durch **grüne** Pfeile ( $\rightarrow$ ) und hemmende Stoffwechselwege durch  $\perp$  in **rot** dargestellt. Der hauptsächliche Mechanismus, über den die ecSOD-regulierenden Sauerstoffradikale gebildet werden, ist **fett** gedruckt. AGE = advanced glycation end products; DAG = Diacylglycerol; GAPDH = Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GSH = Glutathion (reduzierte Form); GSSG = Glutathion (oxidierte Form); NADP = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase; PKC = Proteinkinase C; ROS = reaktive Sauerstoffspezies;

### 5.3 Modulation der ecSOD im Tiermodell der Streptozotizin-diabetischen Ratte

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Diabetes- und NO<sup>•</sup>-assoziierte Regulation der ecSOD *in vivo* diskutiert werden, da es sich bei Diabetes mellitus um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, bei der die Hyperglycämie nur einen pathophysiologischen Parameter darstellt. Es soll untersucht werden, ob sich die *in vitro* erhobenen Daten der ecSOD-regulatorischen Eigenschaften von Superoxid und Stickstoffmonoxid *in vivo* durch Untersuchung komplexer Organe wieder finden lassen, und ob es sich bei den in den Zellen aufgezeigten Ergebnissen lediglich um einen akuten Effekt handelt oder ob diese Veränderungen eine andauernde Anpassung an den oxidativen Stress darstellen.

Auch an dieser Stelle werden zur Erleichterung der Diskussion die wichtigsten Ergebnisse kurz zusammengefasst:

- In Nieren von STZ-diabetischen Ratten konnte ein von der Diabetesdauer abhängiger Einfluss auf das Enzym nachgewiesen werden. Das Organ reagiert sensibel auf oxidativen Stress und reguliert die ecSOD kompensatorisch zur Erhaltung der Nierenfunktion hoch.
- In Aorten konnte weder in eNOS k.o. Mäusen noch durch Hemmung der NOS durch L-NAME ein Einfluss von NO auf die ecSOD-Aktivität nachgewiesen werden.
- In Herzen von diabetischen Ratten war die ecSOD-Aktivität vermindert. Eine verringerte Aktivität zeigte sich ebenfalls nach Blockade der NOS durch L-NAME.

Die folgende Diskussion gliedert sich in zwei Teile. Zum einen wird das Modell des experimentellen Diabetes in Ratten betrachtet. Im zweiten Teil werden die Befunde der einzelnen Organe diskutiert.

### 5.3.1 Die Streptozotocin-diabetische Ratte als IDDM Modell

Streptozotocin ist ein Antibiotikum das vom Bakterium *Streptomyces achromogenes* synthetisiert wird<sup>143</sup>. Es handelt sich hierbei um ein Glucosederivat (*N*-[Methylnitroso-carbamoyl]- $\alpha$ -D-Glucosamin), welches als Zuckeranalogon vom Glucose-transporter GLUT2 der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas selektiv aufgenommen wird<sup>83;96</sup>. Die Schädigung der  $\beta$ -Zellen ist auf die Alkylierung von DNA und Proteinen durch die Nitrosoharnstoffgruppe zurückzuführen<sup>100</sup>. Zum einen aktivieren alkylierte Membranproteine das Immunsystem, wodurch es zu einer Degeneration der Zellen kommt. Zum anderen führen DNA-Alkylierungen zu Strangbrüchen, die die nukleäre PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) stimulieren. Die erhöhte Aktivität der PARP führt zu einer verringerten Konzentration von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ), wodurch die Funktion der Inselzellen, Insulin zu synthetisieren und zu sezernieren, beeinträchtigt wird<sup>144;145</sup>. Eine Regeneration der  $\beta$ -Zellen nach STZ-Injektion ist auch bei längeren Versuchsdauern ausgeschlossen<sup>146</sup>. Die nachfolgend beschriebenen, durch STZ ausgelösten Effekte auf den Stoffwechsel sind dosisabhängig<sup>147</sup>. Zur Diabetes-Induktion wurde eine mittlere Dosis eingesetzt, bei der weder eine Ketoazidose auftritt noch eine Insulintherapie notwendig wird<sup>148</sup>.

Die Degeneration der  $\beta$ -Zellen führt zu einem Insulinmangel, der durch eine persistierende Hyperglycämie zum Ausdruck kommt. Dies entspricht dem pathophysiologischen Status des insulinpflichtigen Diabetes mellitus (*insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM). Weitere physiologische und biochemische Parameter wie Glucosurie, Polydipsie, Polyurie, Kachexie und Organomegalie charakterisieren den *Status diabeticus*.

In Abhängigkeit von der Diabetesdauer kam es zu einer Steigerung der Blutglucose und einer Abnahme des Körpergewichts. Die Steigerung des Blutzuckerspiegels erklärt sich über die verringerte insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Organe, wodurch das Monosaccharid im Blut akkumuliert. Fernerhin ist die insulininduzierte Inhibition der Gluconeogenese und der Glycogenolyse in der Leber aufgrund des fehlenden Insulins blockiert. So kommt es zu einer weiteren Glucoseabgabe ins Blut. Statt Glucose werden Fette und endogene Proteine (Muskelmasse) als Energielieferanten metabolisiert. Durch die Abnahme der Muskelmasse sinken die Serumkreatininkonzentrationen, die eng mit dem Anteil der Muskelmasse korrelieren.

Diabetes mellitus bewirkt eine Hyperperfusion der glomerulären Blutgefäße. Hochmolekulare Substanzen wie Proteine treten so vermehrt in den Harn über, wobei sie jedoch nicht durch die Tubuli rückresorbiert werden können. Dies führt zur Proteinurie bei gleichzeitig abnehmendem Serumproteingehalt. Makroskopisch zeigen sich die Veränderungen der Niere in einer Hypertrophie<sup>148</sup>. Die relativen Nierengewichte waren sowohl nach 3 Wochen als auch nach 16 Wochen Diabetesdauer erhöht. Das gilt ebenso für die Herzen, worin sich auch hier die Hypertrophie des Organs zeigt. Als Folge der proliferativen diabetischen Retinopathie konnte die Bildung von Katarakten beobachtet werden. Die nachgewiesene Hypertriglyceridämie weist auf ein proatherogenes Potential hin. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nach STZ-Injektion stimmen weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>98;148-150</sup>.

Zwar ist die Entstehung des STZ-Diabetes nicht mit den Autoimmunreaktionen, die zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ I beim Menschen führen, vergleichbar, jedoch entspricht dieses diabetische Tiermodell aufgrund seiner Veränderungen in den beschriebenen physiologischen und biochemischen Parametern dem pathophysiologischen Erscheinungsbild des humanen IDDM. Somit ist die STZ-diabetische Ratte geeignet, um diabetesbedingte Veränderungen im vaskulären Gefäßbett zu untersuchen.

### **5.3.2 Untersuchungen zur Regulation der ecSOD in ausgewählten Organen STZ-diabetischer Ratten**

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde an Hand eines *in vitro* Zellkulturmodells aufgezeigt, dass die ecSOD hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert wird, und dass Stickstoffmonoxid unter hyperglycämischen Bedingungen nicht an der Regulation der ecSOD beteiligt ist. Der Aktivierung der PKC durch eine vermehrte DAG *de novo* Synthese kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da sie ursächlich an der Amplifizierung der ROS-Produktion beteiligt ist. Diese *in vitro* Ergebnisse dienen als Grundlage für die Untersuchungen im Rattenmodell *in vivo*, um Veränderungen der ecSOD im komplexen Erscheinungsbild des Diabetes mellitus zu bestimmen.

Die untersuchten Organe wurden unter dem Gesichtspunkt der Entstehung gravierender diabetischer Vaskulopathien ausgewählt, die in der Praxis zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten führen. Beispielhaft für die mikrovaskulären Strombahnen wurden Nieren und Herzen untersucht. Makrovaskuläre Gefäße wurden in Form von Aorten berücksichtigt.

Bis zum Erscheinen der Dissertation waren der Literatur keine Angaben zu entnehmen, die sich mit der ecSOD in Organen diabetischer Tiermodelle beschäftigten. Die Veränderung der ecSOD-Konzentration wurde lediglich in zwei Humanstudien beschrieben, die dieses Enzym bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, unter anderem mit Diabetes, bestimmten<sup>151;152</sup>. Aus diesem Grund, und da als Probenmaterial Patientenserum eingesetzt wurde, besitzen diese Studien für die Beantwortung der vorliegenden Fragestellung keine Relevanz.

Zur Untersuchung der Eingangshypothese wurde die ecSOD zunächst in **Nieren** von Ratten nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen und 16 Wochen bestimmt. Dabei war zu beobachten, dass es nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen zu einer *Up-Regulation* der ecSOD kommt. Die mRNA- und Proteinexpression gehen mit der Aktivitätssteigerung einher. Die gemessene Steigerung der ecSOD-Expression und -Aktivität kann als wichtiger kompensatorischer Mechanismus angesehen werden, der dem erhöhten antioxidativen Stress in diesem Organ entgegenwirkt. Auch für weitere antioxidative Enzyme wie der cytosolischen Cu/ZnSOD oder Hämoxygenase konnten nach einem kurzfristigen Diabetes erhöhte Mengen nachgewiesen werden<sup>58;153</sup>. Dass Sauerstoffstress in Nieren von diabetischen Tieren vorliegt, wurde von *Brands et al.* und *Schnackenberg et al.* beschrieben<sup>154;155</sup>. Diese beiden Studien zeigten ebenfalls auf, dass die beobachteten Veränderungen durch exogen zugeführte SOD-Mimetika verbessert werden konnten, was die Bedeutung der extrazellulären Superoxiddismutase in der frühen Verhinderung von Nierenschäden unterstreicht.

Als Ursache des oxidativen Stress wurde aufgrund der vorangegangenen *in vitro* Versuche bereits die NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung über einen PKC-abhängigen Mechanismus diskutiert. Dass dieser Weg vermutlich auch zur renalen Produktion von Sauerstoffradikalen und darüber zur Regulation der ecSOD beiträgt, legen Literaturdaten nahe, in denen für Nieren STZ-diabetischer Ratten eine vermehrte Expression der katalytischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase NOX4, p22phox und NOX1<sup>79;156</sup> nachgewiesen werden konnte. Dabei wird unter anderem ein PKC-abhängiger Mechanismus angenommen<sup>55</sup>.

Dass die charakteristischen Veränderungen im Rahmen einer Nephropathie, wie renale Hypertension und Albuminurie vermutlich durch oxidativen Stress ausgelöst werden, wird auch dadurch verdeutlicht, dass die Gabe von Antioxidantien, z.B. Vitamin E, ProbucoI oder SOD-Mimetika, diese Symptome mindern können<sup>58;154</sup>.

Nach einer längeren Diabetesdauer von 16 Wochen wiesen die mRNA und die Proteinexpression der ecSOD weiterhin eine Erhöhung auf, jedoch unterschied sich die Aktivität des Enzyms nicht von der in Kontrolltieren gemessenen, was möglicherweise auf eine Inaktivierung der ecSOD in Nieren diabetischer Ratten zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse entsprechen damit nicht der Erwartung, dass auch im Langzeitdiabetes die NAD(P)H-Oxidase abhängige ROS-Generierung zu einer *Up-Regulation* der ecSOD führt. Vielmehr scheinen hier sekundäre Ereignisse, die das Enzym inaktivieren, in den Vordergrund zu treten. Eine nach längerer Diabetesdauer verringerte Aktivität bei gleich bleibend erhöhter mRNA-Expression konnte auch für die cytosolische Form der Cu/ZnSOD (SOD1) in Nieren von diabetischen Ratten im Vergleich zu Nieren aus Kontrolltieren belegt werden<sup>157;158</sup>. Als eine mögliche Erklärung der Aktivitätsminderung wird eine Glycosylierung des Enzyms an Lysinresten im aktiven Zentrum diskutiert<sup>159</sup>. Da die aktiven Zentren der SOD1 und der ecSOD zueinander eine hohe Homologie aufweisen, wäre diese Erklärung auch für die ecSOD denkbar.

NO<sup>•</sup> ist in Nieren diabetischer Tiere nicht an der Regulation der ecSOD beteiligt. Das zeigen die Aktivitätsbestimmungen in Ratten nach L-NAME-Fütterung bzw. in eNOS k.o. Mäusen. In Nieren STZ-diabetischer Ratten konnte nach Blockieren der NOS kein Unterschied in der Aktivität im Vergleich zu Tieren ohne L-NAME-Fütterung festgestellt werden. Lediglich in den Nieren von Kontrolltieren wurde eine verringerte ecSOD-Aktivität nach Gabe von L-NAME beobachtet, was eine Regulation der ecSOD durch NO<sup>•</sup> unter normoglycämischen Bedingungen nahe legt. Ein ähnlicher Befund konnte auch nach Untersuchung von eNOS knock out Mäusen konstatiert werden. Bei den Mäusen war allerdings auch in Kontrolltieren kein Unterschied zwischen Wildtypgenom und homozygotem eNOS knock out Genom bezüglich einer veränderten ecSOD-Aktivität erkennbar. Diese Ergebnisse unterstützen die *in vitro* Befunde, dass NO<sup>•</sup> lediglich unter normoglycämischen Bedingungen an der Modulation der ecSOD beteiligt ist.

Die klinische Relevanz dieser Studien ergibt sich aus der Beobachtung, dass derzeit bei 50 % aller Patienten, die einer Nierentransplantation zugeführt werden, ein manifester Diabetes diagnostiziert wird<sup>160</sup>. Die der Transplantation zugrunde liegende Nephropathie ist ein Syndrom, was durch Bluthochdruck, Proteinurie und fortschreitende Niereninsuffizienz gekennzeichnet ist<sup>161</sup> und in der terminalen Phase eine schwerwiegende, letale Komplikation diabetischer Patienten darstellt.

Als weiteres überwiegend mikrovaskuläres Gewebe wurden die **Herzen** diabetischer Ratten 3 Wochen und 16 Wochen nach STZ-Injektion untersucht. Die Vorversuche *in vitro* und die Tatsache, dass auch *in vivo* die NAD(P)H-Oxidase, die entscheidend zur gesteigerten Superoxidradikalproduktion beiträgt, im Diabetes mellitus vermehrt exprimiert wird<sup>162</sup>, lassen vermuten, dass dadurch auch im Herzen die ecSOD hochreguliert wird. Jedoch konnte durch eigene Untersuchungen im Gesamtherzhomogenat eine verringerte Aktivität der extrazellulären Superoxiddismutase sowohl nach 3 Wochen als auch nach 16 Wochen nachgewiesen werden. Dabei unterschied sich sowohl mRNA- als auch Proteinexpression der ecSOD diabetischer Ratten nicht zu der Expression in Kontrolltieren. Hier scheinen spezifische Effekte eines längerfristigen Diabetes vorzuliegen, die letztendlich zu einer Inaktivierung des Enzyms führen können. Eine mögliche Erklärung für die Enzyminaktivierung könnte auch hier die Glycosylierung der katalytischen Domäne darstellen, wie sie bereits für die Inaktivierung in Nieren angedeutet wurde. Ein weiterer Ansatz, um die verminderte Aktivität in diabetischen Tieren zu erklären, wäre eine möglicherweise organspezifische Regulation der ecSOD durch NO<sup>•</sup> trotz diabetischer Stoffwechsellage. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Befunde, dass in Herzen von Ratten nach Gabe des NOS-Inhibitors L-NAME eine verringerte ecSOD-Aktivität im Vergleich zu Tieren ohne L-NAME-Fütterung gemessen wurde. Dies spricht für eine mögliche Regulation der ecSOD durch Stickstoffmonoxid in Rattenherzen, da die verringerte Aktivität nach Blockade der NOS sowohl in Herzen von Kontrolltieren als auch von diabetischen Tieren nachgewiesen wurde. Eine verringerte Aktivität wurde auch in Herzen von eNOS knock out Mäusen gefunden. Die Inaktivierung von NO<sup>•</sup> im Diabetes mellitus erfolgt wahrscheinlich über reaktive Sauerstoffintermediate, wie bereits *Rösen et al.* und *Stockklauser-Färber et al.* vermuteten<sup>19;34;163</sup>.

Dass eine mögliche Regulation durch verminderte NO<sup>•</sup>-Konzentrationen eher erfolgt als durch die vermehrt vorliegende Sauerstoffradikale, legen auch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten nahe (Peroxynitritbildung:  $k_m = 6,7 * 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; Dismutation der O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Radikale durch SOD:  $k_m = 3*10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>45;104</sup>, wenn man annimmt, dass in diesem Organ die NO<sup>•</sup>-regulatorischen Effekte in den Vordergrund treten. Daraus ergibt sich im Vergleich zu vorherigen diskutierten Situationen *in vivo* nicht notwendigerweise eine Diskrepanz, da in den hier vorgelegten Versuchsanordnungen Gesamtherzhomogenat verwendet wurde und kein rein vaskuläres Gewebe vorlag. Möglicherweise zeigen sich im Gesamtherzhomogenat Effekte, die auf Veränderungen sowohl in vaskulären Geweben als auch Kardiomyozyten zurückgeführt werden könnten.

Dass die Ergebnisse klinisch bedeutsam sind, basiert auf der Tatsache, dass das kardiovaskuläre Risiko bei Diabetikern um das 3 – 5fache gegenüber Nichtdiabetikern erhöht ist. Dabei besitzt die chronische Hyperglycämie eine unabhängige prädiktive Bedeutung für die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse<sup>3;4;164</sup>.

In den makrovaskulären Strombahnen der **Aorta** zeigt sich, dass unter Inhibition der NO<sup>•</sup>-Synthase die ecSOD sowohl in Aorten von Kontrolltieren als auch von diabetischen Tieren erhöht ist. Das bedeutet, dass bei Defizienz der vasoprotektiven Eigenschaften von NO<sup>•</sup> die ecSOD hochreguliert wird. Möglicherweise wird so durch das fehlende NO<sup>•</sup> der modulierende Einfluss der Sauerstoffradikale auf die ecSOD verstärkt sichtbar. Eine mögliche Steigerung der ecSOD-Aktivität im Plasma könnte auf eine verstärkte Abgabe aus den Gefäßwänden zurückgeführt werden, da ecSOD nach ihrer Bildung in die Umgebung (Interstitialraum, Gefäßlumen) sezerniert wird<sup>74</sup>. Jedoch konnte eine Aktivitätssteigerung der ecSOD im Plasma nicht beobachtet werden. Dass durch die Inhibition der NOS die ecSOD-modulierenden Eigenschaften der ROS sichtbar sind, kann auch auf das Ergebnis gestützt werden, dass die Aktivitätserhöhung nach L-NAME-Gabe in den Aorten der diabetischen Ratten stärker ausgeprägt ist als in den Aorten der Kontrolltiere, da bekanntermaßen im Diabetes vermehrt Sauerstoffstress entsteht. Diese Ergebnisse weisen auch für das Aortengewebe auf eine Regulation der ecSOD durch Sauerstoffradikale hin. Der durch die *in vitro* Versuche postulierte Ansatz, dass die NADPH-Oxidase-assoziierte ROS-Produktion zu einer Hochregulation der ecSOD führt, kann auch für die *in vivo* konstatierten Beobachtungen angenommen werden.

Frühere Arbeiten unterstützen diese These, da sie eine PKC-abhängige Stimulation der NADPH-Oxidase in Aorten beschreiben, aus der eine vermehrte Generierung von Sauerstoffradikalen resultiert<sup>165</sup>.

Allerdings konnte bei fehlender NOS-Inhibition sowohl nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen als auch nach 16 Wochen kein Unterschied zwischen Aorten von Kontrolltieren und diabetischen Tieren nachgewiesen werden. Der fehlende Unterschied in der mRNA-Expression spricht dafür, dass die Regulation der ecSOD nicht auf transkriptionaler Ebene, sondern vielmehr auf posttranslationalem Niveau erfolgt. Dabei sind unter Umständen die für eine längerfristige diabetische Stoffwechsellage spezifischen Veränderungen bedeutsam. Diese Schlussfolgerung basiert auf den Befunden, dass ein Unterschied in der Aktivität aus Aorten von diabetischen zu nicht-diabetischen Tieren fehlt. Eine mögliche ROS-medierte Aktivitätssteigerung könnte unter Umständen nicht erfasst werden, da das Enzym bedingt durch den Diabetes einer Modulation, z.B. Glycosylierung, unterliegt, was eine geringere Bindungsaffinität an die Zelloberflächen bewirkt. Parallel dazu könnte ein vermehrtes "Auswaschen" des Enzyms aus dem Gefäßbett aufgrund einer diabetesassoziierten erhöhten vaskulären Permeabilität die fehlenden Unterschiede in der Aktivitätsbestimmung im vaskulären Gewebe erklären. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von *Adachi et al.*, die im Diabetes sowohl eine verringerte Bindungsaffinität als auch einen "Auswascheffekt" der ecSOD aus dem Gefäßbett beschrieben<sup>166</sup>.

Dass die ecSOD auch möglicherweise von klinischer Bedeutung ist, kann verdeutlicht werden durch Befunde, die eine im Diabetes verstärkt beobachtete Transienz der endothelialen Vasorelaxation durch SOD verbessern konnten<sup>167</sup>. Die zuvor registrierte verstärkt transiente Vasorelaxation wurde dabei auf das Vorliegen von Superoxidradikalen zurückgeführt, die in der Lage sind  $\text{NO}^\bullet$  zu quenchen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Befunde und ihre Bedeutung festhalten:

Die nach 3 Wochen in den Nieren diabetischer Tiere gefundene *Up-Regulation* der ecSOD stellt möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus dar, der mit den *in vitro* Befunden einhergeht. Die Niere scheint somit in früheren Stadien des Diabetes sensitiv gegenüber oxidativem Stress zu reagieren und ist vermutlich durch die erhöhte ecSOD-Aktivität geschützt. Bei der nach 16 Wochen Diabetesdauer beobachteten *Down-Regulation* der ecSOD in Nieren diabetischer Ratten kommen vermutlich sekundäre, für einen längerfristigen Diabetes spezifische Effekte zum Tragen, die zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Der damit einhergehende Verlust des antioxidativen Schutzes unterstützt eine Progression der Nephropathie. Insgesamt erfolgt aber auch hier die Regulation unter hyperglycämischen Stoffwechsellagen unabhängig vom Vorliegen von Stickstoffmonoxid.

Die sowohl nach 3 als auch nach 16 Wochen beobachtete Verminderung der ecSOD-Aktivität in Herzen diabetischer Ratten weist auf eine Inaktivierung des Enzyms hin. Damit ergibt sich keine Übereinstimmung zu den *in vitro* postulierten Mechanismen. Ursache könnten hier andere Effekte sein, die erst nach einem längerfristigen Diabetes von 3 bzw. 16 Wochen auftreten. Somit besitzt das Herz keinen ausreichenden Schutz gegenüber oxidativem Stress, was die Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse begünstigt. Die an dieser Stelle postulierte NO<sup>•</sup>-abhängige Regulation ist jedoch nicht zwangsläufig auf das vaskuläre Gewebe zurückzuführen.

Die in Aortengewebe gefundenen Ergebnisse deuten auf eine posttranslationale Modifikation des Enzyms hin, da die mRNA unbeeinflusst von der diabetischen Stoffwechsellage blieb. Dass auch in der Aktivität kein Unterschied zwischen Diabetes und Kontrolle beobachtet werden konnte, lässt sich möglicherweise über pathophysiologische Veränderungen des Aortengewebes im Diabetes mellitus erklären. Die Regulation erfolgt unabhängig von NO<sup>•</sup>, aber in diesem vaskulären Gewebe ist die durch *in vitro* Versuche aufgestellte Hypothese der ecSOD-Regulation möglich, da unter Inhibition der NOS eine Hochregulation der ecSOD-Aktivität nachgewiesen wurde. Möglicherweise wurde so ein ROS-abhängiger regulatorischer Mechanismus demaskiert. Insgesamt ist der antioxidative Schutz der Aorta defizitär, was die Bildung atherosklerotischer Veränderungen unterstützt.

Alle Ergebnisse weisen jedoch auf eine essentielle Rolle der ecSOD hin, da das Fehlen dieses Enzyms die antioxidative Kapazität der Gefäße mindert, wodurch schwerwiegende ROS-medierte vaskuläre Komplikationen resultieren.





## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

---



Es ist bekannt, dass die Erkrankung des Diabetes mellitus einhergeht mit einem verstärkt auftretenden oxidativen Stress. Dieser beeinträchtigt die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) und trägt so zu einer eingeschränkten Vasorelaxation bei. Gegenstand dieser Dissertation war es, die Modulation der extrazellulären Superoxid-dismutase (ecSOD) unter Einfluss der Hyperglycämie bzw. des Diabetes mellitus zu untersuchen. EcSOD stellt aufgrund der Lokalisation *in vivo* zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur, wo es an Proteoglycane und Heparansulfate der Zellmatrix bindet, einen wichtigen antioxidativen Schutzmechanismus vor Sauerstoffradikalen dar und trägt so zur Erhaltung der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im Extrazellularraum bei. In früheren funktionellen Studien konnte die Relevanz des Enzyms belegt werden, da nach Hemmung der ecSOD eine endotheliale Dysfunktion in Aorten von Ratten nachgewiesen wurde.

Untersuchungen an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen unter Einsatz von NOS-Inhibitoren und NO<sup>•</sup>-Donatoren zeigen, dass *in vitro* die Expression und Aktivität der ecSOD durch NO<sup>•</sup> reguliert wird. Dieser Mechanismus ist nur unter normo- nicht jedoch unter hyperglycämischen Bedingungen wirksam. Von essentieller Bedeutung ist der Befund, dass die ecSOD durch das vermehrte Vorliegen von Sauerstoffradikalen reguliert wird. Die Bedeutung ergibt sich daraus, dass es unter Hyperglycämie zu einer massiven Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten kommt, wie durch DCF-Färbung an RASMC nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Hyperglycämie die Proteinkinase C aktiviert, und diese Aktivierung der PKC eine notwendige Voraussetzung für die vermehrte Expression der ecSOD ist. Es wurde so erstmals gezeigt, dass es in einer Kultur von glatten Muskelzellen zu einer gesteigerten Radikalproduktion aufgrund hoher Glucosekonzentrationen kommt, die eine erhöhte ecSOD-Aktivität medieren. Damit ist für die Hyperglycämie die Reaktionsfolge denkbar: Hyperglycämie > Aktivierung der Proteinkinase C > Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (evtl. über Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase) > ecSOD-Expression.

In anschließenden Versuchen am etablierten und gut charakterisierten Tiermodell der STZ-diabetischen Ratte sollte untersucht werden, ob es sich bei der Hochregulation der ecSOD, wie sie im Zellmodell gezeigt wurde, um eine Adaption an kurzfristige hyperglycämische Konditionen handelt, wie sie z.B. postprandial vorliegen, oder ob sich die ecSOD in ihrer Aktivität und Expression längerfristig an die Stoffwechselsituation anpasst.

*In vivo* wurde eine organspezifische, komplexe Modulation der ecSOD nachgewiesen. Insgesamt scheint hier eine Überlagerung von altersabhängiger Regulation und den Auswirkungen einer längerfristigen diabetischen Stoffwechsellage vorzuliegen, was sich tendenziell in einer Erniedrigung der ecSOD-Aktivität äußert. Damit vermindert sich die antioxidative Kapazität der vaskulären Zellen, was letztlich der diabetesassoziierten Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion Vorschub leistet.

Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass die ecSOD eine große klinische Bedeutung besitzt, da sie an dem Ausmaß des durch Hyperglycämie induzierten oxidativen Stress entscheidend mit beteiligt ist. Ihr Fehlen ist an der Auslösung schwerwiegender ROS-medierter vaskulärer Komplikationen beteiligt. Daher ergibt sich mit der ecSOD eine interessante Zielstruktur weiterer Forschungen, da dieses Enzym auch für die Behandlung diabetischer Patienten eine weitere Option darstellt, um die mit dieser Erkrankung assoziierten Gefäßschäden zu verhindern. Vor allem im Hinblick auf andere therapeutisch genutzte Antioxidantien wie Vitamin E ergibt sich hier eine interessante Alternative, da klinische Studien in der Vergangenheit keinen Nutzen von Vitaminen in physiologisch zugeführten Mengen belegen konnten.





## **7 LITERATURVERZEICHNIS**

---



1. Mehnert H, Standl E, Usadel KH. Diabetologie in Klinik und Praxis. 2001. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
2. Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. 1994. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
3. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993;329:977-986.
4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998;352:837-853.
5. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;328:1676-1685.
6. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-1321.
7. Giannattasio C, Failla M, Piperno A, Grappiolo A, Gamba P, Paleari F, Mancina G. Early impairment of large artery structure and function in type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1999;42:987-994.
8. Weidmann P, Beretta-Piccoli C, Keusch G, Gluck Z, Mujagic M, Grimm M, Meier A, Ziegler WH. Sodium-volume factor, cardiovascular reactivity and hypotensive mechanism of diuretic therapy in mild hypertension associated with diabetes mellitus. *Am J Med.* 1979;67:779-784.
9. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 2001;37:1053-1059.
10. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev.* 2001;22:36-52.
11. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:1078-1087.
12. Town MH, Schillinger E, Speckenbach A, Prior G. Identification and characterisation of a prostacyclin-like receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analogue, ciloprost, as radioactive ligand. *Prostaglandins.* 1982;24:61-72.
13. Cowan DB, Langille BL. Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:94-100.
14. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 1996;33:181-194.
15. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100:2153-2157.

16. Rosen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *J Kardiol.* 2002;9:556-562.
17. Cohen RA. Dysfunction of Vascular Endothelium in Diabetes Mellitus. *Circulation.* 1993;87:V-67-V-76.
18. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* 1993;42:1017-1025.
19. Rosen P, Ballhausen T, Bloch W, Addicks K. Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic rat heart: influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia.* 1995;38:1157-1168.
20. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
21. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9265-9269.
22. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
23. Rao GH, Krishnamurthi S, Raj L, White JG. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem Med Metab Biol.* 1990;43:271-275.
24. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:4651-4655.
25. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J.* 1994;21:91-97.
26. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1992;267:18148-18153.
27. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78:915-918.
28. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-974.
29. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.
30. Pfeiffer S, Mayer B, Hemmens B. Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38:1714-1731.

31. Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol*. 1997;82:423-452.
32. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation*. 1997;95:1783-1790.
33. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1997;96:25-28.
34. Stockklauser-Farber K, Ballhausen T, Laufer A, Rosen P. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1535:10-20.
35. Ceriello A, Quatraro A, Caretta F, Varano R, Giugliano D. Evidence for a possible role of oxygen free radicals in the abnormal functional arterial vasomotion in insulin dependent diabetes. *Diabete Metab*. 1990;16:318-322.
36. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-571.
37. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw*. 1998;9:697-698.
38. Griending KK, Ushio-Fukai M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med*. 1998;132:9-15.
39. Lee HS, Son SM, Kim YK, Hong KW, Kim CD. NAD(P)H oxidase participates in the signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2003;72:2719-2730.
40. Lynch SM, Frei B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 1993;34:1745-1753.
41. Graier WF, Posch K, Wascher TC, Kostner GM. Role of superoxide anions in changes of endothelial vasoactive response during acute hyperglycemia. *Horm Metab Res*. 1997;29:622-626.
42. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*. 1992;263:H321-H326.
43. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 1994;16:383-391.
44. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-9.

45. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18:195-199.
46. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.
47. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105:1656-1662.
48. Gautier C, Negrerie M, Wang ZQ, Lambry JC, Stuehr DJ, Collin F, Martin JL, Slama-Schwok A. Dynamic regulation of the inducible nitric-oxide synthase by NO: comparison with the endothelial isoform. *J Biol Chem.* 2004;279:4358-4365.
49. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997;416:15-18.
50. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 2001;108:1341-1348.
51. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1998;101:160-169.
52. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes.* 2001;50:1495-1504.
53. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-820.
54. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-1476.
55. Kitada M, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Araki S, Kashiwagi A, Haneda M. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2003;52:2603-2614.
56. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001;17:189-212.
57. Rosen P, Du X, Sui GZ. Oxidative Stress in Diabetes: Why Does Hyperglycemia Induce the Formation of Reactive Oxygen Species? In: Antioxidants in Diabetes Management. Packer L, Rosen P, Tritschler HJ, King G, Azzi A, eds. 2000. Marcel Dekker, Inc., New York.

58. Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:S250-S253.
59. Singal PK, Bello-Klein A, Farahmand F, Sandhawalia V. Oxidative stress and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol.* 2001;498:213-220.
60. Marklund SL. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett.* 1985;184:237-239.
61. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973;248:4793-4796.
62. Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest.* 1986;55:363-371.
63. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049-6055.
64. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10405-10409.
65. Forman HJ, Fridovich I. On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *J Biol Chem.* 1973;248:2645-2649.
66. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:7634-7638.
67. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984;222:649-655.
68. Karlsson K, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem J.* 1988;255:223-228.
69. Oury TD, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J.* 1996;317 ( Pt 1):51-57.
70. Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaefer LM, Valnickova Z, Oury TD. Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275:542-548.
71. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:5219-5222.
72. Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, Edlund T. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:6340-6344.

73. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* 1984;74:1398-1403.
74. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032-2036.
75. Marklund SL. Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 1990;186:260-265.
76. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:957-965.
77. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol.* 1991;260:C219-C225.
78. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest.* 1996;75:617-636.
79. Schmitz, V. Untersuchungen zum Einfluss von Experimentellem Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität. 2003. Deutsches Diabetes Forschungsinstitut Düsseldorf. 18-12-2003.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
80. Lynch SM, Frei B, Morrow JD, Roberts LJ, Xu A, Jackson T, Reyna R, Klevay LM, Vita JA, Keaney JF, Jr. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2975-2981.
81. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995;95:187-194.
82. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995;377:239-242.
83. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev.* 1970;22:485-518.
84. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
85. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971;44:276-287.

86. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem.* 1989;179:8-18.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
88. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
89. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 2003;26:1589-1596.
90. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000;17:171-180.
91. Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:315-335.
92. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002;55:239-249.
93. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993;16:434-444.
94. Chen YT, Vaccarino V, Williams CS, Butler J, Berkman LF, Krumholz HM. Risk factors for heart failure in the elderly: a prospective community-based study. *Am J Med.* 1999;106:605-612.
95. Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, Fujii J, Suzuki K, Kayanoki Y. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes.* 1996;45 Suppl 3:S81-S83.
96. Wilson GL, Leiter EH. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;156:27-54.
97. Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1992;17:9-20.
98. Makino N, Dhalla KS, Elimban V, Dhalla NS. Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol.* 1987;253:E202-E207.
99. Cassis LA. Downregulation of the renin-angiotensin system in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol.* 1992;262:E105-E109.
100. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981;41:2786-2790.

101. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int.* 1982;21:889-895.
102. Mauer SM. Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1994;45:612-622.
103. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta.* 1982;126:41-51.
104. Forman HJ, Fridovich I. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys.* 1973;158:396-400.
105. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 1968;243:5753-5760.
106. McPhail LC, DeChatelet LR, Johnston RB, Jr. Generation of chemiluminescence by a particulate fraction isolated from human neutrophils. Analysis of molecular events. *J Clin Invest.* 1979;63:648-655.
107. Marklund SL. Direct Assay with potassium superoxide. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Greenwald R, ed. 1985. CRC Press, Boca Raton, Florida.
108. Elstner EF, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem.* 1976;70:616-620.
109. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem.* 1984;142:290-296.
110. Beyer WF, Jr., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* 1987;161:559-566.
111. Rotilio G, Bray RC, Fielden EM. A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.* 1972;268:605-609.
112. Beem KM, Rich WE, Rajagopalan KV. Total reconstitution of copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1974;249:7298-7305.
113. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000;105:1631-1639.
114. Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract Suppl.* 2002;51-58.
115. Ceriello A, Quagliario L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, Marra G, Tonutti L, Taboga C, Motz E. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care.* 2002;25:1439-1443.

116. Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1992;267:6696-6701.
117. Stralin P, Marklund SL. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2000;151:433-441.
118. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science.* 1988;240:1546-1548.
119. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest.* 1992;90:439-446.
120. Abordo EA, Westwood ME, Thornalley PJ. Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett.* 1996;53:7-13.
121. Stralin P, Marklund SL. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem J.* 1994;298 ( Pt 2):347-352.
122. Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, Kostner GM. High D-glucose-induced changes in endothelial Ca<sup>2+</sup>/EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes.* 1996;45:1386-1395.
123. Du X, Stocklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med.* 1999;27:752-763.
124. Ceriello A, dello RP, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes.* 1996;45:471-477.
125. Sharpe PC, Yue KK, Catherwood MA, McMaster D, Trimble ER. The effects of glucose-induced oxidative stress on growth and extracellular matrix gene expression of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia.* 1998;41:1210-1219.
126. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1994;266:H2568-H2572.
127. Griendling KK, Miniieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74:1141-1148.
128. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane

- NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-1923.
129. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:23317-23321.
130. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999;99:2027-2033.
131. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:11059-11063.
132. Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M, Higashi S, Feener EP, King GL. Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol.* 1994;267:E369-E379.
133. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes.* 1994;43:1122-1129.
134. Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest.* 1989;83:1667-1675.
135. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest.* 1991;87:1643-1648.
136. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science.* 1996;272:728-731.
137. Kuroki T, Inoguchi T, Umeda F, Ueda F, Nawata H. High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes.* 1998;47:931-936.
138. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998;47:859-866.
139. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404:787-790.

140. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49:1939-1945.
141. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401:79-82.
142. Brady TC, Chang LY, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol*. 1997;273:L1002-L1006.
143. Wiggans RG, Woolley PV, Macdonald JS, Smythe T, Ueno W, Schein PS. Phase II trial of streptozotocin, mitomycin-C and 5-fluorouracil (SMF) in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer*. 1978;41:387-391.
144. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294:284-286.
145. Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*. 1988;37:213-216.
146. Steiner H, Oelz O, Zahnd G, Foresch ER. Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats. *Diabetologia*. 1970;6:558-564.
147. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969;48:2129-2139.
148. Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev*. 1992;44:103-150.
149. Tam ES, Ferguson DG, Bielefeld DR, Lorenz JN, Cohen RM, Pun RY. Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell Calcium*. 1997;21:143-150.
150. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol*. 1994;266:H1153-H1161.
151. Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. *Clin Chim Acta*. 1994;229:123-131.
152. Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Fukatsu A, Sakuma M, Futenma A, Kakumu S. Protective role of extracellular superoxide dismutase in hemodialysis patients. *Nephron*. 2000;84:218-223.

153. Sechi LA, Ceriello A, Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1997;40:23-29.
154. Brands MW, Bell TD, Gibson B. Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide. *Hypertension*. 2004;43:57-63.
155. Schnackenberg CG, Wilcox CS. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int*. 2001;59:1859-1864.
156. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia*. 2003;46:1428-1437.
157. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*. 1987;36:1014-1018.
158. Reddi AS, Bollineni JS. Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235:598-601.
159. Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycosylated sites. *J Biol Chem*. 1987;262:16969-16972.
160. Schwenger V, Mussig C, Hergesell O, Zeier M, Ritz E. [Incidence and clinical characteristics of renal insufficiency in diabetic patients]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126:1322-1326.
161. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341:1127-1133.
162. Rosen P, Du X, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem*. 1998;188:103-111.
163. Rosen P, Ballhausen T, Stockklauser K. Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31 Suppl:S143-S155.
164. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:854-865.
165. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88:E14-E22.

- 
166. Adachi T, Ohta H, Hirano K, Hayashi K, Marklund SL. Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem J.* 1991;279 ( Pt 1):263-267.
  167. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 1991;261:H1086-H1094.



## **8 ANHANG**

---



---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGE	advanced glycation endproducts
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
BIM	Bisindolylmaleimid
BLU	Boehringer Light Units
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy-DNA
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CM H <sub>2</sub> DCF-DA (DCF)	Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
ConA	Concanavalin A
DAF-DA	4,5-Diaminofluorescein-diacetat
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETC	Diethyldithiocarbamat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
ecSOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO <sup>•</sup> -Synthase
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid = Riboflavin-5'-monophosphat
GAPDH	Glyceralphosphatdehydrogenase
GFAT	Glucosamin:Fructose-6-phosphat Amidotransferase

---

GSH	Glutathion
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HG	hohe Glucose (= 30 mM Glucose)
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cells (Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene)
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus (insulinpflichtiger Diabetes)
iNOS	induzierbare NO <sup>•</sup> -Synthase
KG	Körpergewicht
k <sub>m</sub>	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MP-Wasser	Millipore-Wasser
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
L-NAME	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin-methylester
NBT	Nitrotetrazoliumblau
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus (nicht insulinpflichtiger Diabetes)
L-NNA	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin
NO <sup>•</sup>	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase (NO <sup>•</sup> -Synthase)
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichteeinheit
3-OMG	3-O-Methylglucose
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonfluorid
RASMC	Rat Aortic Smooth Muscle Cell (glatte Muskelzellen aus Rattenaorta)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	reverse Transkription/Reverse Transkriptase

---

SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SNAP	racemisches <i>S</i> -Nitroso- <i>N</i> -acetyl-penicillamin
SOD	Superoxiddismutase
ssRNA	single strand ribonucleic acid (einzelsträngige RNA)
STZ	Streptozotocin ( <i>N</i> -[Methylnitrosocarbamoyl]- $\alpha$ -D-Glucosamin)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	Tris-Natriumchlorid-Tween
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylendiamin
TG	Triglyceride
TGF	tissue growth factor (Gewebewachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTFA	Thenoyltrifluoraceton
VCAM	vascular cell adhesion molecule
vs.	versus (gegenüber; im Vergleich zu)
WT	Wildtyp
ww	wet weight (Feuchtwicht)
XOD	Xanthinoxidase

## Größen und Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
M	Molarität
min	Minute
m/v	Konzentrationsangabe in Masse pro Volumen
U	Unit(s) (Einheiten)
v/v	Konzentrationsangabe in Volumen pro Volumen
w	Woche

---

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abb. 2.1	Vasorelaxierende Wirkung von Stickstoffmonoxid und Inaktivierung von NO <sup>•</sup> durch Superoxidradikale .....	5
Abb. 2.2	Biosynthese von Stickstoffmonoxid.....	6
Abb. 2.3	Zusammenhang zwischen Hyperglycämie und der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion.....	10
Abb. 3.2	Reaktionsschema von DAF-DA mit NO.....	32
Abb. 3.3	Strukturformel MitoTracker Red CMXRos™ .....	33
Abb. 3.4	Reaktionsschema für den SOD-Assay .....	39
Abb. 4.1	Charakterisierung glatter Muskelzellen aus Rattenaorta (RASMC).....	49
Abb. 4.2	Nachweis der PCR-Produkte für ecSOD in verschiedenen Zelltypen.....	50
Abb. 4.3	Aktivität der ecSOD nach Kultivierung der RASMC mit verschiedenen Konzentrationen FCS im Versuchsmedium.....	51
Abb. 4.4	ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit Mannitol und Glucose.....	53
Abb. 4.5	Proteinexpression der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit Mannitol und Glucose .....	54
Abb. 4.6	DCF-Färbung von RASMC .....	55
Abb. 4.7	Doppelfärbung der RASMC mit Mitotracker und DCF.....	56
Abb. 4.8	ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit .....	57
	Radikalbildnern .....	
Abb. 4.9	ecSOD Protein-Expression im Medium nach Inkubation der RASMC mit Radikalbildnern .....	58
Abb. 4.10	Aktivität der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit Inhibitoren des Glucosestoffwechsels.....	60
Abb. 4.11	ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit inflammatorischen Cytokinen .....	61
Abb. 4.12	ecSOD Protein-Expression im Medium nach Inkubation der RASMC mit inflammatorischen Cytokinen .....	62
Abb. 4.13	ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit PKC regulierenden Substanzen.....	64
Abb. 4.14	ecSOD-Protein im Medium nach Inkubation der RASMC mit PKC regulierenden Substanzen.....	65

---

Abb. 4.15	Färbung der RASMC nach Inkubation mit Glucose, Apocynin und TTFA .....	66
Abb. 4.16	DAF-Färbung von RASMC .....	68
Abb. 4.17	ecSOD-Aktivität im Medium nach Inkubation der RASMC mit SNAP und Nitroarginin .....	69
Abb. 4.18	Expression der ecSOD im Medium nach Inkubation der RASMC mit SNAP und Nitroarginin .....	70
Abb. 4.19	Strukturformel von Streptozotozin .....	73
Abb. 4.20	Blutglucose und Körpergewicht bei männlichen Wistar-Ratten .....	74
Abb. 4.21	Organgewichte bei Wistar-Ratten .....	75
Abb. 4.22	Ausgewählte Serumparameter bei Wistar-Ratten .....	76
Abb. 4.23	Aktivität der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes .....	77
Abb. 4.24	Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes .....	78
Abb. 4.25	mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen Diabetes .....	79
Abb. 4.26	Aktivität der ecSOD in Rattennieren nach 16 Wochen Diabetes .....	80
Abb. 4.27	Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 16 Wochen Diabetes .....	81
Abb. 4.28	mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren nach 16 Diabetes .....	81
Abb. 4.29	Aktivität der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetes .....	82
Abb. 4.30	Proteinexpression der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen Diabetes .....	83
Abb. 4.31	Proteinexpression der ecSOD in Rattenherzen nach 16 Wochen Diabetes .....	83
Abb. 4.32	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen nach 3 Wochen Diabetes .....	84
Abb. 4.33	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen nach 16 Wochen Diabetes .....	84
Abb. 4.34	Aktivität von ecSOD in Rattenaorten nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetes .....	85
Abb. 4.35	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorten nach 3 Wochen Diabetes .....	86
Abb. 4.36	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorten nach 16 Wochen Diabetes .....	86
Abb. 4.37	ecSOD-Aktivität in Rattennieren 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	88
Abb. 4.38	Proteinexpression der ecSOD in Rattennieren nach 3 Wochen L-NAME-Fütterung .....	89
Abb. 4.39	mRNA-Expression der ecSOD in Rattennieren 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	89
Abb. 4.40	Aktivität der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	90
Abb. 4.41	Protein-Expression der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	91
Abb. 4.42	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenherzen 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	91

---

Abb. 4.43	Aktivität der ecSOD in Rattenaorten 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	92
Abb. 4.44	mRNA-Expression der ecSOD in Rattenaorta 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung .....	93
Abb. 4.45	ecSOD-Aktivität im Plasma von Ratten nach 3 Wochen L-NAME-Fütterung ...	94
Abb. 4.46	Protein-Expression der ecSOD im Plasma 3 Wochen nach L-NAME-Fütterung	94
Abb. 4.47	mRNA-Expression der ecSOD in Nieren von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens .....	96
Abb. 4.48	ecSOD-Aktivität in Nieren von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens.....	97
Abb. 4.49	mRNA-Expression der ecSOD in Herzen von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens .....	98
Abb. 4.50	ecSOD-Aktivität in Herzen von Mäusen des Wildtyps und nach Deletion des eNOS-Gens.....	98
Abb. 5.1	Übersicht der ecSOD-regulierenden Stoffwechselwege .....	115
Tab. 3.1	Sequenzen der spezifischen Primer für die ecSOD- und GAPDH-mRNA in Ratte und Maus .....	44
Tab. 4.1	Charakterisierung der Tiergruppen im Fütterversuch .....	87
Tab. 4.2	Zusammenfassung der Veränderungen der ecSOD unter Einfluss von L-NAME .....	87
Tab. 4.3	Zusammenfassung der Veränderungen der ecSOD nach eNOS knock out .....	95
Tab. 5.1	Übersicht der gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der SOD-Aktivität	105

---

## PUBLIKATIONEN

### Orginalarbeiten

Rösen P, C. **Bellin**. (2004). Diabetes und oxidativer Stress. **Blickpunkt DER MANN** 2(3): 23-30

### Abstracts

**Bellin C**, Schmitz V, Rösen P. (2003). Expression und Regulation der extrazellulären Superoxiddismutase im Diabetes mellitus. (Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft)

Schmitz V, **Bellin C**, Rösen P. (2003). Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität in Ratten. (Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft)

**Bellin C**, Schmitz V, Rösen P. (2003). Expression der extrazellulären Superoxiddismutase in mikro- und makrovaskulärem Gewebe von STZ-diabetischen Ratten **Diabetes und Stoffwechsel** 12: [Suppl 1]:8

Schmitz V, **Bellin C**, Rösen P (2003). Diabetes induziert eine Up-Regulation der VASP-Proteine im Streptozotozin-Diabetes. **Diabetes und Stoffwechsel** 12: [Suppl 1]:7

**Bellin C**, Schmitz V, Bloch W, Kasper M, Rösen P (2004). Die Rolle des oxidativen Stress in der Entwicklung von Nephropathien bei Streptozotozin (STZ)-diabetischen Ratten. **Diabetes und Stoffwechsel** 13: [Suppl 1]:173

**Bellin C**, Schmitz V, Bloch W, Kasper M, Rösen P (2004). Influence of Oxidative Stress in Kidneys of Streptozotocin diabetic Rats. **Diabetes** 53: [Suppl 2]:A198

**Bellin C**, Schmitz V, Rösen P. (2004). Role of Extracellular Superoxide Dismutase in Streptozotocin (STZ)-diabetic Rats. Diabetes. **Diabetes** 53: [Suppl 2]:A496

**Bellin C**, Schmitz V, Rösen P. (2004). Role of Nitric Oxide in Regulation of Extracellular Superoxide Dismutases in Diabetes Mellitus. **Diabetologia** 47: [Suppl 1]:A45

Schmitz V, **Bellin C**, Rösen P. (2004). The enhanced vasoconstriction in diabetes mellitus is mediated by reduced nitric oxide bioavailability. **Diabetologia** 47: [Suppl 1]:A87

## **STIPENDIEN UND PREISE**

Reisestipendium 39. Jahrestagung der Deutschen Diabetesgesellschaft, Bremen Mai 2003

Reisestipendium 40. Jahrestagung der Deutschen Diabetesgesellschaft, Hannover Mai 2004

Posterpreis 40. Jahrestagung der Deutschen Diabetesgesellschaft, Hannover Mai 2004

---

## LEBENS LAUF

**Name:** Christiane Bellin  
**Geboren am:** 20. Februar 1974  
**In:** Mönchengladbach

### Schul Ausbildung

1980 – 1984 Katholische Grundschule Willich – Neersen  
1984 – 1993 Städt. Gymnasium Mönchengladbach – Neuwerk  
Juni 1993 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

April 1994 – Mai 2000 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Mai 2000 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)  
Juni 2000 – Mai 2001 Praktisches Jahr in der Hirsch-Apotheke, Esens (Ostfriesland)  
Juni 2001 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)  
Juli 2001 Erlangung der Approbation als Apothekerin

**Wissenschaftliche Tätigkeit**

Juli 2001 – August 2001

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

November 2001

Beginn der Dissertation am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Deutschen Diabetes Zentrums; Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Rösen mit dem Thema "Untersuchungen zum Einfluss des Diabetes mellitus auf die extrazelluläre Superoxiddismutase".

November 2001 – Oktober 2004

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Deutschen Diabetes Zentrums; Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

November 2002

Beginn der Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation durch die Bundesapothekerkammer

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen, die mich unterstützt haben, dass diese Arbeit ein Erfolg wurde. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt:

**Daniella Herzfeld** für gute Stimmung, Anteilnahme bei allen größeren und kleineren Glücksmitteilungen und Katastrophen, sowie für die gute Anleitung und Betreuung im Umgang mit Zellen und deren Kultur;

**Antonia Osmers** für die stets tatkräftige Unterstützung bei proteinbiochemischen Methoden und ihre große Hilfsbereitschaft in den vergangenen drei Jahren;

**Verena Schmitz** gebührt besonderer Dank. Sie ist mir eine sehr gute Freundin geworden und ist auch ursächlich daran beteiligt, dass ich den Weg in diese Arbeitsgruppe fand. Danke für Aufmunterung, gute Laune und Unterstützung vor allem in Phasen der Arbeit, wo alles nicht ganz rund lief, sowie für ein immer offenes Ohr, auch in der Ferne;

Der **Arbeitsgruppe** um **Prof. Eckel** für den regen verbalen Austausch und auch für die praktischen Hilfen im Laboralltag;

**Mathias Uhlig** für sein immenses "Kollateralwissen", gute Unterhaltung sowie für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung, wenn es sich im Schrifttum mal wieder knubbelte;

**Robert Schwenk** für seine unterhaltsamen Erzählungen vom Leben in einer Großfamilie und seine fachkundigen Hilfestellungen im Labor;

**Sonja Vahsen** für hilfreiche Erklärungen im medizinischen Bereich, für viel Spaß beim Mittagessen und die Bereitschaft immer auch gerne mal ein Bierchen mit trinken zu gehen;

**Katja Rakowski** für sehr nette, amüsante Gespräche, gute Laune und Aufmunterung, wenn's zuletzt mal wieder GANZ schlimm kam;

Den **Mitarbeitern vom Tierbereich** für die Betreuung der vielen Ratten und Mäuse;

**Vor allem danke ich meiner FAMILIE, die mich bis hier hin in jeder Hinsicht, nicht zuletzt auch finanziell, immer unterstütz hat und die mir diese Leistung erst ermöglicht hat, und ich danke meinem Freund CHRISTIAN EBENAU, der diese Doktorarbeit von Anfang an in allen ihren Einzelheiten mitverfolgte, mich aufmunterte, mir auch in der schwierigen Abschlussphase der Arbeit immer neuen Mut machte, und der sich jetzt mit gutem Recht auch "Herr Doktor" nennen darf!**