

Deutsches Diabetes-Zentrum an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Arbeitsgruppe Immun-Pathologie und Immun-Toxikologie
Leiterin: Prof. Dr. med. Helga Gleichmann**

**Differentielle Regulierung antioxidativer Enzyme
durch multiple niedrige Dosen Streptozotocin
im Mikromilieu pankreatischer Inseln
männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Amanda S. Büchau

2005

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

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

Referent: Prof. Dr. med. Helga Gleichmann
Koreferent: Prof. Dr. med. vet. Josef Abel

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann aussprechen, die es mir ermöglicht hat, in ihrer Arbeitsgruppe die vorliegende Dissertation anzufertigen. Insbesondere bedanke ich mich bei ihr für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute und freundliche Betreuung, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und für ihr großes Interesse an meiner Arbeit.

Zudem verdanke ich meiner Doktormutter mein wachsendes Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten, das ich in meiner beruflichen Zukunft weiter verfolgen und fördern möchte. Vielen Dank liebe Helga, ohne dich stünde ich heute nicht hier, wo ich mich befinde.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Josef Abel, aus dem Institut für Umweltmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Ebenso danke ich dem Leiter der klinischen Abteilung, Herrn Prof. Dr. med. W. Scherbaum für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann durchführen zu können.

Ein besonderes Dankeschön gilt unserer Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit: Frau Patricia Schott-Ohly für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung in praktischen Fragen. Frau Nadira Friesen und Herrn Abdelhakim Lgssiar danke ich für ihre tatkräftigen Unterstützungen und ihrem grossen Interesse an meiner Arbeit. Allen möchte ich für die nette und fruchtbare Arbeitsatmosphäre danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vor allem möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern, meinem Opa und meinen Freunden bedanken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben. Vielen lieben Dank.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Streptozotocin.....	1
1.1.1 Vorkommen, Struktur und chemische Eigenschaften.....	1
1.1.2 Hoch-Dosis (HD)-STZ Diabetes-Modell.....	2
1.1.3 Multiple-Niedrig-Dosis (MLD) -STZ Diabetes-Modell.....	2
1.1.4 Pathogenetische Mechanismen des STZ-induzierten Diabetes.....	3
1.1.5 Geschlechtsabhängigkeit in der Diabetespathogenese.....	6
1.1.5.1 Geschlechtsabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes.....	6
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	7
1.2.1 O ₂ ^{•-}	8
1.2.2 H ₂ O ₂	9
1.2.3 •OH.....	11
1.2.4 Bedeutung der ROS.....	12
1.2.5 Rolle von ROS im experimentell induzierten Diabetes.....	13
1.3 Antioxidantien.....	13
1.3.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien.....	14
1.3.1.1 Vitamin A.....	14
1.3.1.2 Vitamin E (Alpha-Tocopherol).....	15
1.3.1.3 Vitamin D (Cholecalciferol).....	16
1.3.1.4 Selen.....	17

	Seite
1.3.1.5	Metallothionein..... 17
1.3.1.6	Thioredoxin..... 18
1.3.2	Enzymatische Antioxidantien..... 19
1.3.2.1	SOD..... 20
1.3.2.1.1	Struktur und Vorkommen..... 20
1.3.2.1.2	Biologische Funktion..... 21
1.3.2.1.3	Prävention des STZ- induzierten Diabetes mit SOD..... 22
1.3.2.2	CAT..... 23
1.3.2.2.1	Struktur und Vorkommen..... 23
1.3.2.2.2	Biologische Funktion..... 23
1.3.2.2.3	Prävention des STZ- induzierten Diabetes mit CAT..... 24
1.3.2.3	GPx..... 24
1.3.2.3.1	Struktur und Vorkommen..... 24
1.3.2.3.2	Biologische Funktion..... 25
1.3.2.3.3	Prävention des STZ- induzierten Diabetes mit GPx..... 25
2.	Fragestellung..... 26
3.	Material und Methoden..... 28
3.1	Versuchstiere und Organe..... 28
3.1.1	Mäuse..... 28
3.1.2	Organentnahme..... 28
3.2	Material und Methoden..... 28

	Seite
3.2.1	Reagenzien..... 28
3.2.2	In-vivo-Behandlung der Mäuse..... 29
3.2.3	Isolierung pankreatischer Inseln und Lebern..... 29
3.2.4	Isolierung der RNA aus pankreatischen Inseln und Lebergewebe..... 30
3.2.5	Spectrophotometrische Bestimmung der RNA..... 31
3.2.6	Synthese komplementärer DNA (cDNA)..... 31
3.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)..... 32
3.2.8	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)..... 34
3.2.9	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte..... 34
3.2.10	Quantitative Analyse der PCR-Produkte..... 35
3.2.11	Statistische Analyse..... 35
4.	Ergebnisse..... 36
4.1	Differentielle mRNA-Expression von CuZnSOD in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ..... 36
4.2	Differentielle mRNA-Expression von MnSOD in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ..... 36
4.3	Differentielle mRNA-Expression von CAT in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ..... 39
4.4	Differentielle mRNA-Expression von GPx1 in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ..... 40
4.5	Differentielle mRNA-Expression von GPx4 in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ..... 41

	Seite
4.6 MLD-STZ hat keinen Effekt auf die mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4 in Lebergewebe männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse.....	41
4.7 Tabellarische Darstellung der mRNA-Ergebnisse.....	46
5. Diskussion.....	48
6. Literaturverzeichnis.....	54
7. Zusammenfassung.....	72

Abkürzungen

3-O-MG	3-O-Methyl-Glucose
5-T-G	5-Thio-D-Glucose
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALX	Alloxan
AP-1	Aktivator Protein 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle
°C	Grad Celsius
CAT	Catalase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
CuZnSOD	Kupfer-Zink-enthaltende Superoxiddismutase
d	Tag
D	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
FBS	Foetales Rinder Serum
Fe	Eisen
g	Gramm
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT2	Glucosetransporter 2
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathionsulfhydryl
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde/Stunden
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HD	Hoch-Dosis
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I	inhibierbar
IFN _γ	Interferon-gamma

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Nitritoxid Synthase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRBH	Krebs Ringer Bicarbonat Hepes
L	Liter
mA	Milli-Ampere
MAF	Makrophagen-aktivierender Faktor
MCP	Makrophagen-chemotaktisches Protein
min	Minuten
MLD	Multiple-Niedrig-Dosis
MnSOD	Mangan-enthaltende Superoxiddismutase
MNU	Methyl-N-Nitrosoharnstoff
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
MT	Metallothionein
μ	mikro- (10^{-6})
N ⁷	Stickstoffatom an Position sieben
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Di-Nucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Di-Nucleotid-Phosphat
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NO [•]	Stickstoffmonoxid
nu/nu	homozygot athymische Mäuse
nu/+	heterozygot euthymische Mäuse
O ⁶	Sauerstoffatom an der Position sechs
O ₂ ^{•-}	Superoxidanionradikal
OD	optische Dichte
[•] OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
ONOOH	Peroxynitritsäure
p	statistisches Signifikanzniveau
PARP	poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
RNA	Ribonucleinsäure
Rnasin	Ribonucleinsäureinhibitor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Kulturmedium
RT	Reverse Transkription
Rtase	Reverse Transkriptase

Sem	Standard error of the mean
SIRS	systemisches inflammatorisches Syndrom
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
Th	T-Helfer
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRX	Thioredoxinreduktase
T-Zellen	thymusabhängige Lymphozyten
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

1. Einleitung

1.1 Streptozotocin

1.1.1 Vorkommen, Struktur und chemische Eigenschaften

Streptozotocin (STZ) ist ein natürlich vorkommendes von *Streptomyces achromogenes* gebildetes Antibiotikum mit einem Molekulargewicht von 265 kDa (Rerup, 1970). Strukturell ist STZ aus einem Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU)-Anteil und einem Glucose-Anteil zusammengesetzt (Abb. 1).

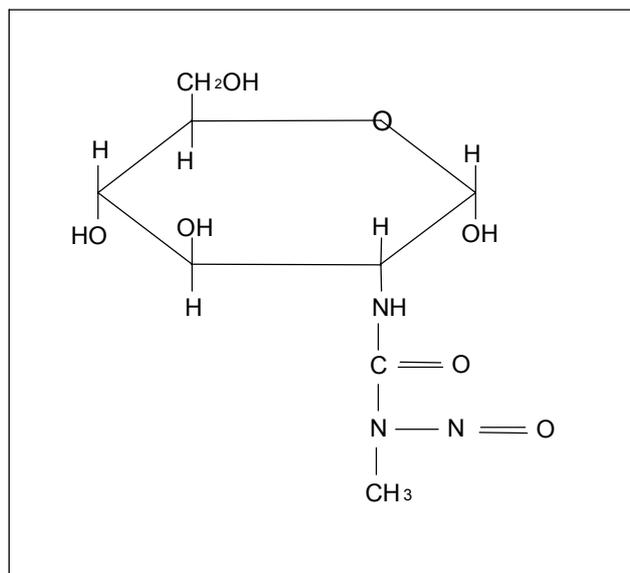


Abb. 1. Strukturformel von Streptozotocin (STZ). STZ ist aus einem Methyl-N-Nitrosoharnstoff- und einem Glucose-Anteil zusammengesetzt.

Seine Verwendung sollte STZ wegen seines MNU-Anteils in der Krebstherapie finden, zeigte jedoch in vorklinischen Studien mit Nagetieren und Hunden eine diabetogene Wirkung (Bell et al., 1989). STZ wird heute daher nur noch bei Insulinomen und bestimmten Carcinoiden als Chemotherapeutikum eingesetzt.

Der Glucose-Anteil steuert STZ relativ selektiv in die Insulin-produzierende β -Zelle, die über toxische Effekte des MNU-Anteils zerstört wird (Wilson und Leiter, 1990; Schnedl et al., 1994; Wang und Gleichmann, 1998). Mit STZ kann in verschiedenen

Tierspezies ein Insulinmangel-Diabetes induziert werden (Rerup, 1970). In Mäusen wurden zwei verschiedene Protokolle etabliert, bei denen jeweils unterschiedliche pathogene Mechanismen beteiligt sind.

1.1.2 Hoch-Dosis (HD)-STZ Diabetes-Modell

Im HD-STZ Diabetes-Modell bewirkt eine einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion einer hohen Dosis STZ (180– 200 mg/kg KG) in Mäusen einen direkten β -zelltoxischen Effekt mit ausgeprägter Nekrose nach 48 - 72 h und nachfolgender permanenter Hyperglycämie ohne vorhergehende Infiltration pankreatischer Inseln mit mononukleären Zellen (Insulitis) (Rossini et al., 1977). Dieses Modell wird heute vorwiegend in Ratten, dagegen nur noch selten in Mäusen angewandt.

1.1.3 Multiple-Niedrig-Dosis (MLD)-STZ Diabetes-Modell

Das MLD-STZ Diabetes-Modell wurde erstmals von Like und Rossini (1976) in männlichen CD1-Mäusen etabliert. Durch multiple i.p. Injektionen von niedrigen Dosen STZ (40 mg/kg KG an 5 aufeinander folgenden Tagen) kann in männlichen Mäusen suszeptibler Stämme ein Diabetes induziert werden. Es werden zunächst subtoxische Effekte auf die β -Zellen und nachfolgend inflammatorische Immunreaktionen mit Insulitis induziert (Klinkhammer et al., 1988; Wilson und Leiter, 1990). Nur durch Kombination dieser beiden Effekte kommt es zur Entwicklung eines MLD-STZ-induzierten Diabetes. Bei den Immunreaktionen handelt es sich um unspezifische inflammatorische Prozesse, die mit der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einhergehen (Mendola et al., 1989; Gille et al., 2002; Friesen et al., 2004) und um T-zellabhängige Immunreaktionen (Klinkhammer et al., 1988; Wilson und Leiter, 1990). Dabei werden STZ-spezifische T-Helfer (Th)1-Lymphozyten aktiviert, die inflammatorische Reaktionen auslösen (Klinkhammer et al., 1988).

Weiterhin wurde gezeigt, dass der MLD-STZ-induzierte Diabetes mit einer Stimulation Th1-typischer pro-inflammatorischer Zytokine und Reduktion Th2-typischer anti-inflammatorischer Zytokine im Mikromilieu der pankreatischen Inseln assoziiert ist (Müller et al., 2002).

Das MLD-STZ Diabetes-Modell ist aufgrund des pathogenen Mechanismus mit Immunreaktionen mehr mit dem humanen Typ-1-Diabetes vergleichbar als das HD-STZ Modell, weil auch beim Menschen als Ursache initiiierende exogene Faktoren mit nachfolgenden T-zellabhängigen Immunreaktionen als Ursache der β -Zellzerstörung angesehen werden (Eisenbarth, 1986).

1.1.4 Pathogenetische Mechanismen des STZ-induzierten Diabetes

STZ zerstört relativ selektiv die β -Zellen in den pankreatischen Inseln. Dieser β -Zelltropismus beruht auf einer Interaktion der β -Zelle mit dem Glucoseanteil des STZ-Moleküls. Über den Glucosetransporter (GLUT) 2 wird STZ in die β -Zelle gesteuert, um über das Nitrosoharnstoffmolekül Schäden zu setzen (Wilson und Leiter, 1990; Schnedl et al., 1994). Weiterhin erwies sich der GLUT2 als präferentielle, wenn nicht sogar selektive Zielstruktur im MLD-STZ-Modell (Wang und Gleichmann, 1998). Die Signifikanz des GLUT2 für die diabetogene Wirkung von STZ wurde dadurch erhärtet, dass die Entfernung des Glucose-Anteils die diabetogene Eigenschaft aufhebt (Elsner et al., 2000). Auch durch kompetitive Hemmung des GLUT2 durch das Glucoseanalogon 5-Thio-D-Glucose (5-T-G) wird die Aufnahme des STZ in die β -Zelle sowie die Entwicklung eines HD- wie auch eines MLD-STZ- Diabetes verhindert (Wang et al., 1993).

STZ ist ein kurzlebiges Molekül, das nicht metabolisiert wird und spontan in ein Methylhydroxid und eine Isocyanat-Komponente zerfällt (Abb. 2). Isocyanate können sowohl zelluläre als auch intramolekulare Komponenten carbamylieren. Das Methylhydroxid zerfällt weiter in ein hochreaktives Carboniumion, welches zur Alkylierung unterschiedlicher Zellkomponenten, wie DNA oder Proteine befähigt ist. Diese Alkylierungsreaktionen finden bevorzugt an der N⁷- oder der O⁶-Position am DNA-Baustein Guanin statt. Dadurch werden DNA-Läsionen hervorgerufen, die jedoch durch körpereigene Reparaturmechanismen behoben werden können. Bei diesen Reparaturmechanismen kommt es zur Aktivierung der nukleären poly-ADP-Ribose-Synthetase (PARP) (Yamamoto et al., 1981; LeDoux et al., 1986, Wilson et al, 1988). Es wurde nun postuliert, dass die Aktivierung dieses Reparaturenzyms einen ausgeprägten Abfall des NAD⁺-Gehalts in den pankreatischen Inseln auslöst, so dass energieabhängige Zellfunktionen, wie die Proinsulinsynthese, aufgehoben werden

oder zum Zelluntergang führen können (LeDoux et al., 1986; Wilson et al., 1988). Überraschenderweise alkylieren jedoch sowohl das diabetogene STZ als auch das nicht-diabetogene MNU in äquimolaren Konzentrationen die DNA in vergleichbarer Stärke, so dass andere Faktoren außer der Aktivierung der PARP für die β -Zelltoxizität angenommen werden müssen (Le Doux et al., 1986). Alkylierungen von Schlüsselkomponenten der ATP-Synthese, wie glykolytische oder mitochondriale Enzyme, können ebenfalls zur letalen Zerstörung der pankreatischen Inseln führen. Wahrscheinlich ist, dass die Kombination dieser beiden STZ-induzierten Prozesse, nämlich der ATP-Abfall auf der einen Seite und der erhöhte NAD^+ -Bedarf auf der anderen Seite, die toxischen Effekte einer einzelnen hohen STZ-Dosis hervorruft (Wilson und Leiter, 1990; Cardinal et al., 1998).

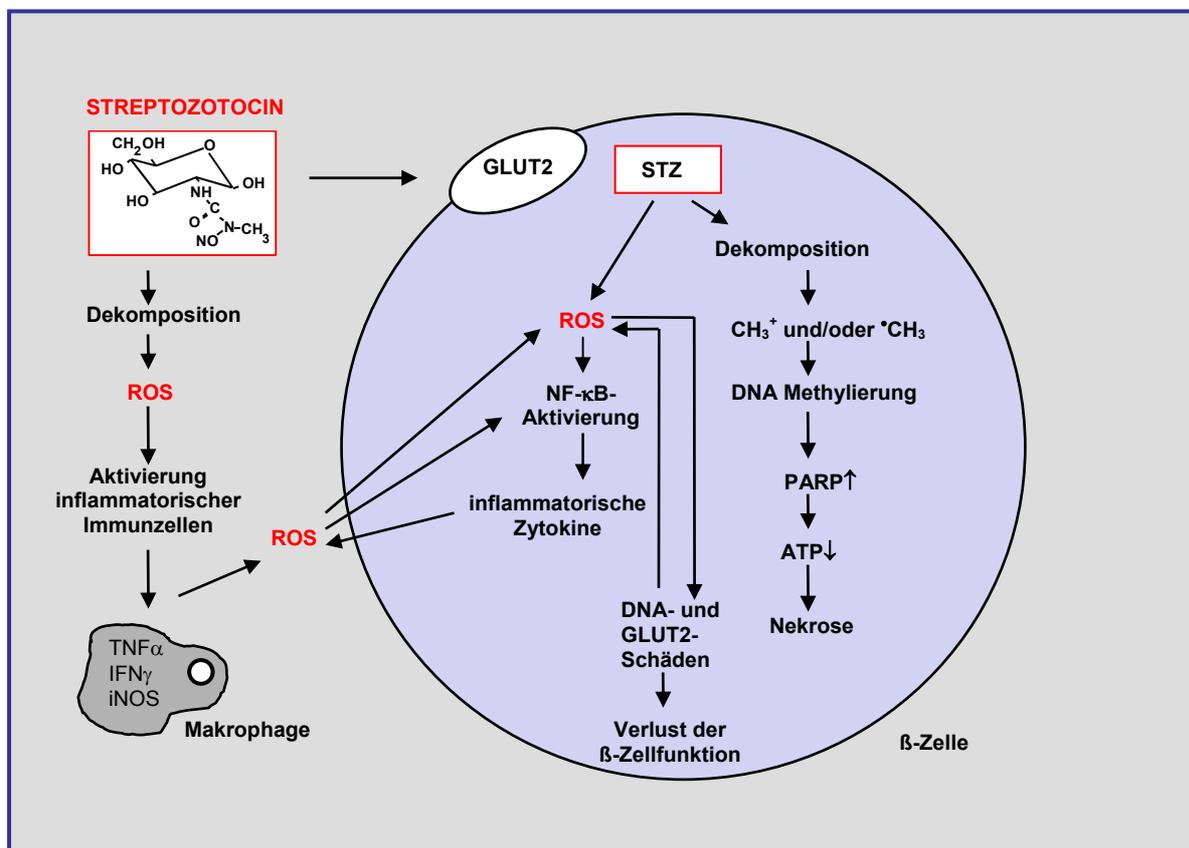


Abb. 2: Die Reaktionswege von Streptozotocin (STZ). STZ gelangt über den GLUT2 als Zielstruktur in die β -Zelle (Wang und Gleichmann, 1998). STZ zerfällt spontan in ein Methylhydroxid und eine Isocyanat-Komponente und ist zur Carbamylierung, Alkylierung und Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) befähigt. Durch DNA-Schäden, wie DNA-Doppelstrangbrüche oder Alkylierung von DNA-Basen, werden energieverbrauchende Reparaturenzyme wie die poly-ADP-Reparatur-Synthetase (PARP) aktiviert, die zum Abfall des NAD^+ - und ATP -Gehalts und schließlich zum Zelluntergang führen (Yamamoto et al., 1981). Außerdem wird durch STZ der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Lgssiar et al., 2004), inflammatorische Zytokine hochreguliert (Müller et al., 2002) und somit die ROS-Generierung weiter stimuliert. Extrazellulär können ROS inflammatorische Immunzellen aktivieren, die ihrerseits selbst zur ROS-Generierung befähigt sind und den Circulus vitiosus unterhalten.

Im MLD-STZ Diabetes-Modell induziert STZ zwei unterschiedliche Effekte, eine direkte β -Zelltoxizität und T-zellabhängige Immunreaktionen. Nur bei einer Kombination beider Effekte kommt es zur Entwicklung eines Diabetes. In Abbildung 2 sind diese zwei unterschiedlichen Effekte dargestellt.

In verschiedenen Versuchsansätzen wurden diese zwei unterschiedlichen MLD-STZ-Effekte analysiert. Durch Untersuchungen in empfänglichen CD1-Mäusen, die vor β -zelltoxischen Effekten sowie den Immunreaktionen geschützt wurden, konnten diese Wirkmechanismen belegt werden. Durch Vorbehandlung mit 3-O-Methyl-Glucose (3-O-MG) oder Nicotinamid unmittelbar vor jeder STZ-Injektion, konnten die Mäuse vor der direkten Toxizität des STZ geschützt werden (Rossini et al., 1978a). Damit konnte die Entwicklung einer Hyperglycämie um zwei Wochen verzögert werden. Eine kontinuierliche Behandlung mit Anti-Lymphozyten-Serum verringerte die inflammatorischen Immunreaktionen und verhinderte die Entstehung einer Hyperglycämie. Nach Absetzen der Therapie entwickelten jedoch auch diese Mäuse einen Diabetes. Nur die gleichzeitige Behandlung mit Anti-Lymphozyten-Serum und 3-O-MG schützte die CD1-Mäuse vor einem Diabetes (Rossini et al., 1978a).

Die T-Zellabhängigkeit im MLD-STZ-Diabetes belegten u.a. auch Paik et al. (1980). Die Autoren zeigten, dass sowohl immun-insuffiziente homozygot athymische (nu/nu) wie auch immun-kompetente heterozygot euthymische (nu/+) BALB/c Mäuse einen HD-STZ-induzierten Diabetes entwickeln. Einen MLD-STZ-Diabetes entwickelten dagegen nur die heterozygot euthymischen (nu/+) Mäuse, wohingegen athymische (nu/nu) Mäuse resistent waren. Diese Resistenz konnte durch Thymus-Transplantation invertiert werden (Paik et al., 1980; Nakamura et al., 1984). Weiterhin berichteten Buschard und Rygaard (1977) über den diabetogenen Effekt von Milzzellen, die von STZ-behandelten euthymischen Spender- in athymische Empfänger-Mäuse injiziert wurden. Menschliche Lymphozyten, die aus peripherem Blut diabetischer Patienten extrahiert und in athymische Mäuse übertragen wurden, induzierten auch in letzteren eine Hyperglycämie (Buschard et al., 1978, Serra et al., 1979), ein Ergebnis, das bislang nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (Beattie et al., 1980).

Bezüglich der Generierung von ROS wurde gezeigt, dass HD-STZ in vitro und in vivo eine Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Bildung induziert, die zu einer DNA-Fragmentierung in Zellen pankreatischer Inseln führen kann (Takasu et al., 1991). Diese ROS-Generierung wurde bisher mit HD-STZ nachgewiesen, jedoch nicht im MLD-STZ-

Modell. In unserem Labor konnte erstmals *in vitro* die STZ-vermittelte H_2O_2 - und Hydroxylradikal ($\cdot OH$)-Generierung (Gille et al., 2002) und vor kurzem erstmalig auch die MLD-STZ vermittelte H_2O_2 -Generierung in pankreatischen Inseln *ex vivo* nachgewiesen werden (Friesen et al., 2004). Diese Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, dass ROS als Mediatoren der β -Zellzerstörung eine wesentliche Rolle spielen (Oberley, 1988; Corbett et al., 1993; Halliwell, 1994). Basierend auf diesen Befunden sollte in meiner Arbeit die Bedeutung antioxidativer Enzyme als möglicher Schutzmechanismus gegen ROS analysiert werden.

1.1.5 Geschlechtsabhängigkeit in der Diabetespathogenese

Die Inzidenz des humanen autoimmunen Diabetes steht in Abhängigkeit zu den Sexualhormonen. Das männliche Geschlecht zeigte bis vor Beginn der Ära der Insulintherapie eine Prädominanz gegenüber dem weiblichen Geschlecht (Gundersen, 1927). Zudem zeigte sich bei männlichen Kindern eine Elevation der Diabetes-Inzidenz zum Zeitpunkt der sexuellen Reifung (Kromann et al., 1982).

Im experimentell induzierten Diabetes scheinen Sexualhormone ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zu spielen. Sowohl nach Pankreaektomie (Houssay, 1951) als auch nach Infektion mit dem in einigen Mausstämmen diabetogenen Enzephalomyokarditis-Virus (Boucher et al., 1975) entwickelten weibliche im Vergleich zu männlichen Ratten bzw. Mäusen langsamer einen Diabetes bzw. waren resistent. Im NOD-Mausmodell entwickeln dagegen weibliche Mäuse häufiger einen spontanen Diabetes als männliche. Nach Kastrierung der männlichen und Ovariectomie und/oder Gabe von Testosteron der weiblichen NOD-Mäuse kann die Inzidenz invertiert werden (Hawkins et al., 1993). Auch im MLD-STZ-Diabetes hat der Sexualhormonstatus einen entscheidenden Einfluss auf die Diabetes-Empfänglichkeit.

1.1.5.1 Geschlechtsabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes

Bei der C57BL/6-Maus sind männliche Tiere empfänglich für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes, weibliche hingegen resistent. Eine Kastration der weiblichen Mäuse, ebenso wie eine Behandlung mit Testosteron, erhöht deren Sensitivität für

einen MLD-STZ-Diabetes, während die Kastration der männlichen Mäuse deren Sensitivität verringert (Rossini et al., 1978b; Le et al., 1985). Die Vorbehandlung mit Östrogenen erniedrigt leicht die Sensitivität bei männlichen Mäusen für einen MLD-STZ-Diabetes, Gabe von Antiandrogenen verhindert komplett die Diabetesentwicklung in männlichen Mäusen, und Phenobarbital, ein Barbiturat, potenziert die diabetogene Wirkung von STZ sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen (Maclaren et al., 1980).

Diese Ergebnisse wurden durch Kromann et al. (1982) erweitert. Diese Arbeitsgruppe postuliert, dass die geschlechtsabhängige Entwicklung eines Diabetes unabhängig von dem Immunsystem sei. Bis dahin blieb ungeklärt, ob Sexualhormone in direkter Weise oder indirekt über Lymphozyten-abhängige Reaktionen die β -Zellen beeinflussen. Daher wurde ein Transfer von Milzzellen durchgeführt. Dafür wurden Milzzellen von weiblichen MLD-STZ-behandelten Spendermäusen in Ganzkörperbestrahlte weibliche Mäuse transferiert. Durch die Ganzkörperbestrahlung der Empfängermause wurde die Leukozytenzahl auf ein Zehntel reduziert. Die weiblichen Empfängermause und/oder die Spendermause wurden vorher mit Testosteron behandelt. Ausschließlich weibliche Empfängermause, die zuvor mit Testosteron behandelt wurden, zeigten erhöhte Blutglucose-Konzentrationen. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte ein Effekt der Sexualhormone auf das Immunsystem darstellen (Dörner et al., 1980). Ob dieser Effekt Ursache der geschlechtsabhängigen Entwicklung eines Diabetes ist, bleibt bis heute jedoch ungeklärt.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS kennzeichnen oxidativen Stress, der definiert ist als eine Imbalance zwischen der Generierung von ROS und ihrem Abbau zugunsten der Generierung von ROS (Sies, 1997). Aus diesem Ungleichgewicht resultiert für die Zelle die Gefahr der Zellschädigung bis hin zu ihrem Tod. ROS bezeichnet freie Sauerstoffradikale und nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies. ROS entstehen auf unterschiedlichem Wege in biologischen Systemen aus molekularem Sauerstoff. Nur die Sauerstoffradikale, im Gegensatz zu den nichtradikalischen reaktiven Sauerstoffspezies, zeichnen sich durch Besitz eines oder mehrerer ungepaarter Elektronen aus. Radikale werden

aus neutralen Molekülen durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons gebildet. Eine weitere Möglichkeit der Radikalbildung besteht in der homolytischen Spaltung einer kovalenten Bindung. ROS besitzen eine hohe chemische Reaktivität. Durch chemische Interaktionen der Radikale mit Proteinen, Nucleinsäuren und Membranlipiden können wiederum Sekundärradikale gebildet werden, die ihrerseits auch wieder mit Zellstrukturen reagieren können. Auf diese Weise kann letztendlich eine Kettenreaktion in Gang gebracht werden, die zu erheblichen Zellschädigungen bis hin zum Zelltod führt. Neben diesen chemischen Eigenschaften zeichnen sich Radikale durch besondere physikalische Eigenschaften aus, wie zum Beispiel dem Paramagnetismus. Das Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$) entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoffmolekülen, weitere Reduktionen führen zur Bildung des H_2O_2 , $\cdot OH$ und schließlich Wasser.

1.2.1 $O_2^{\cdot-}$

Die Aufnahme eines Elektrons durch das Sauerstoffmolekül führt zur Bildung des $O_2^{\cdot-}$. $O_2^{\cdot-}$ wird in fast jeder aerobisch lebenden Zelle gebildet, vor allem in der Atmungskette von dem Ubichinon-Cytochrom-b-Komplex (Komplex III) in den Mitochondrien. Von dort aus können $O_2^{\cdot-}$ in verschiedene Zellkompartimente diffundieren. Ebenso sind phagozytierende Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile an der Produktion von $O_2^{\cdot-}$ beteiligt. $O_2^{\cdot-}$ können spontan oder durch Superoxiddismutasen katalysiert zu molekularem Sauerstoff und H_2O_2 dismutieren (Abb. 3). Es existieren indirekte Beweise, dass $O_2^{\cdot-}$ eine besondere Rolle in der konstitutiven und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α -induzierten Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors (NF)- κB besitzt, der seinerseits für die Regulation verschiedener proinflammatorischer Proteine verantwortlich ist. Durch Aktivierung des NF- κB wird die inflammatorische Immunantwort induziert und stimuliert (Baeuerle und Henkel, 1994). Die mitochondriale Atmungskette spielt hierbei eine Schlüsselrolle, da hier $O_2^{\cdot-}$ generiert werden. Das antioxidative Enzym Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) ist mitochondrial lokalisiert und detoxifiziert $O_2^{\cdot-}$, indem es die enzymatische Umsetzung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 katalysiert. Durch Überexpression der MnSOD konnte sowohl ein Schutz gegen die TNF α -induzierte Apoptose und die Aktivierung von NF- κB und Aktivator Protein (AP)-1

(Manna et al., 1998) als auch gegen die NF- κ B-Aktivierung durch Interleukin (IL)-1 β oder eine Cytokin-Mixtur aus IL-1 β , TNF α und Interferon (IFN) γ erzielt werden (Azevedo-Martins et al., 2003). Weiterhin resultierte die Inhibition des mitochondrialen Elektronentransports im Komplex I (NADH-Ubichinon Oxidoreduktase) sowie im Komplex II (Succinat-Ubichinon Reduktase), nicht aber in den Komplexen III (Cytochrom C Reduktase) und IV (Cytochrom C Oxidase), in der Prävention vor TNF α -induzierter Zytotoxizität. Inhibierung des Komplexes III potenzierte sogar die zytotoxische Wirkung von TNF α (Schulze-Osthoff et al., 1992). Weiterhin kann O₂⁻ zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO^{*}) Peroxynitrit (ONOO⁻) bilden.

1.2.2 H₂O₂

Eine Reduktion des O₂⁻ führt zur Generierung von H₂O₂. H₂O₂ kann aber auch durch eine direkte Zwei-Elektronen-Übertragung auf das Sauerstoffmolekül entstehen. H₂O₂ selber ist kein freies Radikal, gilt jedoch als Quelle für die Bildung der hochreaktiven ^{*}OH. Durch die hierfür postulierte Fenton-Reaktion wird via Interaktion des H₂O₂ mit Übergangsmetallionen, wie zum Beispiel Eisen oder Kupfer, das hochreaktive ^{*}OH gebildet (Abb. 4). H₂O₂ wird in Peroxisomen und im Zytosol zum Schutz vor bakteriellen und viralen Infekten gebildet (Chance et al., 1979). Zur Entgiftung von H₂O₂ können verschiedene Enzymsysteme beitragen. In den Peroxisomen katalysiert die Catalase die Disproportionierung von H₂O₂. Die cytosolische Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von H₂O₂ durch das Tripeptid Glutathion (Abb.3). In Ratteninseln konnte in vitro und in vivo gezeigt werden, dass sowohl STZ als auch Alloxan, ein weiteres klassisches Diabetogen, die H₂O₂-Generierung stimulieren, die zu einer Fragmentierung der DNA und damit eventuell zum β -Zelltod führt (Takasu et al., 1991). H₂O₂ wird eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion zugesprochen. Schreck et al. (1991) wies die H₂O₂-medierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach.

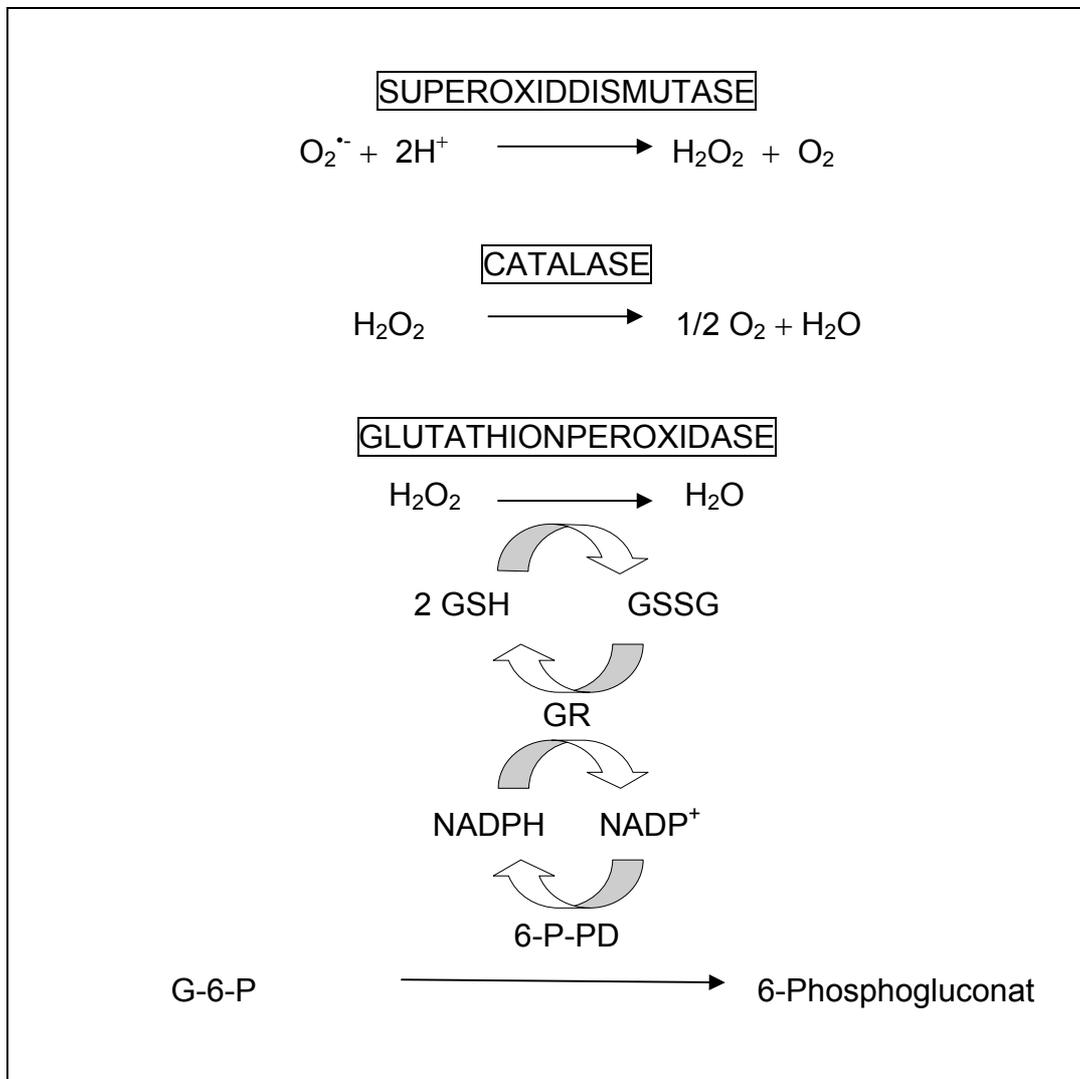


Abb.3: Reaktionswege von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Superoxidanionradikale ($O_2^{\cdot -}$) werden spontan oder von Superoxiddismutasen katalysiert zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert. H_2O_2 wird entweder über die Catalase oder die Glutathionperoxidase zu Wasser (H_2O) reduziert. Im Falle der Glutathionperoxidase geschieht dies unter Verbrauch von Glutathion (GSH, Glutathionsulfhydryl). Das oxidierte Glutathion (GSSG, Glutathiondisulfid) wird anschließend durch die NAD(P)H-abhängige Glutathionreduktase (GR) erneut zu Glutathion reduziert. (G-6-P: Glukose-6-Phosphat; G-6-PD: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase)

1.2.3 $\cdot\text{OH}$

$\cdot\text{OH}$ ist ein besonders reaktives Molekül aus der Gruppe der ROS. $\cdot\text{OH}$ kann sowohl durch die Fenton-Reaktion (Walling, 1975) als auch über die Haber-Weiss-Reaktion (Haber und Weiss, 1934) aus H_2O_2 entstehen (Abb. 4). Da die Reaktionskonstante der Haber-Weiss-Reaktion nahezu gleich Null ist, wird sie in chemisch definierten Systemen jedoch kaum beobachtet (Gutteridge et al., 1982; Halliwell, 1982).

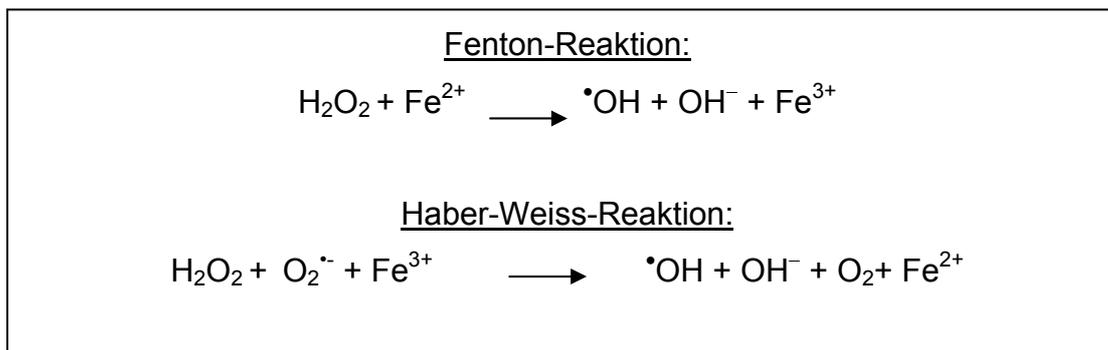


Abb. 4: Generierung von Hydroxylradikalen in der Fenton- und in der Haber-Weiss-Reaktion

Ein weiterer Weg der $\cdot\text{OH}$ -Generierung kann über die Stufe des ONOO^- bzw. über die Säure des Peroxynitrits (ONOOH) erfolgen (Beckmann, 1996; Gerasimov und Lyman, 1999) und ist in Abbildung 5 dargestellt.

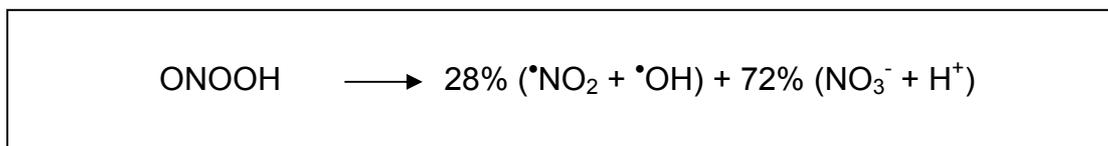


Abb. 5: Generierung von Hydroxylradikalen über die Stufe der Säure des Peroxynitrits

Die entstandenen kurzlebigen, sehr reaktiven $\cdot\text{OH}$ können nicht durch Membranen diffundieren. Stattdessen reagieren $\cdot\text{OH}$ mit der ersten Membrankomponente, auf die sie treffen und verändern diese in ihrer Struktur. So kann es zu Reaktionen mit Kohlenhydraten, Aminosäuren, Phospholipiden, DNA-Basen und organischen Säuren kommen, die in der Bildung von sekundären Radikalen resultieren. Grundsätzlich

werden dabei drei Reaktionstypen unterschieden. Zum einen erfolgt die Bildung von sekundären Radikalen durch Aufnahme eines Wasserstoffatoms, zum anderen durch Addition von $\cdot\text{OH}$ an den aromatischen Ring von Purin- und Pyrimidinbasen sowie durch Elektronentransfer, zum Beispiel bei Chloridionen.

1.2.4 Bedeutung der ROS

Physiologisch entstehen ROS in der Atmungskette, bei inflammatorischen Reaktionen im Metabolismus endozytierender Leukozyten durch das Enzym NADPH-Oxidase sowie, wenn auch in geringerem Maße, in Makrophagen (Halliwell, 1994). ROS werden zum Schutz vor Bakterien und Viren im Cytosol und Peroxisomen gebildet (Chance et al., 1979). Wenn ROS jedoch nicht adäquat durch Antioxidantien im Gleichgewicht gehalten werden, stellen sie eine besonders aggressive Gefahr für jede Zelle dar. Sie sind imstande Proteine, Nukleinsäuren und Membranlipide oxidativ zu verändern und ihre Funktion zu beeinträchtigen. Vor allem die Basen Thymin und Guanin werden geschädigt, ebenso sind in Proteinen insbesondere Methionin-, Histidin-, Tryptophanreste oder auch die Thiolgruppen von schwefelhaltigen Aminosäuren gefährdet. Während die oxidative Schädigung von Kohlenhydraten von geringerer Bedeutung ist, treten in Lipiden, besonders in Membranlipiden, umfangreiche oxidative Schädigungen auf.

Weiterhin wird postuliert, dass ROS eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion von Transkriptionsfaktoren einnimmt (Schulze-Osthoff et al., 1995; Sen und Packer 1996; Lander, 1997; Palmer und Paulsen, 1997; Ho und Bray, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass ROS NF- κ B aktiviert (Baeuerle und Baltimore, 1988), der wiederum über die Regulation von TNF α , IFN γ , IL-1 β , induzierbare Nitritoxid Synthase (iNOS) und Makrophagen chemotaktisches Protein (MCP-1) zentral in der Regulation der Immunantwort und Inflammation involviert ist (Baeuerle und Henkel, 1994).

Die Pathogenese vieler Erkrankungen wurde auf die Beteiligung von ROS zurückgeführt. So wurde ROS eine zentrale Rolle bei der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise M. Alzheimer und M. Parkinson, (LeBel und Bondy, 1992; Beal, 1995; Mattson et al., 1997), bei Myocardinfarkt (Lubec, 1996), nephrotoxischer Nephritis (Rehan et al., 1994), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

kungen (Dijkstra et al., 1998), bei Tumorerkrankungen (Oberley und Buettner, 1979), bei Knochen- und Gelenkerkrankungen (Mc Cord, 1974; Kawai et al., 2000; Greenwald, 1991) sowie bei der Hautalterung (Balin und Allen, 1986; Wenk et al., 2001) und der Psoriasis (Trouba et al., 2002) zugeschrieben. Wie es sich durch weitere Untersuchungen gezeigt hat, sind ROS ebenfalls grundlegend an der Entwicklung des STZ-induzierten Diabetes beteiligt (Oberley, 1988; Halliwell, 1994).

1.2.5 Rolle von ROS im experimentell induzierten Diabetes

Eine H_2O_2 -Generierung konnte bereits ex vivo in pankreatischen Ratteninseln nach Behandlung mit HD-STZ sowie Alloxan (Takasu et al., 1991) und in vitro in STZ-behandelten pankreatischen Mausinseln (Gille et al., 2002) nachgewiesen werden. Vor kurzem gelang Friesen et al. (2004) der Nachweis einer H_2O_2 -Generierung nach MLD-STZ Behandlung in pankreatischen Inseln. Die Bildung von $\cdot OH$ wurde bereits in Plasma, Leber, Herzmuskel und Gehirn von HD-STZ-behandelten, diabetischen Ratten nachgewiesen (Ohkuwa et al., 1995) und wurde in unserem Labor in vitro in pankreatischen Inseln von Mäusen mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie direkt bestimmt (Gille et al., 2002).

1.3 Antioxidantien

Die Bildung von Sauerstoffradikalen und anderen Sauerstoffspezies wird durch das Vorhandensein einer Reihe von antioxidativen Schutzmechanismen kontrolliert. Neben der Einteilung in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien können weiterhin drei Wirkmechanismen unterschieden werden: Es besteht 1) die Möglichkeit der Verhinderung der Bildung von ROS oder 2) der Verhinderung der Wirkung von ROS oder 3) die Reparatur der schon entstandenen Schäden.

Patienten mit Typ-1-Diabetes zeigen eine signifikante Reduktion des gesamten antioxidativen Status im Vergleich zu Kontrollpersonen (Maxwell et al., 1997). Bei diabetischen Kindern wurde ein Abfall der erythrozytären Glutathionperoxidase (GPx), des Gesamt-Glutathions, des Plasma-alpha-Tocopherols und des Beta-Karotins (Dominguez et al., 1998) und zugleich eine Zunahme von Lipidperoxiden,

konjugierten Dienen und Protein-Carbonylen (Santini et al., 1997), die allesamt Marker für oxidativen Stress darstellen, nachgewiesen. Im Folgenden sollen ausgewählte Antioxidantien näher beschrieben werden.

1.3.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien

1.3.1.1 Vitamin A

Vitamin A gehört zu den fettlöslichen Vitaminen und besitzt eine Retinoid-Struktur. Insbesondere ist Vitamin A am Sehvorgang beteiligt, indem es in Form des 11-cis- oder all-trans-Retinal zusammen mit dem Protein Opsin das Sehpigment Rhodopsin bildet. Zudem spielt Vitamin A eine wichtige Rolle bei Wachstum, Entwicklung und Differenzierung von Epithelgewebe. Eine Mangelernährung oder Malabsorption kann zur Störung der Dunkeladaptation, zur Xerophthalmie, Verhornung der Talgdrüsen, Keratomalazie sowie zu Störungen der Knochenbildung führen. Therapeutisch wird Vitamin A-Säure unter anderem bei dermatologischen Erkrankungen, wie der Acne conglobata, bei schweren Formen der Psoriasis, Morbus Darier, Ichthyosis und dem Lichen ruber planus eingesetzt. Zu beachten sind jedoch bei der Therapie die zum Teil schweren Nebenwirkungen.

Im Blut zirkuliert Vitamin A als Retinol, in der Haut wird Vitamin A als Retinyl-Ester gespeichert. Der Metabolismus des Vitamin A unterliegt komplizierten Regulationsmechanismen und ist nur unzureichend verstanden. Als Regulator spielt dabei beispielsweise das Retinoid-bindene-Protein eine Rolle. Neben der Fähigkeit Retinoidsäure mit oxidativem Potential zu bilden, besitzt Vitamin A auch antioxidative Eigenschaften.

Es wurde in Untersuchungen bisher gezeigt, dass in Mäusen durch ultraviolette Strahlung (UV-Licht) epidermales Vitamin A reduziert wird. Es wird postuliert, dass diese Reduktion jedoch nicht über die Induktion von oxidativem Stress, sondern vielmehr über photochemische Reaktionen ausgelöst wird, bei denen UV-Licht als Donor der benötigten Aktivationsenergie dient (Sorg et al., 2002).

Basierend auf den Erkenntnissen, dass oxidativer Stress und kardiovaskuläre Erkrankungen miteinander korrelieren, wurde die Rolle des Vitamin A als möglicher Schutzmechanismus in der H₂O₂-mediierten Inhibition der Vasomotorik in Rattenaor-

tae untersucht. STZ-behandelte Ratten wurden mit Vitamin A, Insulin oder Vitamin A mit Insulin zusammen behandelt. Darauf folgte in vitro die Messung der vasomotorischen Antwort der Aorta auf Phenylephrin und Acetylcholin. Dabei zeigte sich, dass die kombinierte Gabe von Vitamin A und Insulin den inhibitorischen Effekt von H₂O₂ auf die Vasomotorik verhindern konnte (Zobali et al., 2002).

Bereits gezeigt werden konnte, dass die Pathogenese des Diabetes mit einem Mangel an Vitamin A assoziiert ist. In Kindern, die an Typ-1-Diabetes leiden, finden sich im Vergleich zu gesunden Kindern reduzierte Vitamin A-Spiegel und erhöhte Spiegel des Retinoid-bindenden-Proteins im Blut (Baena et al., 2002).

In STZ-behandelten Ratten zeigt sich weiterhin ein interessantes Ergebnis in Bezug auf die Homöostase von Vitamin A. Im Plasma diabetischer Ratten fand man erniedrigte Spiegel von Vitamin A bei gleichzeitig erhöhten hepatischen Konzentrationen. Supplementation von Vitamin A resultierte in einem Anstieg der Vitamin A-Konzentration in der Leber, die Plasmakonzentration blieb dagegen unverändert niedrig. Die Behandlung mit Insulin führte zu umgekehrten Ergebnissen (Basu und Basualdo, 1997). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin A einen Einfluss auf die mitochondriale Genexpression hat. In BHE/cdb Ratten, die einen Verlust der metabolischen Kontrollmechanismen infolge einer Mutation in der mitochondrialen DNA zeigen, führte Vitamin A zu einer Veränderung der Genexpression (Berdanier, 2001).

1.3.1.2 Vitamin E (Alpha-Tocopherol)

Vitamin E gehört ebenfalls zu den fettlöslichen Vitaminen und umfasst alle Derivate des Tocols und Tocotrienols mit derselben biologischen Aktivität wie die des RRR- α -Tocopherols. Zu den acht natürlich vorkommenden Tocopherolen zählen Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltatocopherol bzw. -Tocotrienol. Vitamin E muss dem Körper exogen zugeführt werden und kommt hauptsächlich in pflanzlichen Ölen, Nüssen, Getreide und Gemüse vor. Der Bedarf eines erwachsenen Menschen liegt ungefähr bei circa 12 mg RRR- α -Tocopherol/Tag. Ein selten vorkommender alimentärer Mangel kann sich in Form von Störungen im Bereich der Fertilität, der Muskulatur, des Nervensystems, des kardiovaskulären Systems sowie der Erythrozyten und der Leber zeigen. Die sehr selten vorkommende vererbte Vitamin-E-Mangelataxie ist

durch eine Mutation des Chromosoms 8 charakterisiert, das für ein Vitamin-E-Transportprotein kodiert und dessen Defekt eine erniedrigte Serumkonzentration zur Folge hat.

Vitamin E besitzt antioxidative Eigenschaften insbesondere mit direktem protektivem Effekt auf die Zellmembran (Fariss et al., 2001; Schafer et al., 2002). In humanen Interventionsstudien konnte nachgewiesen werden, dass orale Substitution von Vitamin E sechs Stunden vor einer intravenösen Infusion von Eisen, oxidativen Stress signifikant reduzieren und in Kombination mit Vitamin C komplett verhindern kann (Winklhofer-Roob et al., 2003). Zur Evaluierung des Effekts einer Alpha-Tocopherol-Defizienz bezüglich oxidativem Stress und Neuropathien, wurden Ratten mit STZ behandelt und erhielten dazu entweder normale Alpha-Tocopherol-angereicherte oder -defiziente Diät. Eine Alpha-Tocopherol-defiziente Diät resultierte sowohl in nicht-diabetischen wie auch - noch stärker ausgeprägt - in diabetischen Ratten in einer Abnahme der Tocopherol-Konzentration im Plasma, in Neuronen und in peripheren Nerven. Diese Phänomene waren gleichzeitig mit einem Anstieg von Hydroperoxiden und konjugierten Dienen und einer Abnahme der Glutathion-Spiegel assoziiert (Nickander et al., 1994). Eine Vitamin-E-Therapie bei diabetischer Vasculopathie zeigte eine Erniedrigung der Lipidperoxidation, des C-reaktiven Proteins und pro-inflammatorischer Zytokine (Jialal et al., 2002). Auch bei der Behandlung der Atherosklerose, Carcinomen und beim Morbus Parkinson soll Vitamin E einen positiven Einfluss haben (Dutta und Dutta, 2003; Fariss und Zhang, 2003). Fariss et al. (2001) konnte darüber hinaus zeigen, dass insbesondere die Anreicherung der Mitochondrien mit antioxidativem Tocopherol einen protektiven Effekt bewirkt.

1.3.1.3 Vitamin D (Cholecalciferol)

Vitamin D₃ oder auch Cholecalciferol genannt, ist grundlegend an der Regulation des Calcium- und Phosphat- Haushalts beteiligt. Vitamin D₃ kann entweder exogen über die Nahrung aufgenommen werden oder endogen aus 7- Dehydroxycholesterol unter UV-Bestrahlung synthetisiert werden. Die biologisch aktive Form des Vitamin D₃ und des Vitamin D₂ (Ergocalciferol), nämlich das 1,25-Dihydroxycholecalciferol, entsteht durch Hydroxylierung in Leber und Niere. Ein massiver Vitamin D-Mangel kann im

Kindesalter zu Rachitis führen, im Erwachsenenalter manifestiert sich der Vitamin D-Mangel als Osteomalazie.

Eine sehr interessante Untersuchung von Mathieu et al. (1994) wies einen Schutz gegen Diabetes in NOD-Mäusen durch Gabe von 1,25-Dihydroxycholecalciferol nach.

1.3.1.4 Selen

Das Spurenelement Selen gehört zu den Chalkogenen und ist Teil des intrazellulären antioxidativen Systems. Es ist Bestandteil des aktiven Zentrums der Selenoproteine, wie zum Beispiel der Gruppe der Glutathionperoxidasen. Diese schützen die Zelle vor Peroxidation, vor allem der Lipidperoxidation. Zudem spielt Selen eine Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse. Ein Zusammenhang zwischen Selen und der Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde bereits untersucht (Gagern von et al., 1999). Selendefizienz in Ratten resultierte in einer Reduktion der Selen-Konzentration im Serum und in der Leber sowie in der Abnahme der GPx-Aktivität. Supplementation von Selen erhöhte zwar die Selenkonzentration im Serum, hatte aber keinen Effekt auf die GPx-Aktivität (Bauersachs und Kirchgessner, 1992). Einen Abfall der Selenkonzentration und der Aktivität der GPx findet man bei Patienten, die an systemischen inflammatorischen Prozessen (SIRS), einer Sepsis (Gartner und Angstwurm, 1999) oder einer terminalen Niereninsuffizienz (Winnefeld et al., 1995) erkrankt sind.

1.3.1.5 Metallothionein

Metallothionein (MT) ist ein cysteinreiches Protein, von dem vier Isoformen existieren, eine MT-1, MT-2, MT-3 und MT-4. MT-1 und MT-2 sind die häufiger vorkommenden Formen, MT-3 ist als Wachstum-hemmender Faktor (Growth Inhibiting Factor) charakterisiert und kommt in der Maus in Testis, Ovar und Uterus vor (Moffatt und Seguin, 1998). Die MT-4 wurde bisher nur im Plattenepithel der Maus gefunden (Quaife et al., 1994). Neben der Fähigkeit Schwermetallionen zu detoxifizieren (Sato und Bremner, 1993) und den Metabolismus wichtiger Spurenelemente, wie Cadmi-

um, Zink und Kupfer, zu regulieren, ist MT ebenfalls an dem zellulären Schutz vor ROS, insbesondere der toxischen $\cdot\text{OH}$ beteiligt (Abel und de Ruiter, 1989; Chubatsu und Meneghini, 1993). Die Induktion der MT-Synthese wird unter anderem durch Metalle, Hormone, Cytokine und oxidativen Stress stimuliert. Zink zeigte dabei im Pankreas von Ratten ein maximales Induktionspotential (Onosaka et al., 1984). MT spielt auch bei einer Reihe angeborener Stoffwechselerkrankungen eine Rolle, wie beispielsweise der Acrodermatitis enteropathica und der familiären Hyperzinkämie (Cousins, 1976). Beide Erkrankungen sind mit einem atypischen Metabolismus von Zink assoziiert, im Falle der Acrodermatitis enteropathica im Sinne einer Minderversorgung, bei der Hyperzinkämie im Sinne einer Anreicherung von Zink. Eine weitere interessante medizinische Rolle besitzt MT bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Goldpräparaten. Es ist bekannt, dass bei der Therapie mit Goldsalzen ein Teil der Patienten auf diese Therapie ansprechen („responder“), ein anderer Teil der Patienten jedoch nicht („non-responder“). Es wird vermutet, dass bei diesen „non-respondern“ vermehrt Goldionen vom schon vorhandenen oder induzierten MT gebunden werden und so keine therapeutisch wirksame Goldkonzentration erreicht wird (Schmitz et al., 1980; Glennas und Rugstad, 1985). Im Pankreas der Maus konnte nach Behandlung mit dem Diabetogen Alloxan, das oxidativen Stress induziert, eine gesteigerte MT-Synthese nachgewiesen werden (Onosaka et al., 1988). Eine signifikante MT-Induktion wurde ebenfalls ex vivo in isolierten pankreatischen Inseln und in der Leber der Maus nachgewiesen, nachdem STZ i.p. injiziert worden war (Zimny et al., 1993). Die STZ-induzierte Hyperglycämie in Ratten (Yang und Cherian, 1994) und der MLD-STZ-Diabetes in Mäusen (Ohly et al., 2000) wurde durch MT-Induktion mit Zink reduziert. Überexpression von MT in pankreatischen Inseln transgener Mäuse resultierte in einer Resistenz gegen STZ-induzierten Diabetes (Chen et al., 2001).

1.3.1.6 Thioredoxin

Thioredoxin (TRX) ist ein niedermolekulares redoxaktives Protein mit einer molekularen Masse von 12 kDa. Aktives Zentrum bilden cysteinreiche Reste, die durch eine zu den Seleno-Flavoprotein gehörende Thioredoxinreduktase in einer NADPH-abhängigen Reaktion reduziert werden. Bekannt war TRX zunächst nur als Kofaktor

der Ribonukleotidreduktase (Laurent et al., 1964), bevor erkannt wurde, dass es auch in der DNA-Synthese und deren Reparatur eine Rolle spielt (Huber et al., 1986). Induziert wird TRX durch virale Infektionen, ischämischen Insult, UV-Licht, Röntgenstrahlen und H_2O_2 (Huber et al., 1986). Es wurde gezeigt, dass TRX in der Lage ist, als Scavenger von ROS zu fungieren und durch ROS ausgelöste oxidative Schäden zu reparieren vermag (Holmgren, 1985; Nakamura et al., 1997). TRX zeigte in vitro einen protektiven Effekt gegen die Zytotoxizität von ROS (Nakamura et al., 1997) und ist an der Regulation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und dem nukleären Redox Faktor 1 beteiligt (Hirota et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Schenk et al., 1994). Überexpression von TRX in β -Zellen transgener Mäuse resultierte in einem Schutz vor spontan entwickeltem Diabetes in NOD-Mäusen, verhinderte jedoch nicht die Entwicklung einer Insulinitis. Ebenso konnte ein HD-STZ-induzierter Diabetes verhindert werden (Hotta et al., 1998).

1.3.2 Enzymatische Antioxidantien

Verglichen mit anderen Organen zeigen die pankreatischen Inseln von Ratten eine insgesamt sehr niedrige Ausprägung des enzymatischen antioxidativen Systems (Grankvist et al., 1981; Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997). Die Autoren vermuten, dass dies der Grund für die Vulnerabilität der β -Zelle gegenüber oxidativem Stress und toxischen Substanzen sei. In den folgenden Kapiteln soll näher auf die Superoxiddismutase (SOD), die Catalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPx) eingegangen werden. Diese antioxidativen Enzyme könnten einen Schutz gegen die Entwicklung eines MLD-STZ-induzierten Diabetes darstellen (Abb. 6).

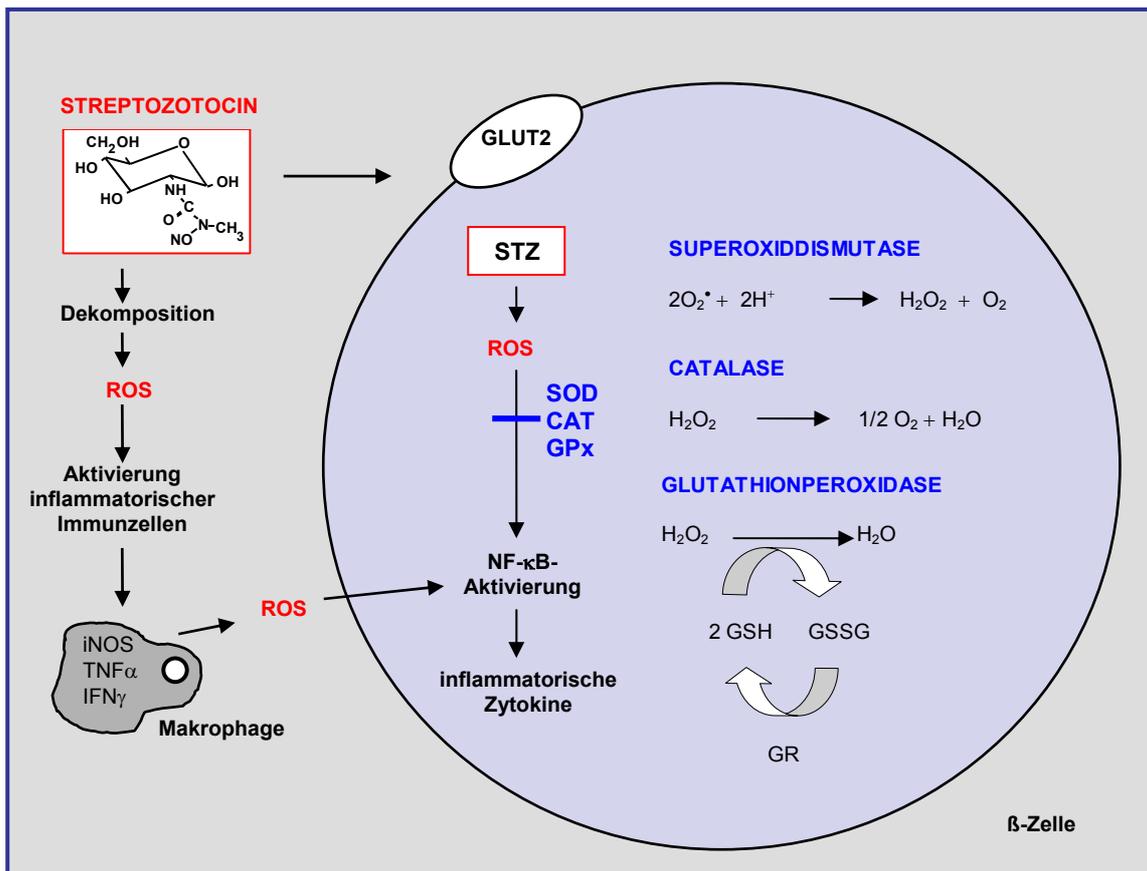


Abb. 6: Die Rolle der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) im MLD-STZ-induzierten Diabetes. Im MLD-STZ Diabetes-Modell induziert STZ zwei unterschiedliche Effekte, eine direkte β -Zelltoxizität und T-zellabhängige Immunreaktionen. Nur bei einer Kombination beider Effekte kommt es zur Entwicklung eines Diabetes. Es konnte gezeigt werden, dass ROS grundlegend an der Entwicklung des STZ-induzierten Diabetes beteiligt sind (Halliwell, 1994; Oberley, 1988; Friesen et al., 2004). Den immunologischen wie auch den subtoxischen Effekten von ROS könnte durch SOD, CAT sowie GPx entgegengesteuert werden, indem diese ROS detoxifizieren und so die β -Zelle vor dem Zelluntergang retten. GSH: Glutathionsulphydryl; GSSG: Glutathiondisulfid; GR: Glutathionreduktase

1.3.2.1 SOD

1.3.2.1.1 Struktur und Vorkommen

Die SOD ist ein antioxidatives Enzym. Es existieren zwei verschiedene Formen, eine Mangan-enthaltende MnSOD und eine Kupfer-Zink-enthaltende CuZnSOD. Die CuZnSOD ist intrazellulär oder extrazellulär lokalisiert. Die extrazelluläre CuZnSOD existiert als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 135 kDa und wurde in humanem Plasma, Lymphe und Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen (Marklund et

al., 1982). In meiner Dissertation wird insbesondere auf die intrazelluläre CuZnSOD, im Folgenden nur noch CuZnSOD genannt, und die MnSOD eingegangen. Erstere befindet sich vor allem im Cytoplasma aber auch in nukleären Kompartimenten und in Lysosomen von Säugetierzellen und besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa (Chang et al., 1988; Keller et al., 1991; Crapo et al., 1992; Liou et al., 1993).

MnSOD ist in den Mitochondrien lokalisiert, in die sie über eine bestimmte Aminosäuresequenz gelangt und dort ihre tetraedische Struktur von 96 kDa annimmt (Keller et al., 1991). Die intrazelluläre CuZnSOD wird vor allem in Niere, Milz, Leber, Herzmuskel und Gehirn exprimiert. In pankreatischen Inseln der Ratte erreicht die mRNA-Expression von CuZnSOD nur ca. $23\pm 5\%$ der Expression der Leber (Tiedge et al., 1997). Die MnSOD wird vor allem im Intestinaltrakt, im Herzmuskel, in der Niere und im Fettgewebe hoch exprimiert. Ihre mRNA-Expression in den pankreatischen Inseln von Ratten entspricht $55\pm 6\%$ der der Leber (Tiedge et al., 1997).

1.3.2.1.2. Biologische Funktion

Die SOD ist ein antioxidatives Enzym, das die in der Atmungskette produzierten $\cdot\text{OH}$ abfängt und zu H_2O_2 dismutiert (Abb. 6). Sowohl die CuZnSOD als auch die MnSOD spielen in vielzähligen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Im Folgenden soll ein beispielhafter Teil der assoziierten Erkrankungen beschrieben werden. Wurde in der Literatur nicht zwischen CuZnSOD und MnSOD unterschieden, wird nur die Abkürzung SOD verwendet.

Verminderte Spiegel der CuZnSOD konnten bisher in sehr heterogenen Tumorgeweben nachgewiesen werden (Sun, 1990; Sun et al.; 1993; Zhong et al., 1999), dagegen waren die Werte im Blut von Patienten mit Magencarcinomen erhöht (Lin et al., 2002). Eine Überexpression der CuZnSOD scheint einen protektiven Effekt auf die Tumorentwicklung zu besitzen und von den Autoren wird CuZnSOD als neues Tumorsuppressorgen diskutiert (Zhang et al., 2002). Eine Überexpression der CuZnSOD resultierte u.a. in einer Suppression des Wachstums von Gliomazellen in vitro (Zhang et al., 2002). Eine Mutation des CuZnSOD Gens in G93A ist mit der Pathogenese der Amyotrophischen Lateralsklerose assoziiert (Beretta et al., 2003).

MnSOD wird durch Cytokin-Behandlung, ultraviolette Bestrahlung, Irradiation und Ischämie (MacMillan-Crow und Cruthirds, 2001) sowie $\text{TNF}\alpha$ (Wong und Goeddel, 1988; Liu et al., 2000), $\text{INF}\gamma$ (Jacoby und Choi, 1994), Lipopolysaccharide (Gibbs et al., 1992) und IL-1 (Borg et al., 1992; Gwinner et al., 1995) induziert, um vor oxidativen Prozessen zu schützen. Untersuchungen ergaben einerseits einen Abfall der MnSOD-Aktivität bzw. der Genexpression oder des Proteingehaltes bei bestimmten Erkrankungen, wie beispielsweise bei malignen Tumoren (Oberley und Buettner, 1979; Sun, 1990; Bostwick et al., 2000), Asthma (Joseph et al., 1993) sowie bei Transplantatabstoßungsreaktionen (MacMillan-Crow et al., 1996), andererseits eine Erhöhung in Gliomazellen im Vergleich zu gesundem Gewebe (Zhong et al., 1999). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass in pankreatischen Adenocarcinom-Zelllinien eine erniedrigte Aktivität der MnSOD mit erhöhtem Tumorwachstum korrelierte (Cullen et al., 2003). Die Inaktivierung der MnSOD beruht wohl auf Tyrosin-Nitrosierung der MnSOD wie es bereits bei der Nierenabstoßungsreaktion und dem Adenocarcinom des Ductus pancreaticus des Menschen gezeigt werden konnte (MacMillan-Crow und Cruthirds, 2001). Mäuse, die nur 50% des normalen MnSOD-Gehaltes exprimierten, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (MacMillan-Crow und Cruthirds, 2001). Eine Überexpression der MnSOD in Insulinomazellen resultierte in einer signifikanten Abnahme der induzierbaren Stickstoffoxid Synthase (iNOS) und der NO-Bildung und schützte so vor IL-1 β -induzierter Zytotoxizität (Hohmeier et al., 1998). Weiterhin zeigte sich bei Überexpression von MnSOD eine Abnahme der $\text{TNF}\alpha$ -mediierten NF- κ B-Aktivierung, der TNF-abhängigen inhibierbaren I κ B α -Degradation und der TNF-induzierten Aktivator Protein (AP)-1-Aktivierung (Manna et al., 1998).

1.3.2.1.3 Prävention des STZ-induzierten Diabetes mit SOD

Schon 1980 konnte Robbins et al. in Ratten durch intravenöse (i.v.) Injektion von SOD vor der STZ-Injektion einen Schutzeffekt erzielen. Gandy et al. (1982) zeigten in vitro einen protektiven Effekt gegen STZ und Alloxan, einem weiteren Diabetogen, sowie in vivo eine Protektion des HD-STZ induzierten Diabetes durch i.v. SOD-Injektion jeweils vor der STZ-Injektion. Eine systemische Überexpression von CuZn-

SOD schützte vor den diabetogenen Effekten von Alloxan und STZ (Kubisch et al., 1994). Eine β -zellspezifische Überexpression von CuZnSOD in transgenen Mäusen resultierte in einem protektiven Effekt gegen Alloxan (Kubisch et al., 1997). Acetyl-Homocystein-Thiolazeton-induzierte Stimulation der SOD schützte Ratten vor subtoxischen Effekten von STZ. Dieser Schutzeffekt konnte jedoch nur mit Behandlung mit STZ in Dosen von 45 mg/kg KG erzielt werden, bei Behandlung mit 65 mg/kg KG war kein protektiver Effekt mehr nachweisbar (Papaccio et al., 1986). Auch in NOD-Mäusen wurde durch peritoneale Injektion von SOD die spontane Entwicklung eines Diabetes verhindert. Zudem konnte durch Transplantation pankreatischer Inseln aus BALB/c-Mäusen unter die Nierenkapsel von NOD-Mäusen und gleichzeitiger Injektion von SOD oder SOD und CAT vor einer Diabetesprogression geschützt werden (Nomikos et al., 1989).

Basierend auf diesen Befunden sollte in meiner Arbeit die Bedeutung der CuZnSOD und der MnSOD im MLD-STZ-Diabetes-Modell in C57BL/6-Mäusen untersucht werden.

1.3.2.2 CAT

1.3.2.2.1 Struktur und Vorkommen

CAT ist ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 230 kDa. CAT kommt in Erythrozyten und Peroxisomen vor allem der Leber vor, wird aber auch in Niere, Milz, Lunge und Fettgewebe von Ratten hoch exprimiert (Tiedge et al., 1997). In pankreatischen Inseln von Ratten konnte die mRNA-Expression von CAT nicht nachgewiesen werden, dagegen aber schwach in Insulin-produzierenden RINmF5-Zellen (Tiedge et al., 1997).

1.3.2.2.2 Biologische Funktion

CAT gehört zu den Hydroperoxidasen, die für die Entgiftung von H_2O_2 verantwortlich sind (Abb. 6). Hydroperoxidasen benötigen ein reduziertes Substrat, das Wasserstoff und Elektronen für die Bildung von Wasser aus H_2O_2 bereitstellt. CAT besitzt 4

Polypeptidketten mit je einem Häm als prosthetische Gruppe, dessen Eisenmolekül reduziert, während H_2O_2 oxidiert wird.

Ein autosomal-dominant vererbter Mangel an CAT resultiert in der so genannten Akatalasämie oder auch Takahara-Krankheit genannt. Sie manifestiert sich als Stomatitis ulcerosa mit Alveolarpyorrhoe und progressiver Gangrän der Gingiva. Es wird angenommen, dass die fehlende Spaltung des von *Streptococcus viridans* gebildeten H_2O_2 zu den genannten Symptomen führt. Retinale Ganglienzellen werden durch CAT vor ROS geschützt, die durch UV-Licht induziert werden (Kortuem et al., 2000).

1.3.2.2.3 Prävention des STZ-induzierten Diabetes mit CAT

Es wurde bereits gezeigt, dass in transgenen Mäusen eine Überexpression von CAT mit Aktivitätssteigerung auf das 50fache vor H_2O_2 -induzierter Zellschädigung und vor STZ-induzierten Diabetes schützte (Xu et al., 1999). Durch Überexpression von CAT in Insulin-produzierenden RINmF5-Zellen konnte ein Schutz gegen die H_2O_2 -Toxizität erreicht werden (Tiedge et al., 1997).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im Rahmen meiner Arbeit die Bedeutung der CAT im MLD-STZ-Modell analysiert werden.

1.3.2.3 GPx

1.3.2.3.1 Struktur und Vorkommen

GPx ist ein Selen-abhängiges tetrameres Protein, das die Reduktion von H_2O_2 katalysiert (Abb. 6). Es existieren vier Isoformen: 1) die zellulär lokalisierte GPx1, die Hämoglobin in den Erythrozyten vor Oxidation schützt, 2) die gastrointestinale GPx2, 3) eine extrazellulär lokalisierte GPx3 und 4) eine GPx4, eine hauptsächlich in der Zellmembran lokalisierte Phospholipid-Hydroperoxidase. Die cytoplasmatische GPx1 sowie die membranständige GPx4 wurden in Leber, Nieren, Milz, Lunge, Herzmuskel, Fettgewebe und Nebennierenmark, jedoch nur die GPx4 in pankreatischen

Inseln von Ratten nachgewiesen. Ihre Genexpression entspricht $19\pm 5\%$ der Leber (Tiedge et al., 1997).

1.3.2.3.2 Biologische Funktion

In Erythrozyten reduziert GPx Methämoglobin und setzt mit Hilfe des Glutathions H_2O_2 in Wasser um (Abb 6). H_2O_2 entsteht in Erythrozyten vor allem unter Einfluss bestimmter Medikamente oder ist Bestandteil von Lipidperoxiden in Membranlipiden. Das Tripeptid Glutathion wird in Erythrozyten durch jeweils zwei ATP-abhängige Reaktionen aus Glutamat, Glycin und Cystein synthetisiert. Oxidiertes und reduziertes Glutathion bilden ein Redoxsystem, bei dem die reduzierte Form mit 98% stark überwiegt. Die Funktion von Glutathion wird durch die Sulfhydrylgruppe von Cystein bestimmt, das vor Oxidation schützt. Wegen der leichten Oxidierbarkeit von Glutathion muss reduziertes Glutathion (Glutathionsulfhydryl, GSH) ständig durch die Glutathionreduktase (GR) mit Hilfe von $NADPH/H^+$ aus dem Pentosephosphatweg zur oxidierten Form (Glutathiondisulfid, GSSG) regeneriert werden (Flohe, 1982).

1.3.2.3.3 Prävention des STZ-induzierten Diabetes mit GPx

Überexpression der GPx in Insulin-produzierenden RINm5F Zellen resultierte in nur einem leichten Anstieg der Resistenz gegen H_2O_2 (Tiedge et al., 1998) im Gegensatz zum Effekt durch Überexpression von CAT erreichten Resistenz.

Die Rolle der GPx1 und der GPx4 im MLD-STZ-induzierten Diabetes sollte in meiner Arbeit untersucht werden.

2. Fragestellung

An der Pathogenese der β -Zelldestruktion im MLD-STZ-induzierten Diabetes-Modell der Maus sind T-zellspezifische Immunreaktionen und unspezifische inflammatorische Mediatoren wie ROS beteiligt. Wir nehmen an, dass zum einen die sehr reaktiven und hochtoxischen $\cdot\text{OH}$ aus der Gruppe der ROS an der Zerstörung der β -Zellen beteiligt sind und zum anderen zusätzlich H_2O_2 aus der Gruppe der ROS NF- κB aktiviert und so über die ausgelöste Immunantwort die ROS-Produktion wiederum stimuliert wird. Über diesen Regelkreis kommt es zur kontinuierlichen ROS-Generierung, welche schließlich die Funktion der β -Zelle zum Erliegen bringt.

Basierend auf Befunden, wie

- 1) dem In-vitro-Nachweis von $\cdot\text{OH}$ durch STZ (Gille et al., 2002) und dem In-vitro- und Ex-vivo-Nachweis von H_2O_2 Generierung durch respektive STZ und MLD-STZ (Friesen et al., 2004) in pankreatischen Inseln der Maus,
- 2) der schützenden Funktion überexprimierter CuZnSOD bei Alloxan- und STZ-behandelten Mäusen (Kubisch et al., 1997),
- 3) der Prävention des STZ-induzierten Diabetes durch Überexpression von CAT in transgenen Mäusen (Xu et al., 1999),
- 4) der Resistenz gegenüber H_2O_2 durch GPx-Überexpression in vitro (Tiedge et al., 1997),
- 5) die Relevanz der Kombination von antioxidativen Enzymen im Hinblick auf einen Schutz gegen ROS-Toxizität in vitro (Tiedge, 1998) und
- 6) der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber STZ in männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen (Rossini et al. 1978b),

wurde in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Werden in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen die antioxidativen Enzyme CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und/oder GPx4 exprimiert?
 - Hat die Behandlung mit MLD-STZ Einfluss auf die mRNA-Expression von den oben genannten antioxidativen Enzymen in pankreatischen Inseln?
-

- Wenn ein Effekt von MLD-STZ auf die mRNA-Expression der oben genannten antioxidativen Enzyme vorhanden ist, besteht ein Unterschied zwischen Diabetes-resistenten weiblichen und Diabetes-suszeptiblen männlichen Empfänger-mäusen?
 - Hat die Behandlung mit MLD-STZ ebenfalls Einfluss auf die mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und/oder GPx4 in Lebergewebe von C57BL/6-Mäusen?
-

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Organe

3.1.1 Mäuse

Männliche und weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 wurden im Alter von 5-7 Wochen von Harlan Winkelmann (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) bezogen. Im Alter von 7-8 Wochen wurden die Mäuse für die Ex-vivo-Experimente eingesetzt. Alle Versuchstiere wurden unter konventionellen Bedingungen in Käfigen zu höchstens 5 Tieren gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle Tierversuche waren von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen, genehmigt.

3.1.2 Organentnahme

Nach schmerzloser Tötung der Mäuse durch cervikale Dislokation wurden die pankreatischen Inseln und das Lebergewebe entnommen und für molekularbiologische Untersuchungen ex vivo eingesetzt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Reagenzien

Soweit nicht anders beschrieben, handelt es sich bei den verwendeten Substanzen und Lösungen um handelsübliche Chemikalien, welche von den Firmen Gibco (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen wurden. Alle verwendeten Primer stammen von MWG-Biotech (Ebersberg).

3.2.2 In-vivo-Behandlung der Mäuse

Jeweils eine Versuchstiergruppe von je 10 männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen wurde entsprechend dem von Like und Rossini (1976) beschriebenen Protokoll mit MLD-STZ (Roche Diagnostics, Mannheim) behandelt. Dabei erhielten die Mäuse an 5 aufeinander-folgenden Tagen jeweils eine i.p. Injektion STZ von 40 mg/kg KG. Das in Natriumcitrat gelöste STZ wurde innerhalb von 5 min nach Auflösung injiziert. Eine weitere Versuchstiergruppe von je 10 männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen diente als Kontrolle und blieb unbehandelt.

3.2.3 Isolierung pankreatischer Inseln und Lebern

Die Isolierung pankreatischer Inseln wurde nach der Methode von Gotoh et al. (1985) und der Modifikation von Zimny et al. (1993) am ersten und am dritten Tag nach der letzten Injektion von MLD-STZ durchgeführt. Nach Tötung durch cervikale Dislokation, Eröffnung der Bauchhöhle und Freipräparation des Ductus choledochus zwischen Gallenblase und Duodenum vom umliegenden Gewebe wurde mit einer Gefäßklemme die Mündungsstelle des Ductus in den Darm abgeklemmt. Unter einem Binokular-Mikroskop wurden 2 ml einer Kollagenaselösung (Serva, Heidelberg) durch vorsichtige Injektion in den Ductus choledochus über den Ductus pancreaticus in das Pankreas geleitet. Das aufgeblähte Pankreas wurde vom umliegenden Gewebe frei präpariert, in eine Petrischale überführt und zur Digestion des exokrinen Gewebes inkubiert. Durch Zugabe 4°C kalter HBSS-Lösung (Gibco, Eggenstein) wurde die enzymatische Aktivität der Kollagenase unterbrochen. Das angedaute Pankreasgewebe wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand mit dem exokrinen Gewebe verworfen und das Sediment mit den pankreatischen Inseln resuspendiert und wiederholt zentrifugiert, um weiteres exokrines Gewebe zu entfernen. Nachfolgend wurde das Sediment in HBSS aufgenommen und die Gewebesuspension mit Ficoll-Lymphozytentrennmedium (Biochrom KG, Mannheim) aufgeschichtet. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Inseln, die sich an der Trennschicht zwischen Ficoll und HBSS-Medium angereichert hatten, gesammelt und in eine HBSS-gefüllte Petrischale überführt. Die Inseln wurden mit der Hand durch zweimaliges Überpipettieren in eine HBSS-gefüllte Petrischale verlesen, um die

Kontamination mit exokrinem Gewebe möglichst gering zu halten. Zur Kultivierung wurden die Inseln gezählt, in eine Petrischale mit RPMI 1640-Kulturmedium (Sigma, Deisenhofen), die 5,6 mmol/l D-Glukose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin enthielt, überführt und bei 37°C, 95% O₂ und 5,5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Lebern wurden mit Hilfe einer Pinzette frei präpariert, vom umliegenden Gewebe getrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4. Isolierung der RNA aus pankreatischen Inseln und Lebergewebe

Als Gewebespender wurden für die In-vivo-Experimente 7-8 Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6- Mäuse in Gruppen von 10 Tieren verwendet, die entweder mit MLD-STZ behandelt oder unbehandelt waren.

Die Isolierung der RNA aus Inseln und der Lebern erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Die tiefgefrorenen Inselzellen wurden aufgetaut und mit 1 ml TRIzol (Gibco, Eggenstein) versetzt. Das Lebergewebe wurde zunächst mit Hilfe eines Mörsers mechanisch zerkleinert und darauf folgend ebenfalls mit 1ml TRIzol versetzt. TRIzol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat; es homogenisiert Gewebe ohne die RNA zu zerstören. Durch 4-5 maliges Hin- und Herziehen einer 1 ml Tuberkulinspritze wurden die Inselzellen bzw. das Lebergewebe homogenisiert und Nucleo-Proteinkomplexe dissoziiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) wurden die Proben geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C erfolgte die Trennung in eine organische Phenol-Chloroform-Phase am Röhrchenboden, eine weiße Interphase und eine farblose Oberphase. Diese wässrige Oberphase, in der die RNA angereichert war, wurde abpipettiert und in ein zweites Reagiergefäß übertragen. Die proteinhaltige Interphase und die Phenol-Chloroform-Phase wurden verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol (Merck, Darmstadt) wurde die RNA präzipitiert und nach kräftigem Durchmischen das Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4°C, so dass das RNA-Präzipitat als gelförmiges Sediment sichtbar wurde. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen und das Sediment mit 1 ml 100%igem Ethanol (Merck, Darmstadt) versetzt. Nach

kräftigem Schütteln wurde die Probe bei 7.500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, um überschüssige organische Anteile und Salze zu entfernen. Nach Zentrifugation mit 7.500 g bei 4°C für 5 min wurde der Überstand entfernt und das RNA-Sediment bei 56°C auf einem Thermoblock für 3-5 min getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Sediment in 10-20µl Tris-EDTA-(TE)-Puffer (Tris: Serva, Heidelberg; EDTA: Sigma, Heidelberg) aufgenommen und durch mehrmaliges Hin- und Herziehen mit einer Pipette gelöst.

3.2.5 Spectrophotometrische Bestimmung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch spectrophotometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Von der RNA-Suspension wurden 2 µl in 198 µl TE-Puffer verdünnt und die OD nach Kalibrierung des Photometers mit 200 µl TE-Puffer als Blindwert bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt die Berechnung der RNA-Konzentration in der Probe. Eine OD von 1 entspricht etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der gemessenen OD_{260} - zu OD_{280} -Werte lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA zu, ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 ist dabei optimal. Nach Berechnung der Gesamtmenge isolierter RNA wurden Aliquots mit jeweils 1 µg RNA/4 µl DEPC-Wasser (Sigma, Deisenhofen) angesetzt und bei -80°C tiefgefroren.

3.2.6 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die Synthese der cDNA erfolgt, indem mit Hilfe einer enzymatisch katalysierten Reaktion mRNA in cDNA übersetzt wird. Die isolierte RNA dient bei diesem, als Reverse Transkription (RT) bezeichneten Prozess, als Matrize für die Synthese eines doppelsträngigen DNA-Stranges. Die Reverse Transkriptase (RTase) synthetisiert Desoxynukleosid-Triphosphate komplementär zum RNA-Strang und benötigt als Startsequenz für die Synthese eines DNA-Stranges einen kurzen, doppelsträngigen Nukleinsäurebereich, der durch die Reaktion von Oligonukleotiden (Oligo dT) mit

dem im RNA-Strang vorhandenen polyadenylierten Bereich (Poly A-Schwanz) entsteht.

Es wurden 1 µg Gesamt-RNA (1µgRNA/4µl DEPC-Wasser) mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (1µg/µl) (Pharmacia, Freiburg) und 5 µl DEPC-Wasser in einem Reagierröhrchen vermengt und für 5 min bei 60°C auf einem Thermocycler inkubiert. Nachfolgend wurde ein Reaktions-Gemisch bestehend aus:

- 0,5 µl RNAsin (20U)
- 8,0 µl 5 x First-Strand-Reaktionspuffer
- 4,0 µl DTT (0,1 mol/l)
- 4,0 µl dNTP (10 mmol/l)
- 2,0 µl RTase (200 U/µl)

angesetzt und mit dem Reaktionsansatz aus RNA und Oligo (dT)₁₂₋₁₈ gemischt. Dieses Gemisch wurde bei 37°C für 1 h und bei 72°C für 10 min inkubiert. Ein Teil der synthetisierten cDNA wurde nachfolgend in der PCR zur Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente eingesetzt, während die restliche Menge bei -80°C eingefroren wurde.

3.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente der neu synthetisierten cDNA wurde die PCR nach der Methode von Watson und Demmer (1995) durchgeführt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Primerpaare der antioxidativen Enzyme angegeben sowie die Primerpaare für β-Actin 540 und β-Actin 795, welche als Haushaltsgene dienen (Alonso et al., 1986). Die Primer wurden synthetisch hergestellt und von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen (Tab. 1)

Zu dem Reaktionsgemisch bestehend aus:

- 23,5 µl DEPC-Wasser
 - 5,0 µl 10 x Reaktionspuffer
 - 3,0 µl MgCl₂ (25 mmol/l)
 - 8,0 µl dNTP (1,25 mmol/l)
 - 2,5 µl 5'-Primer (4 µM)
 - 2,5 µl 3'-Primer (4 µM)
-

0,5 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)

wurden 5 µl der synthetisierten cDNA zugegeben und die Proben in den Thermocycler gegeben. Die DNA wurde für 5 min bei 94°C denaturiert; der anschließende Reaktionszyklus aus a) Denaturierung für 1 min bei 94°C, b) Primer-Anhybridisierung für 1 min bei einer für die jeweiligen Primer spezifischen Temperatur (siehe Tabelle 1) und c) Auffüllreaktion für 1 min bei 72°C wurde entsprechend der Primerspezifischen Zyklenzahl wiederholt (Tabelle 1). Abschließend wurde das PCR-Gemisch für 10 min bei 72°C inkubiert und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt.

mRNA	Primersequenz (5'-Primer/ 3'-Primer)	Produktlänge (bp)	Hybridisierungstemperatur (°C)	Anzahl Zyklen
CAT	5' Primer cgttttacatccaggtcat 3' Primer gcgttcttaggcttctcag	691	54	35
CuZn SOD	5' Primer ggacctcattttaatcctc 3' Primer cgatcttcaatggacacat	125	52	35
Mn SOD	5' Primer tcaacgccaccgaggagaagta 3' Primer caatgtggccgtgagtgaggt	507	57	30
GPx1	5' Primer gcgaagtgaatggtgagaa 3' Primer gctatccaaaaggtgacaa	525	55	43
GPx4	5' Primer cgaattctcagccaaggacat 3' Primer caggattcgtaaaccacactc	169	58	35
β-Actin 540	5' Primer gtggccgctctaggcaccaa 3' Primer ctcttgatgtcacgcacgatttc	540	55	30
β-Actin 795	5' Primer aagtaccccattgaacatg 3' Primer aggagcaatgatcttgatc	795	55	22

Tabelle 1: Primer-Paare für die PCR der Enzyme CAT, CuZnSOD, MnSOD, GPx1, GPx4 und der Haushaltsgene β-Actin 540 und β-Actin 795

3.2.8 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde eine Methode entwickelt, die die Reverse Transkription (RT) mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) verbindet. Hierbei wird die mRNA durch die Reverse Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) übersetzt, die dann als Template für die nachfolgende PCR dient. Bei der von Mullis und Faloona (1987) entwickelten Methode der PCR handelt es sich um eine enzymatische DNA-Vervielfältigungsmethode, bei der *in vitro* in mehreren Schritten spezifische Primer (Oligonukleotide) entlang der Matrizen DNA verlängert werden, so dass Nukleotidstränge definierter Länge und Sequenz angereichert werden. Die Temperatur des Thermoblocks wechselt dabei periodisch, so dass die entstandenen DNA-Doppelstränge wieder denaturiert werden, die Primer sich erneut an die Einzelstränge anlagern und diese verlängern können. Bei dieser Methode wird die Hitzestabilität des Enzyms Taq-Polymerase, das aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde, ausgenutzt, dessen Temperaturoptimum über 70°C liegt. Bei jedem Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Auffüllreaktion, kommt es zu einer Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Fragmente und damit zu einer exponentiellen, etwa $10^6 - 10^7$ fachen Anreicherung dieser durch die Primer flankierten DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987).

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA-Bereiche zu erkennen.

3.2.9 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Zur elektrophoretischen Trennung der amplifizierten PCR-Produkte wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel verwendet, welches mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (ICN Biochemicals GmbH, Eschwege) versetzt wurde. Je 10 µl der PCR-Proben wurden mit 3 µl eines Auftragepuffers gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer war mit 100fach verdünntem TAE-Puffer gefüllt. Außerdem wurde 1 µl eines Molekulargewichts-markers (250 µg/ml), der den Bereich 154 - 2176 Basenpaare (bp) umfasste mit 9 µl DEPC-Wasser verdünnt, mit 3 µl Auftragepuffer gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei

120 V und 50 mA für 40 - 45 min. Im UV-Transluminator wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht und anschließend im Lumilmager quantifiziert.

3.2.10 Quantitative Analyse der PCR-Produkte

Das Verhältnis des Intensitätssignals des untersuchten PCR-Produkts zu dem des β -Actin wurde berechnet.

3.2.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden innerhalb jeder einzelnen Gruppe der Mittelwert (\bar{X}) sowie die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t -Testes bestimmt. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt (Tabelle 2, Tabelle 3).

4. Ergebnisse

4.1 Differentielle mRNA-Expression von CuZnSOD in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ

In Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts wurde ex vivo CuZnSOD konstitutiv exprimiert (C). Wie in Abbildung 7 gezeigt, fand man in den Inseln sowohl unbehandelter (C) wie auch STZ-behandelter männlicher Mäuse am Tag 1 (1) und am Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion eine sehr niedrige mRNA-Expression der CuZnSOD. In weiblichen Mäusen entsprach die konstitutive Expression in etwa der der männlichen Mäuse. Schon am Tag 1 nach der letzten STZ-Injektion erhöhte sich in den weiblichen Mäusen die Genexpression signifikant (* $p < 0,05$ vs. Kontrollen) und wurde am Tag 3 noch weiter gesteigert (** $p < 0,01$ vs. Kontrollen).

4.2 Differentielle mRNA-Expression von MnSOD in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ

In pankreatischen Inseln männlicher wie auch weiblicher C57BL/6-Mäuse wurde MnSOD konstitutiv exprimiert (C). STZ-behandelte männliche Mäuse zeigten am Tag 1 (1) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine in etwa gleich hohe MnSOD-Expression, am Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion beobachtet man eine leichte Erniedrigung der Genexpression im Vergleich zu den männlichen Kontrollmäusen (C). Diese Abnahme der mRNA-Expression war jedoch nicht signifikant. In weiblichen Mäusen entsprach die konstitutive Expression der MnSOD der pankreatischen Inseln in etwa der der männlichen Mäuse. Behandlung mit MLD-STZ resultierte in weiblichen Mäusen in einer Hochregulation der MnSOD auf mRNA-Ebene. Diese Hochregulation war am Tag 1 (1) stark ausgeprägt (* $p < 0,05$ vs. Kontrollen) und wurde am Tag 3 (3) sogar fast um das dreifache gesteigert (** $p < 0,001$ vs. Kontrollen) (Abb. 8).

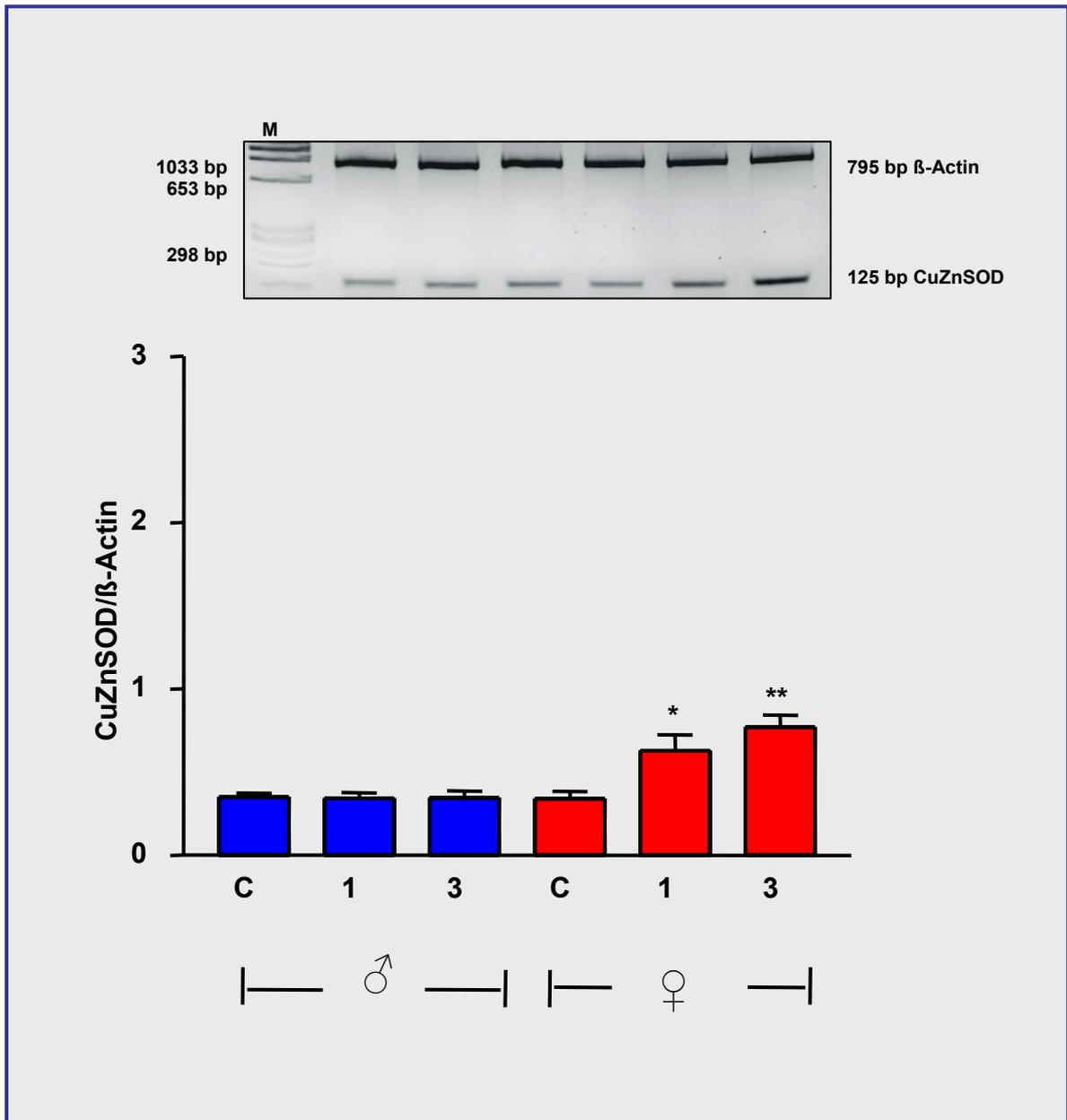


Abb. 7: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von CuZnSOD zu β -Actin in Inseln männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die pankreatischen Inseln am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Inseln un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. un behandelter Kontrollen; bp: Basen-Paare; M: Marker

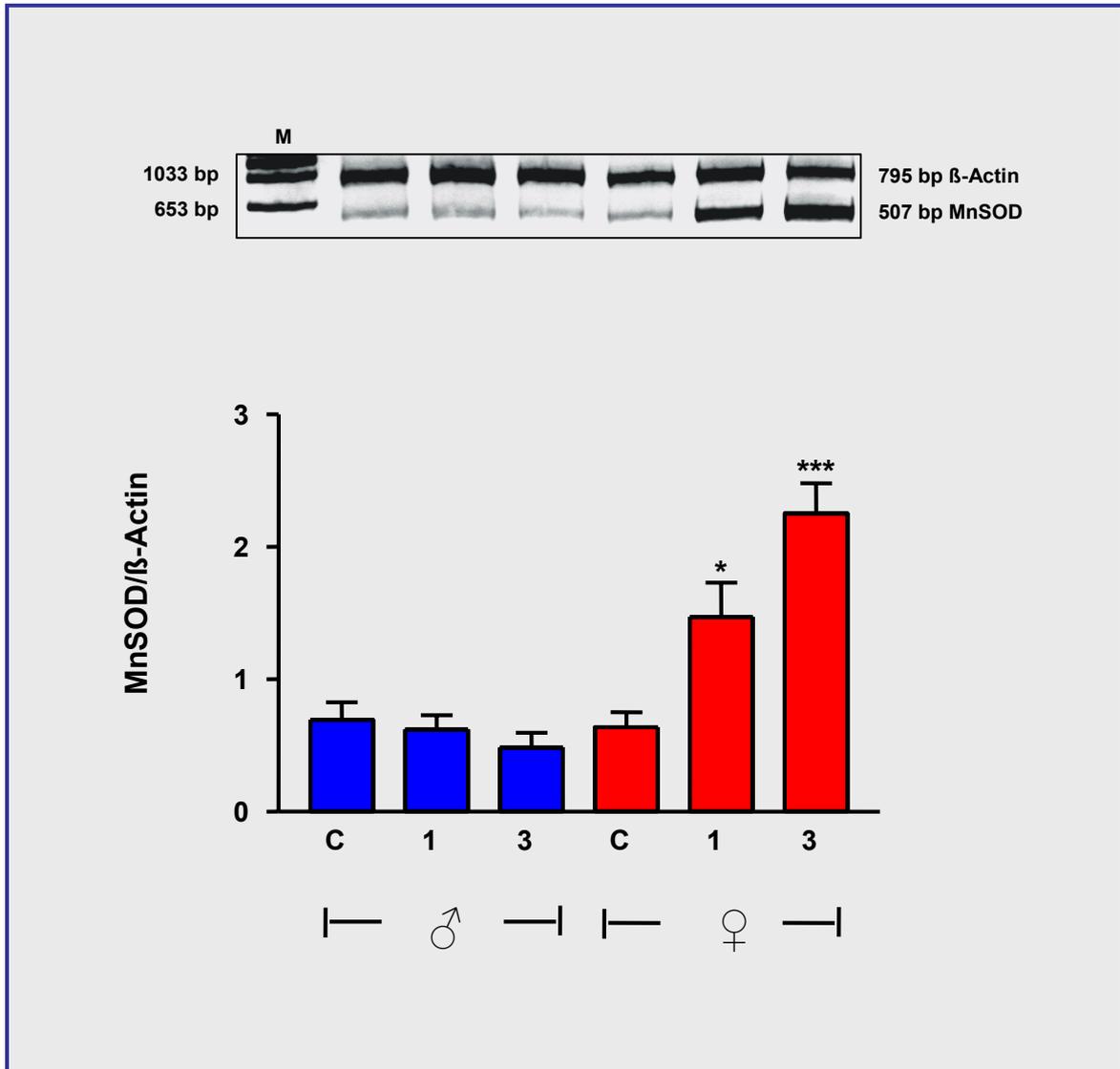


Abb. 8: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von MnSOD zu β -Actin in Inseln männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die pankreatischen Inseln am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Inseln un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. *p < 0,05; ***p < 0,001 vs. un behandelter Kontrollen; bp: Basen-Paare; M: Marker

4.3 Differentielle mRNA-Expression von CAT in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ

Die konstitutive mRNA-Expression (C) der CAT war in Inseln männlicher und weiblicher Mäuse in etwa gleich stark. Wie in Abbildung 9 dargestellt zeigte sich am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion in männlichen Mäusen eine leichte Erhöhung der Genexpression der CAT. In weiblichen C57BL/6-Mäusen erkennt man am Tag 1 (1) eine leichte Erhöhung der CAT Expression, die am Tag 3 (3) beinahe das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (C) betrug (**p < 0.01 vs. Kontrollen).

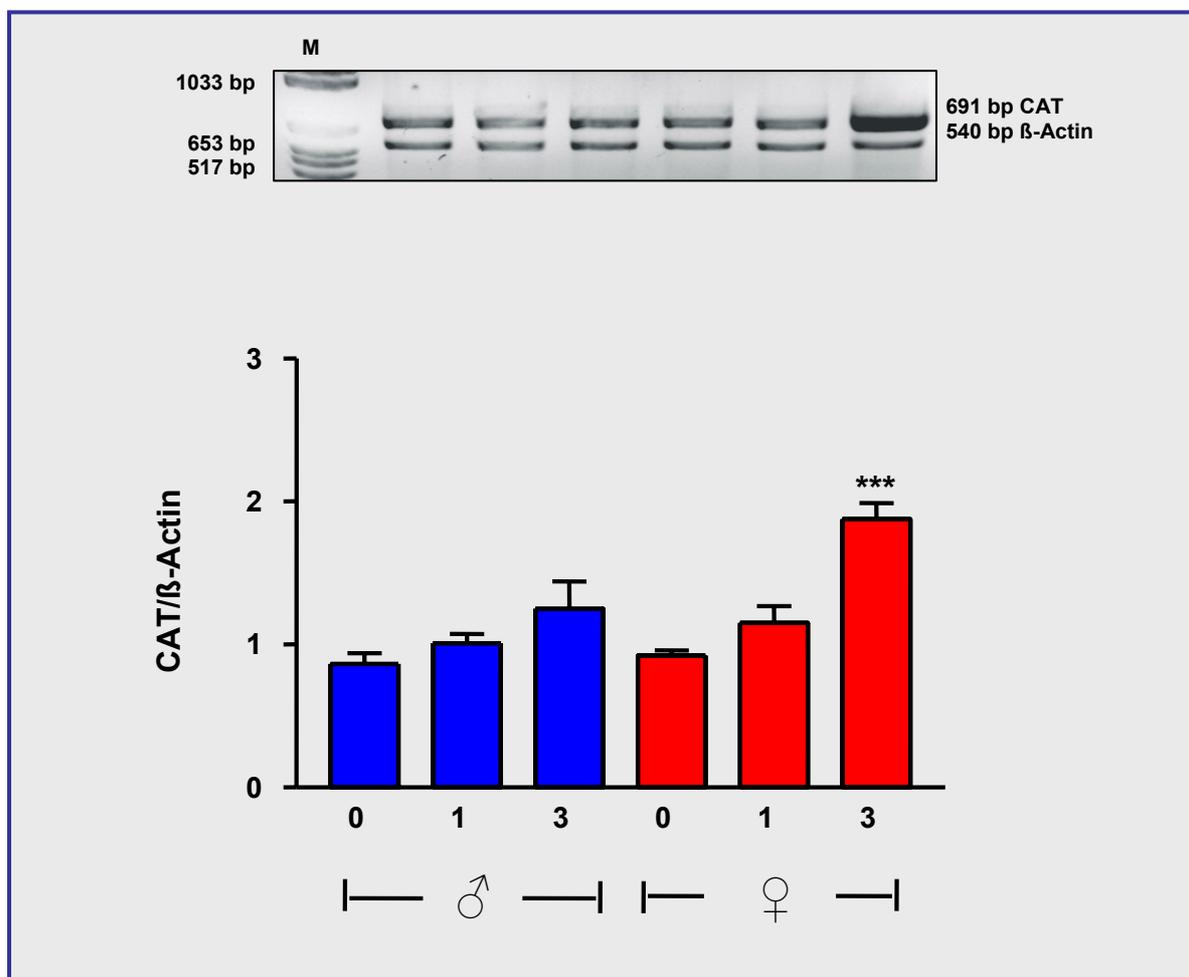


Abb. 9: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von CAT zu β -Actin in Inseln männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die pankreatischen Inseln am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Inseln un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. *p < 0,05; ***p < 0,001 vs. un behandelter Kontrollen; bp: Basen-Paare; M: Marker

4.4 Differentielle mRNA-Expression von GPx1 in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ

In pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher Mäuse wurde die GPx1 konstitutiv (C) in etwa gleich stark exprimiert. Männliche C57BL/6-Mäuse reagierten auf MLD-STZ mit einer leichten Erhöhung der GPx1-Expression am Tag 1 (1) und am Tag 3 (3), die jedoch nicht signifikant war. In weiblichen Mäusen resultierte die MLD-STZ-Behandlung am Tag 1 (1) in einer leichten Erhöhung der GPx1 Expression, die am Tag 3 (3) noch signifikant gesteigert wurde (* $p < 0,05$ vs. Kontrollen) (Abb. 10).

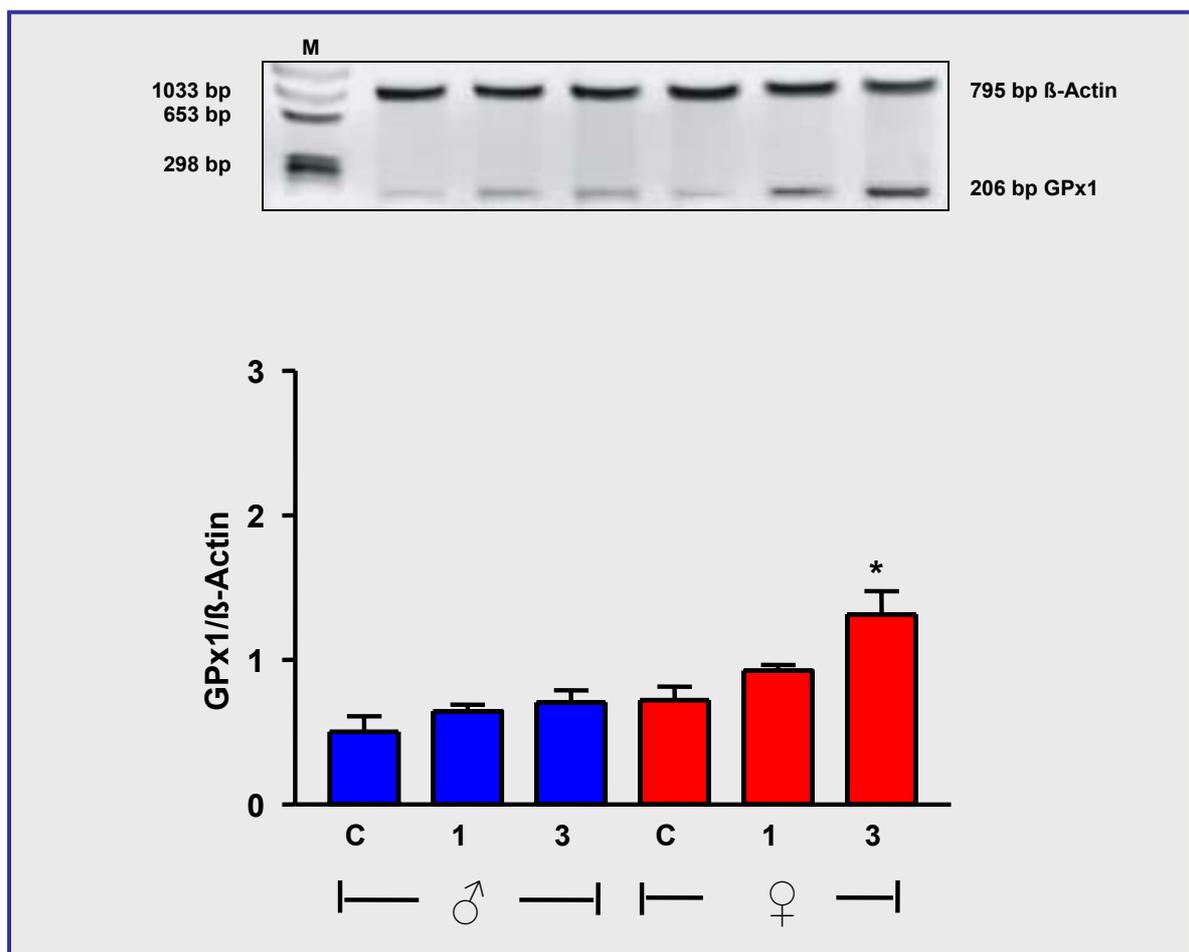


Abb. 10: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von GPx1 zu β -Actin in Inseln männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die pankreatischen Inseln am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Inseln un behandelter Mäuse dienen als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. * $p < 0,05$ vs. un behandelter Kontrollen; bp: Basen-Paare; M: Marker

4.5 Differentielle mRNA-Expression von GPx4 in pankreatischen Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse nach MLD-STZ

Pankreatische Inseln männlicher sowie weiblicher Mäuse exprimierten konstitutiv nur schwach die GPx4 (C). In männlichen Mäusen hatte die Behandlung mit MLD-STZ keinerlei Effekt auf die Genexpression von GPx4. Aber weibliche C57BL/6-Mäuse reagierten auf die Behandlung mit MLD-STZ durch Hochregulation der mRNA-Expression der GPx4 (Abb. 11). Diese war am Tag 1 (1) gering ausgeprägt und wurde am Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion signifikant gesteigert (*p < 0,05 vs. Kontrollen).

4.6 MLD-STZ hat keinen Effekt auf die mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4 in Lebergeweben männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse

In Lebergeweben männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse wurden die antioxidativen Enzyme CuZnSOD (Abb. 12A), MnSOD (Abb. 12B), CAT (Abb. 13), GPx1 (Abb. 14A) und GPx4 (Abb. 14B) exprimiert. Die Behandlung mit MLD-STZ hatte in Mäusen beiderlei Geschlechts keinen Effekt auf die mRNA-Expression der untersuchten Enzyme.

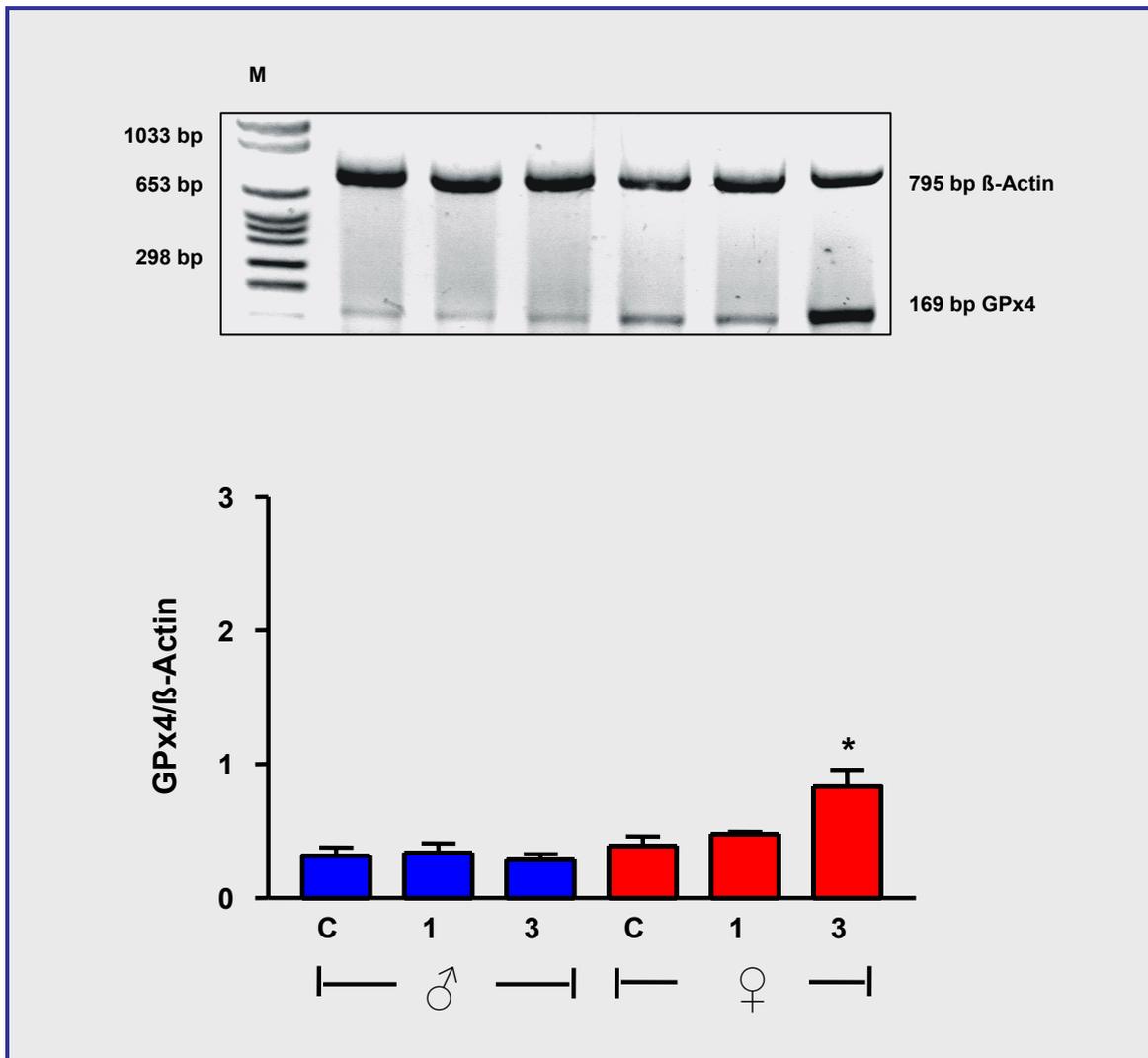


Abb. 11: PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von GPx4 zu β -Actin in Inseln männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die pankreatischen Inseln am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Inseln un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. * $p < 0,05$ vs. un behandelter Kontrollen; bp: Basen-Paare; M: Marker

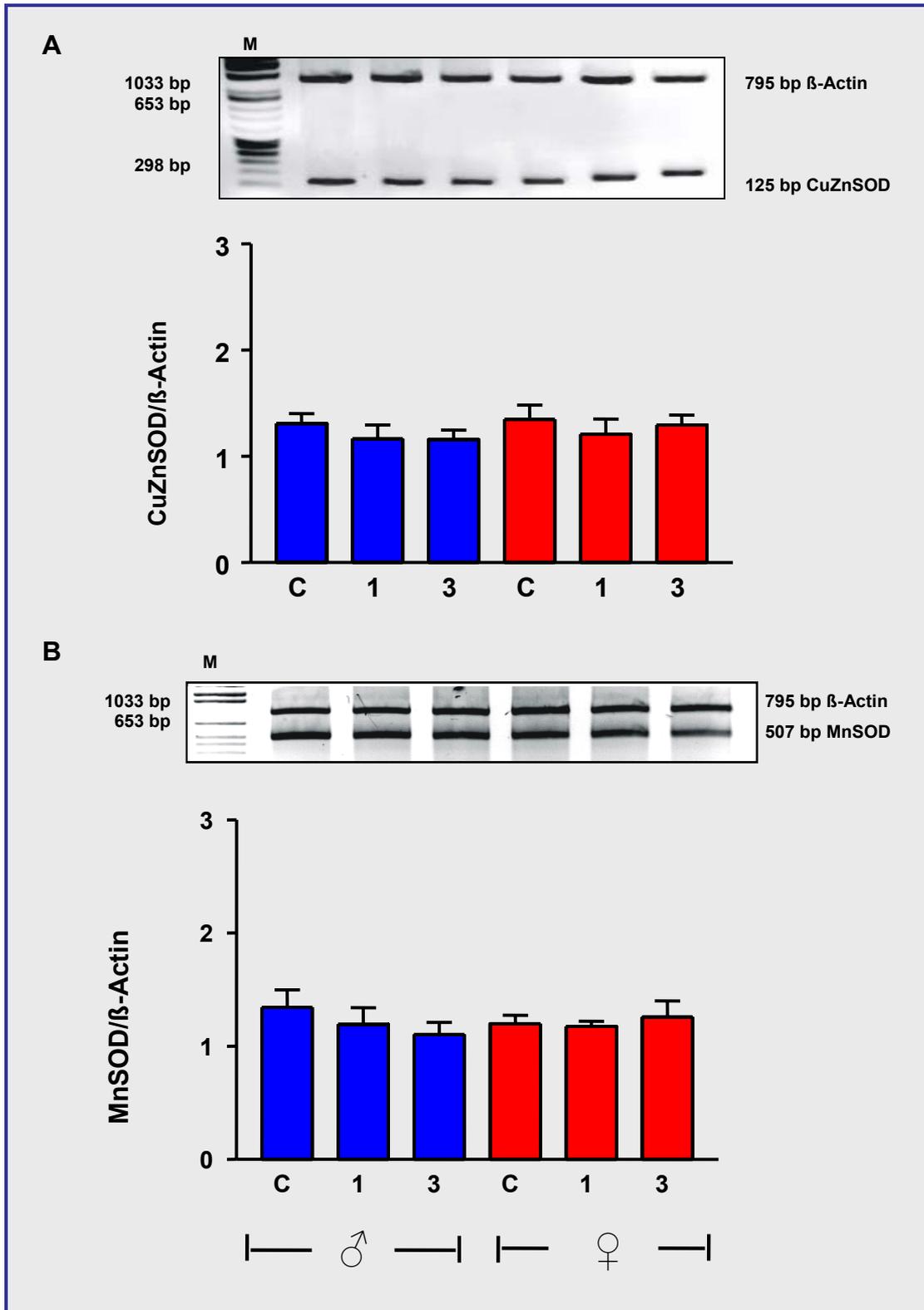


Abb. 12: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von CuZnSOD (**A**) und MnSOD (**B**) jeweils zu β -Actin in Lebergewebe männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die Leberproben am Tag 1 (1) und Tag 3 (3) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Lebern un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (C). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. bp: Basen-Paare; M: Marker

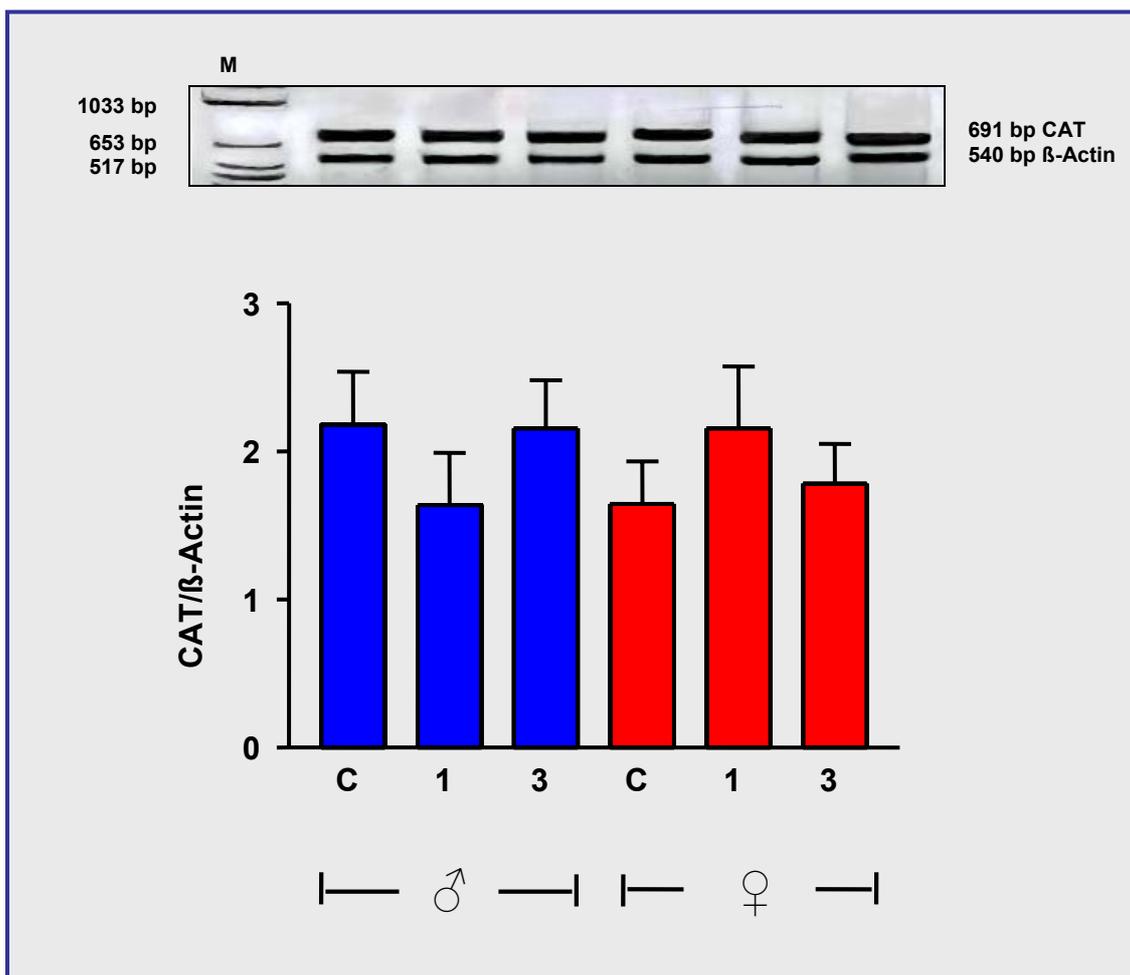


Abb. 13: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von CAT zu β -Actin in Lebergewebe männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die Leberproben am Tag 1 (**1**) und Tag 3 (**3**) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Lebern un behandelter Mäuse dienten als Kontrolle (**C**). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. bp: Basen-Paare; M: Marker

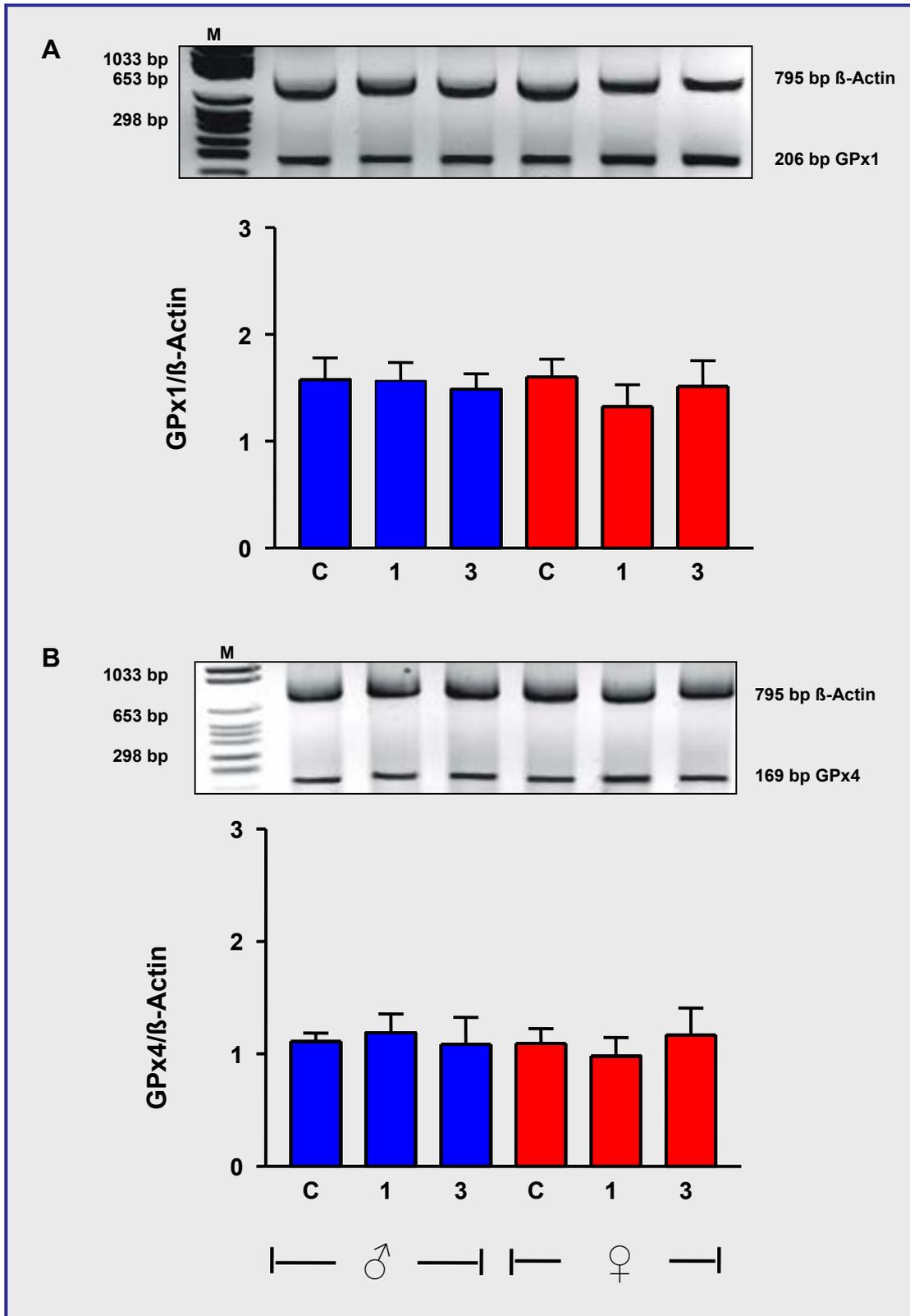


Abb. 14: RT-PCR-Produkte und RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von GPx1 (**A**) und GPx4 (**B**) jeweils zu β -Actin in Lebergewebe männlicher (♂) und weiblicher (♀) C57BL/6-Mäuse. C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden mit MLD-STZ behandelt und die Leberproben am Tag 1 (**1**) und Tag 3 (**3**) nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Lebern unbehandelter Mäuse dienten als Kontrolle (**C**). Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. bp: Basen-Paare; M: Marker

4.7 Tabellarische Darstellung der mRNA-Ergebnisse

Die Mittelwerte \pm SEM der mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4, die in den Abbildungen 7-14 illustriert wurden, sind tabellarisch für die pankreatischen Inseln (Tabelle 2) und für das Lebergewebe (Tabelle 3) zusammengestellt.

Geschlecht	Enzym	C	1	3
♂	CuZnSOD	0,350 \pm 0,026	0,344 \pm 0,035	0,346 \pm 0,043
♀	CuZnSOD	0,340 \pm 0,045	0,630 \pm 0,096*	0,770 \pm 0,075**
♂	MnSOD	0,695 \pm 0,133	0,622 \pm 0,107	0,485 \pm 0,112
♀	MnSOD	0,639 \pm 0,112	1,470 \pm 0,259*	2,253 \pm 0,228***
♂	CAT	0,865 \pm 0,073	1,009 \pm 0,065	1,250 \pm 0,191
♀	CAT	0,922 \pm 0,037	1,151 \pm 0,117	1,877 \pm 0,112***
♂	GPx1	0,503 \pm 0,108	0,647 \pm 0,045	0,707 \pm 0,083
♀	GPx1	0,724 \pm 0,093	0,927 \pm 0,040	1,317 \pm 0,159*
♂	GPx4	0,316 \pm 0,064	0,338 \pm 0,071	0,286 \pm 0,041
♀	GPx4	0,392 \pm 0,070	0,480 \pm 0,017	0,833 \pm 0,126*

Tabelle 2: Ex-vivo-mRNA-Expression von antioxidativen Enzymen ($X \pm SEM$) in pankreatischen Inseln unbehandelter Kontrollen (C) und am Tag 1 (1) und am Tag 3 (3) nach MLD-STZ-Behandlung. Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme erfolgte durch Berechnung des Quotienten des Intensitätssignals des PCR-Produktes des untersuchten antioxidativen Enzyms zu β -Actin. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. *p < 0,05 vs. Kontrolle; **p < 0,01 vs. Kontrolle; ***p < 0,001 vs. Kontrolle; ♂: männliche Mäuse; ♀: weibliche Mäuse

Geschlecht	Enzym	C	1	3
♂	CuZnSOD	1,309 ± 0,095	1,166 ± 0,131	1,158 ± 0,092
♀	CuZnSOD	1,348 ± 0,135	1,209 ± 0,141	1,296 ± 0,092
♂	MnSOD	1,344 ± 0,156	1,193 ± 0,148	1,104 ± 0,107
♀	MnSOD	1,199 ± 0,075	1,176 ± 0,046	1,259 ± 0,143
♂	CAT	2,180 ± 0,359	1,639 ± 0,352	2,156 ± 0,327
♀	CAT	1,646 ± 0,289	2,155 ± 0,117	1,783 ± 0,268
♂	GPx1	1,577 ± 0,204	1,567 ± 0,171	1,485 ± 0,146
♀	GPx1	1,604 ± 0,163	1,323 ± 0,207	1,513 ± 0,240
♂	GPx4	1,110 ± 0,076	1,188 ± 0,169	1,086 ± 0,241
♀	GPx4	1,094 ± 0,132	0,980 ± 0,166	1,168 ± 0,242

Tabelle 3: Ex-vivo-mRNA-Expression von antioxidativen Enzymen ($X \pm SEM$) in Lebergewebe unbehandelter Kontrollen (C) und am Tag 1 (1) und am Tag 3 (3) nach MLD-STZ-Behandlung. Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme erfolgte durch Berechnung des Quotienten des Intensitätssignals des PCR-Produktes des untersuchten antioxidativen Enzyms zu β -Actin. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten wieder. ♂: männliche Mäuse; ♀: weibliche Mäuse

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass 1) die antioxidativen Enzyme CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4 konstitutiv in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts exprimiert werden, 2) die Behandlung mit MLD-STZ Effekte auf die mRNA-Expression dieser antioxidativen Enzyme in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen hat, 3) die Behandlung von MLD-STZ zu einer differentiellen Regulierung der antioxidativen Enzyme in Diabetes-suszeptiblen männlichen und Diabetes-resistenten weiblichen C57BL/6-Mäusen führt und 4) MLD-STZ keinen Effekt auf die Regulierung der mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4 in Lebergewebe von C57BL/6-Mäusen hat.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde unterstreichen die Bedeutung antioxidativer Enzyme als Schutzmechanismus gegen die Entwicklung eines MLD-STZ-induzierten Diabetes. Nur in Diabetes-resistenten weiblichen C57BL/6-Mäusen wurde die mRNA-Expression aller untersuchten antioxidativen Enzyme signifikant gesteigert, wohingegen in Diabetes-empfindlichen männlichen Mäusen nach MLD-STZ-Behandlung keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression zu erkennen war. Offensichtlich war die Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes mit der fehlenden Hochregulation antioxidativer Enzyme in den männlichen Mäusen assoziiert. Es wird ersichtlich, dass nur die weiblichen Mäuse in der Lage waren, durch Aktivierung mehrerer antioxidativer Systeme, adäquat auf den von STZ-induzierten oxidativen Stress zu antworten und so vor einem MLD-STZ-induzierten Diabetes geschützt waren.

Die vorliegenden Befunde bestätigen und erweitern vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In vitro zeigte Gille et al. (2002) nach STZ-Behandlung in pankreatischen Inseln männlicher Mäuse eine H_2O_2 -Generierung und konnten zudem die hochreaktiven $\cdot\text{OH}$ nachweisen. Auch ex vivo wurde erstmals durch Friesen et al. (2004) gezeigt, dass H_2O_2 mit der Pathogenese des MLD-STZ-induzierten Diabetes assoziiert ist. Eine gesteigerte Generierung von H_2O_2 fand sich dabei nur in den pankreatischen Inseln der MLD-STZ-behandelten Diabetes-empfindlichen männlichen Mäuse, dagegen nicht in MLD-STZ-behandelten Diabetes-resistenten weiblichen Mäusen.

Es wird postuliert, dass ROS als nicht-spezifische Mediatoren der β -Zell-Destruktion im immunologisch mediierten Diabetes eine essentielle Rolle spielen (Oberley, 1988; Rabinovitch und Suarez-Pinzon., 1998). Der Schaden durch ROS wird jedoch nicht nur durch die Menge der Bildung von freien Radikalen bestimmt, sondern hängt wesentlich vom antioxidativen Status der Zelle ab. Die β -Zellen weisen im Vergleich zu anderen Organen, wie Leber und Niere, eine deutlich reduzierte bis nicht detektierbare Expression der antioxidativen Enzyme CuZnSOD, MnSOD, CAT und GPx auf. Diese niedrige Ausstattung mit antioxidativen Enzymen konnte bereits in pankreatischen Inseln von Ratten (Tiedge et al., 1997) und von fettleibigen, normalgewichtigen (Grankvist et al., 1981) und Albino-Mäusen (Lenzen et al., 1996), in Insulin-produzierenden RINm5F-Zellen (Tiedge et al., 1997) sowie in der vorliegenden Arbeit in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen gezeigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wird vermutet, dass die geringe Ausprägung des antioxidativen Systems die erhöhte Vulnerabilität der β -Zelle gegenüber oxidativem Stress zur Folge haben könnte. Möglicherweise ist auch ein Mangel an Antioxidantien in humanen β -Zellen ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes. Durch Überexpression verschiedener antioxidativer Enzyme in Mäusen und Zellreihen konnte deren Sensitivität gegenüber ROS verändert werden. Durch selektive Überexpression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 oder GPx4 wurde eine Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von ROS, Chemikalien oder Zytokinen sowohl in vitro (Hohmeier et al., 1998; Tiedge et al., 1998; Xu et al., 1999) als auch in vivo (Kubisch et al., 1997; Xu et al., 1999) erreicht.

Ohly et al. (2000) gelang der Nachweis, dass orale Gabe von Zinksulfat die Expression von MT in pankreatischen Inseln induzierte und männliche C57BL/6-Mäuse vor einem MLD-STZ-induzierten Diabetes schützte. Es wird postuliert, dass MT als Scavenger von $\cdot\text{OH}$ β -Zellen vor deren Schäden schützen kann.

Die Infiltration der pankreatischen Inseln mit mononukleären Zellen -Insulitis-, die Induktion inflammatorischer Prozesse an perivaskulären und intransulinären Strukturen der pankreatischen Insel sowie die Generierung von ROS könnten die Hochregulation antioxidativer Enzyme stimulieren. Dies sei dann als eine Art Reaktion zu werten, um die Zelle zu schützen. Diese Zellantwort auf oxidativen Stress zeigte sich jedoch nur bei weiblichen, nicht bei männlichen C57BL/6-Mäusen.

Diese Überlegungen werden durch folgende Befunde und Ergebnisse unterstützt:

1) Während der prä-diabetischen Phase mit T-zellabhängiger Insulitis (Klinkhammer

et al., 1988) kommt es zu einer übermäßigen ROS-Generierung (Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998). Während hohe Konzentrationen von ROS die Kapazität des antioxidativen Systems der β -Zelle erschöpfen und zu direkter β -Zelltoxizität führen, könnten niedrigere Konzentrationen von ROS zum einen als Stimulator für antioxidative Schutzmechanismen, zum anderen als Signaltransduktoren wirken (Schulze-Osthoff et al., 1995; Sen und Packer, 1996; Lander, 1997; Palmer und Paulsen, 1997; Ho und Bray, 1999). 2) Weiterhin wurde bereits in unserem Labor gezeigt, dass MLD-STZ die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Mikromilieu pankreatischer Inseln von Mäusen beiderlei Geschlechts hochregulierte, dagegen die Expression anti-inflammatorischer Zytokine nur in Inseln von männlichen Mäusen reduzierte (Müller et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde nur in Inseln von Diabetes-empfindlichen männlichen Mäusen, AP-1 sowohl in Inseln von männlichen als auch von weiblichen Mäusen nach MLD-STZ-Behandlung hochreguliert (Lgssiar et al., 2004). Berichtet wurde auch, dass ROS selbst in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren (Baeuerle und Baltimore, 1988). Der aktivierte NF- κ B ist nun in der Lage, in den Nukleus zu translozieren, um dort die Aktivierung verschiedener Gene, wie für TNF α , IFN γ und iNOS zu modulieren (Xie et al., 1994; Barnes und Karin., 1997; Nakamura et al., 1997). Eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B resultiert dann in einer Amplifizierung dieser pro-inflammatorischen Zytokine, die ihrerseits wiederum selbst die ROS-Bildung stimulieren. Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF), dessen Hauptbestandteil INF γ darstellt sowie das von NF- κ B ebenfalls regulierte Chemokin Makrophagen-chemotaktisches Protein (MCP)1 könnten in einer Migration der Makrophagen in die pankreatischen Inseln resultieren. Aktivierte Makrophagen bilden zum einen selbst ROS, zum anderen setzen sie pro-inflammatorisches IL-1 frei. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die ROS-Generierung die Ursache für den β -Zelltod ist, oder ob es sich bei der ROS-Generierung um eine Folgereaktion in der Progression der Diabetespathogenese handelt. Eine eindeutige Antwort auf diese Frage bleibt bis heute aus.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation der mRNA-Expression von CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx1 und GPx4 in weiblichen Mäusen, diese vor MLD-STZ-induzierten Diabetes schützte. Ein nicht ausreichend adaptatives antioxidatives System der männlichen C57BL/6-Mäuse könnte für deren Suszeptibilität für einen MLD-STZ-Diabetes verantwortlich sein. Klinische Studien haben eben-

falls gezeigt, dass der antioxidative Status von Patienten mit Autoimmundiabetes signifikant reduziert war (Maxwell et al., 1997).

SOD katalysiert die Umwandlung von $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 , welches wiederum die Vorstufe für $\cdot OH$ darstellt, eine in höchstem Maße toxische Spezies aus der Gruppe der ROS. Daraus folgt, je mehr H_2O_2 zur Verfügung steht, desto mehr würde die Fenton Reaktion angetrieben und desto mehr $\cdot OH$ würde gebildet. Ein anderer Mechanismus zur Wirkungsweise der SOD wird diskutiert: SOD könnte auch die Bildung von $ONNO^-$ aus $O_2^{\cdot-}$ und NO verhindern, welches sonst teilweise zu $\cdot OH$ zerfallen würde (Beckmann, 1996). Auf dieser Wirkungsweise basierend würde SOD zu einer Reduktion der ROS führen, wie es schon von unserem Labor (Gille et al., 2002) und von anderen Autoren beschrieben wurde (Lortz et al., 2000; Kubisch et al., 1997).

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von MnSOD in weiblichen Mäusen sehr stark war. Wir vermuten daher, dass STZ die mitochondriale $O_2^{\cdot-}$ -Bildung erhöhte, und dass nur die weiblichen C57BL/6-Mäuse in der Lage waren, adäquat auf diesen oxidativen Stress mit einer Hochregulation der MnSOD im Sinne einer Zellantwort zu reagieren. Ein Schutz durch Hochregulation der MnSOD könnte auch auf Inhibition der iNOS und dadurch auf verminderter NO^{\cdot} -Bildung beruhen, welches sonst mit $O_2^{\cdot-}$ zusammen $ONOO^-$ bilden. $ONOO^-$ selbst gilt als mögliche Quelle zur Generierung der hochtoxischen $\cdot OH$. Diese Hypothese basiert auf den Ergebnissen, dass eine Überexpression von MnSOD in Insulinomazellen zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression der iNOS und der NO^{\cdot} -Produktion führte (Hohmeier et al., 1998). Dieser Erklärungsversuch wird durch die Untersuchung von Kolb et al. (1991) gestützt, in der gezeigt werden konnte, dass durch Zugabe eines iNOS-Inhibitors in Mäusen ein MLD-STZ-induzierter Diabetes unterdrückt werden konnte.

Wie bereits zuvor beschrieben, wird nach MLD-STZ-Behandlung in pankreatischen Inseln das pro-inflammatorische Zytokin $TNF\alpha$ hochreguliert. In einer von Wong und Goeddel (1988) publizierten Arbeit wurde die selektive Induktion der MnSOD durch $TNF\alpha$ untersucht. Weder die mRNA-Expression von CuZnSOD, CAT, noch von GPx wurden dabei durch die Behandlung mit $TNF\alpha$ verändert. $TNF\alpha$ könnte so über die Induktion der MnSOD einen protektiven Mechanismus initiieren. Fraglich wäre dann jedoch der fehlende protektive Effekt in männlichen Mäusen, da $TNF\alpha$ sowohl in männlichen als auch in weiblichen MLD-STZ-behandelten C57BL/6-Mäusen hochreguliert wurde (Müller et al., 2002). Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine eventuel-

le Abhängigkeit der $\text{TNF}\alpha$ -Effekte von der Höhe der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren. Eine Untersuchung bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren in β -Zellen männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse erfolgte bis jetzt nicht.

In dieser Arbeit gelang es erstmals die mRNA-Expression von CAT und GPx1 in pankreatischen Inseln nachzuweisen und korreliert nicht vollständig mit den Ergebnissen in Ratteninseln (Tiedge et al., 1997). Ebenfalls wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression von GPx4 in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen. CAT sowie GPx1 sind im Cytosol der Zelle lokalisiert, während GPx4 als Phospholipid-Hydroperoxidase sich in der Zellmembran befindet. Indem CAT und die Isoformen der GPx H_2O_2 zu Wasser reduzieren, verhindern sie eine Akkumulation von H_2O_2 , das sonst in der Fenton Reaktion zu $\cdot\text{OH}$ reagieren könnte. Eine Hochregulation der Genexpression von CAT und den beiden untersuchten Isoformen GPx1 und GPx4 nach MLD-STZ-Behandlung wurde nur in den weiblichen C57BL/6-Mäusen beobachtet, in den männlichen Mäusen wurde nur die mRNA-Expression der CAT leicht erhöht, die Selen-abhängige GPx blieb dagegen in männlichen C57BL/6 Mäusen durch MLD-STZ unbeeinflusst.

Die biologische Rolle des Selens wurde bisher nur unzureichend untersucht. In vitro wurde aber bereits gezeigt, dass eine Selen-Defizienz die Aktivität von GPx1 und GPx4 verminderte (Weitzel und Wendel, 1993). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen Selen und der Bindungskapazität von NF- κ B gefunden (Gagern von et al., 1999).

Basierend auf dem Nachweis der differentiellen Regulierung antioxidativer Enzyme in männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen nach MLD-STZ-Behandlung, soll im Folgenden die Bedeutung der Sexualhormone im Hinblick auf die Diabetes-Empfänglichkeit diskutiert werden. Im MLD-STZ Diabetes-Modell der C57BL/6-Maus erweisen sich männliche Mäuse empfänglicher für einen STZ-induzierten Diabetes als weibliche. Eine Kastration der weiblichen Mäuse, ebenso wie eine Behandlung mit Testosteron, erhöhte deren Sensitivität für einen MLD-STZ-Diabetes, während die Kastration der männlichen Mäuse deren Sensitivität verringerte (Rossini et al., 1978b; Le et al., 1985). Die Vorbehandlung mit Östrogenen erniedrigte leicht die Sensitivität bei männlichen Mäusen für einen MLD-STZ-Diabetes, Gabe von Antandrogenen verhinderte komplett die Entwicklung eines Diabetes (Maclaren et al., 1980). Daraus ergibt sich die Überlegung, ob eine Behandlung der männlichen

Mäuse mit Östrogenen bzw. die Behandlung der weiblichen Mäuse mit Testosteron oder eine Kastration bzw. eine Ovariectomie eine Invertierung der hier erhobenen Ergebnisse bewirkt. Die Antwort bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Diese Arbeit gibt weitere Hinweise darauf, dass STZ eine β -zelltropische Wirkung besitzt, da die Effekte von MLD-STZ auf die mRNA-Expression der untersuchten antioxidativen Enzyme auf die pankreatischen Inseln begrenzt und keine Effekte in der Leber zu beobachten waren. Anzunehmen ist, dass für die β -zelltropische Wirkung des STZ dessen Glucosekomponente eine wichtige Rolle spielt. Über den GLUT2 gelangt STZ spezifisch in die β -Zelle. Dies erklärt auch die Protektion vor dem MLD-STZ-induzierten Verlust der β -zellvermittelten Glucoseantwort durch Vorbehandlung mit 5-Thio-D-Glucose (Wang et al., 1993).

Die vorliegende Arbeit verstärkt und erweitert vorangegangene publizierte Ergebnisse und bestätigt, dass eine Hochregulation multipler antioxidativer Enzyme weibliche C57BL/6-Mäuse vor einem MLD-STZ-induzierten Diabetes schützt. Anhand der hier erhobenen Ergebnisse ist zu erwägen, welche Strategien für eine Intervention und/oder Therapie für den Menschen zu rechtfertigen sind. So könnte bei Inseltransplantationen bei Patienten mit einem autoimmunen Diabetes der Versuch unternommen werden, antioxidative Enzyme zu überexprimieren, um einen Schutz vor Abstoßungsreaktionen zu erzielen.

6. Literaturverzeichnis

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

Alonso S, Minty A, Bourlet Y, Buckingham M: Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warmblooded vertebrates. *J Mol Evol* 23: 11-22, 1986

Azevedo-Martins AK, Lortz S, Lenzen S, Curi R, Eizirik DL, Tiedge M: Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced NF- κ B activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 52: 85-97, 2003

Baena RM, Campoy C, Bayes R, Blanca E, Fernandez JM, Molina-Font JA: Vitamin A, retinol binding protein and lipids in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 56: 44-50, 2002

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

Baeuerle PA und Henkel T: Function and activation of NF κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179, 1994

Balin AK und Allen RG: Mechanisms of biologic aging. *Dermatol Clin* 4: 347-358, 1986

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

Basu TK und Basualdo C: Vit A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutr* 13: 804-806, 1997

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

Beal MF: Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38: 357-366, 1995

Beattie G, Lannon R, Lipsick J, Koplan NO, Osler AG: Streptozotocin-induced diabetes in athymic and conventional BALB/c mice. *Diabetes* 29: 146-150, 1980

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

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

Berdanier CD: Diabetes and nutrition: the mitochondrial part. *J Nutr* 131: 3445-3535, 2001

Beretta S, Sala G, Mattavelli L, Ceresa C, Casciati A, Ferri A, Carri MT, Ferrarese C: Mitochondrial dysfunction due to mutant copper/zinc superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis is reversed by N-acetylcysteine. *Neurobiol Dis* 13: 213-221, 2003

Borg LA, Cagliero E, Sandler S, Welsh N, and Eizirik DL: Interleukin-1 β increases the activity of superoxide dismutase in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 130: 2851-2857. 1992

Bostwick DG, Aleyander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong W, Jiang X, Oberley TD: Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 89: 123-134, 2000

Boucher DW, Hayashi K, Rosenthal J, Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus. III. Influence of the sex and strain of the host. *J Infect Dis* 131:462-6, 1975

Buschard K und Rygaard J: Passive transfer of streptozotocin induced diabetes mellitus with spleen cells. Studies of syngeneic and allogeneic transfer to normal and athymic mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 85C: 469-472, 1977

Buschard K, Madsbad S, Rygaard J: Passive transfer of diabetes mellitus from man to mouse. *Lancet* 1: 908-910, 1978

Cardinal JW, Allan DJ, Cameron DP: Differential Metabolite Accumulation May Be the Cause of Strain Differences in Sensitivity to Streptozotocin-Induced β Cell Death in Inbred Mice. *Endocrinology* 139: 2885-2891, 1998

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

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

Chen H, Carlson ED, Pellet L, Moritz JT, Epstein PN: Overexpression of Metallothionein in Pancreatic Beta Cells Reduces Streptozotocin Induced DNA Damage and Diabetes. *Diabetes* 50: 2040-2046, 2001

Chomczynski P und Sacchi N: Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987

Chubatsu LS und Meneghini R: Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J* 291: 1993-1998, 1993

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

Cousins RJ: Letter: Zinc-thionein and heritable disorders associated with aberrant zinc metabolism. *Lancet* 2: 686-687, 1976

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang L-Y: Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10405-10409, 1992

Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, Ritchie J, Domamm FE, Spitz D, Oberley LW: The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 63: 1297-12303, 2003

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

Dörner G, Eckert R, Hinz G: Androgen-dependent sexual dimorphism of the immune system. *Endokrinologie* 76: 112-114, 1980

Dominguez C, Ruiz E, Gussinye, Carrascosa A: Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 21: 1736-1742, 1998

Dutta A und Dutta SK: Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. *J Am Coll Nutr* 22: 258-268, 2003

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

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

Fariss MW, Nicholls-Grzemski FA, Tirmenstein MA, Zhang JG: Enhanced and cytoprotective abilities of vitamin E succinate is associated with a rapid uptake advantage in rat hepatocytes and mitochondria. *Free Radical Biol Med* 31: 530-541, 2001

Fariss MW und Zhang JG: Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology* 189: 129-146, 2003

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

Friesen NTE, Büchau AS, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H: Generation of hydrogen peroxide and a failure of antioxidative responses in pancreatic islets is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in male C57BL/6 mice. *Diabetologia* 47: 676-685, 2004

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

Gandy SE, Buse MG, Crouch RK: Protective role of SOD against diabetogenic drugs. *JCI* 70:650-658, 1982

Gartner R und Angstwurm M: Significance of selenium in intensive care medicine. Clinical studies of patients with SIRS/sepsis syndrom. *Med Klin* 94 Suppl. 3: 54-57, 1999

Gerasimov OV und Lymar SV: The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxyntrous acid. *Inorg Chem* 38: 4317-4321, 1999

Gibbs LS, Del Veccio PJ, Shaffer JB: Mn and Cu/Zn SOD expression in cells from LPS-sensitive and LPS-resistant mice. *Free Rad Biol Med* 12: 107-111, 1992

Gille L, Schott-Ohly P, Friesen N, Nicoletti F, Gleichmann H: Generation of hydroxyl radicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro. *Pharmacol Toxicol* 90: 317-326, 2002

Glennas A und Rugstad HE: Acquired resistance against gold(III)-chloride in cultured human cells. *Scand J Rheumatol* 14: 25-32, 1985

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

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

Greenwald RA: Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin Arthritis Rheum* 20: 219-240, 1991

Gundersen B: Is diabetes of infectious origin? *J Infect Dis* 41:197-202, 1927

Gutteridge JM, Rowley DA, Halliwell B: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of "catalytic" iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochem J* 202: 605-609, 1982

Gwinner W, Tisher CC, Nick HS: Regulation of manganese superoxide dismutase in glomerular epithelial cells: mechanisms for interleukin 1 induction. *Kidney International* 48: 354-362. 1995

Haber F und Weiss J: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal of London: Mathematics and Physical Society* 147: 332-351, 1934

Halliwell B: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals in vivo. *Biochem J* 205: 461-463, 1982

Halliwell B: Free Radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet* 344: 721-724, 1994

Hawkins T, Gala RR, Dunbar JC: The effect of neonatal sex hormones on the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Soc Exp Med* 202: 201-205, 1993

Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J: AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3633-3638, 1997

Ho E und Bray TM: Antioxidants, NF κ B Activation , and Diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 205-213, 1999

Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB: Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD9) in insulinoma cells prevents IL-1 β -induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest* 101:1811-1820, 1998

Holmgren A: Thioredoxin. *Annu rev Biochem* 54: 237-271, 1985

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

Houssay BA: Action of sex hormones on experimental diabetes. *Br Med J* 4730:505-510, 1951

Huber HE, Russel M, Model P, Richardson CC: Interaction of mutant thioredoxins of *Escherchia coli* with the gene 5 of phage T7. The redox capacity of thioredoxin is not required for stimulation of DNA polymerase activity. *J Biol Chem* 261: 15006-15012, 1986

Jacoby DB und Choi AM: Influenza virus induces expression of antioxidant genes in human epithelial cells. *Free Rad Biol Med* 16: 821-824, 1994

Jialal I, Deveraj S, Venugopal SK: Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res* 36: 1331-1336, 2002

Joseph BZ, Routes JM, Borish L: Activities of superoxide dismutases and NADPH oxidase in neutrophils obtained from asthmatics and normal donors. *Inflammation* 17: 361-370, 1993

Kawai Y, Kubota E, Okobe E: Reactive oxygen species participation in experementally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J Dent Res* 79: 1489-1495, 2000

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

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

Kolb H, Kiesel U, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Suppression of low dose streptozotocin induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor. *Life Sci* 49: 213-217, 1991

Kortuem K, Geiger LK, Levin LA: Differential susceptibility of retinal ganglion cells to reactive oxygen species. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 176-182, 2000

Kromann H, Christy M, Lernmark A, Nedergaard M, Nerup J: The Low Dose Streptozotocin Murine Model of Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Studies In Vivo and In Vitro of the Modulating Effect of Sex Hormones. *Diabetologia* 22: 194-198, 1982

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

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

Lander H: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Fed Am Soc Exp Bio J* 11: 118-124, 1997

Laurent TC, Moore EC, Reichard P: Enzymatic synthesis of desoxiribonukleotides. IV. Isolation and characterisation of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 239: 3436-3444, 1964

Le P, Leiter EH, Leyendecker JR: Genetic control of susceptibility to streptozotocin diabetes in inbred mice: Effect of testosterone and H-2 haplotype. *Endocrinology* 116: 2450-2455, 1985

LeBel CP und Bondy SC: Oxidative damage and cerebral aging. *Prog Neurobiol* 38:601-609, 1992

LeDoux SP, Woodley SE, Patton NJ, Wilson GL: Mechanisms of nitrourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes* 35: 866-872, 1986

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

Lgssiar A, Hassan M, Schott-Ohly P, Friesen N, Nicoletti F, Treppicio W, Gleichmann H: Interleukin-11 inhibits NF- κ B and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with streptozotocin in mice. *Exp Biol Med* 229: 425-436, 2004

Like AA und Rossini AA: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417, 1976

Lin Y, Kikuchi S, Obata Y, Yagyu K: Tokyo Research Group on Prevention of Gastric Cancer: Serum copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) and gastric cancer risk: a case-control study. *Jpn J Cancer Res* 93:1071-1075, 2002

Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW: Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Rad Biol Med* 14: 201-207, 1993

Liu RG, Buettner GR, Oberley LW: Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide gene expression by TNF- α . *Free Rad Biol Med* 28: 1197-1205, 2000

Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsen AE, Nerup J, Lenzen S: Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49: 1123-1130, 2000

Lubec G: The Hydroxyl Radical: From Chemistry to Human Disease. *J Investig Med* 44: 324-346, 1996

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

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Backman JS, Thompson JA: Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the Nat Acad of Sci of the USA* 93: 11853-11858, 1996

MacMillan-Crow LA und Cruthirds DL: Manganese Superoxide Dismutase in disease. *Free Rad* 34: 325-336, 2001

Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggerwal BB: Overexpression of Manganous Superoxide Dismutases supresses Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis and Activation of Nuclear Transcription Factor- κ B and Activated Protein-1. *Biol Chem J* 21:13245-13254, 1998

Marklund SL, Holme E, Hellner L: Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 126: 41-51, 1982

Mathieu C, Waer M Laureys J, Rutgeers O, Bouillon R: Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1.25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 37: 552-558, 1994

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

Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH: Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 27: 484-490, 1997

Mc Cord JM: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185:529-531, 1974

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

Moffatt P und Seguin C: Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA Cell Biol* 17: 501-510, 1998

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

Mullis KB und Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987

Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15: 351-369, 1997

Nakamura M, Nagafuchi S, Yamaguchi K, Takaki R: The role of thymic immunity and insulinitis in the development of streptozotocin-induced diabetes in mice. *Diabetes* 33: 894-898, 1984

Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, Low PA: Effect of alpha-tocopherol deficiency on indices of antioxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. *J Neurol Sci* 126:6-14, 1994

Nomikos IN, Wang Y, Lafferty KJ: Brief communication: Involvement of O₂ radicals in autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 67: 85-87, 1989

Oberley LW und Buettner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 39:1141-1149, 1979

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

Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M: Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by Streptozotocin. *Life Sci* 56:1789-1798, 1995

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

Onosaka S, Tanaka K, Cherian MG: Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein. *Environ Health Perspect* 54:67-72, 1984

Onosaka S, Min KS, Fujita Y, Tanaka K, Iguchi S, Okada Y: High concentration of pancreatic metallothionein in normal mice. *Toxicology* 50: 27-35, 1988

Paik SG, Fleischer N, Shin SL: Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6129-6133, 1980

Palmer HJ und Paulsen KE: Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55: 353-361, 1997

Papaccio G, Pisanti FA, Frascatore S: Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozocin. *Diabetes* 35:470-474, 1986

Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD: Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33: 7250-7259, 1994

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

Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG, Ward PA: Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest* 51: 396-403, 1994

Rerup CC: Drugs producing diabetes through damage of the insulin -secreting cells. *Pharmacol Rev* 22: 485-518, 1970

Robbins MJ, Sharp RA, Slonim AE, Burr IM: Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia* 18: 55-58, 1980

Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF: Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 74: 2485-2489, 1977

Rossini AA, Williams M, Appel MC, Like AA: Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Nature* 276: 182-184, 1978a

Rossini AA, Williams M, Appel MC, Like AA: Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes. *Endocrinology* 103: 1518-1520, 1978b

Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martona GE, Manto A, Ghirlanda G: Defective Plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipidperoxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 46: 1853-1858, 1997

Sato M und Bremner I: Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14: 325-337, 1993

Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR: Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem* 383: 671-681, 2002

Schenk H, Klein W, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K: Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1672-1676, 1994

Schmitz G, Minkel DT, Gingrich D, Shaw CF 3rd: The binding of Gold(I) to metallothionein. *J Inorg Biochem.* 12: 293-306, 1980

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson J, Newgard CB: STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43: 1326-1333, 1994

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258, 1991

Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jakob WA, Fiers W: Cytotoxic Activity of Tumor Necrosis factor Is Mediated by Early Damage of Mitochondrial Functions. *J Biol Chem* 267: 5317-5323, 1992

Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA: Redox Signalling by Transcription Factors NF- κ B And AP-1 in Lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50: 735-741, 1995

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

Serra AS, Famdou JR, Shenton BJ, Johnston ID: Passive transfer from diabetic man to athymic mice. *Lancet* 1: 1292, 1979

Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295, 1997

Sorg O, Tranc C, Carraux P, Didierjean L, Falson F, Saurat JH: Oxidative stress-independent depletion of epidermal vitamin A by UVA. *J Invest Dermatol* 118: 513-518, 2002

Sun Y: Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 8: 583-599, 1990

Sun Y, Oberley TD, Elwell JH, Sierra-Revera E: Lowered antioxidant enzymes in spontaneously transformed embryonic mouse liver cells in culture. *Carcinogenesis* 14: 1457-1463, 1993

Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T: Streptozotocin- and Alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes* 40: 1141-1145, 1991

Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997

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

Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR: Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* 4: 665-673, 2002

Walling C: Fenton's reagent revisited. *J Am Chem Soc* 8: 125-129, 1975

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

Wang Z und Gleichmann H: Glucose transporter 2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple-low-doses streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 50-56, 1998

Watson CJ und Demmer J: Procedures of cDNA cloning. In DNA cloning 1- Core techniques, Glover DM, Hanes BB, Eds. *New York, Oxford University Press* 83-119, 1995

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

Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blandschun R, Ma W, Kuhr L, Schneider L, Scharffetter-Kochanek K: UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr of Dermatol* 29: 83-94, 2001

Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP: Mechanisms of nitroreductase induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cell distribution. *Diabetes* 37: 213-216, 1988

Wilson GL und Leiter EH: Streptozotocin interactions with pancreatic β -cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 156: 27-54, 1990

Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Shmerling DH, Roob, JM: Effects of vitamin E and carotinoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Mol Aspects Med* 24: 391-402, 2003

Winnefeld K, Schirrmeister W, Thiele R, Sperschneider H, Klinger G: Selenium and antioxidant status in various diseases. *Med Klin* 90:7-9, 1995

Wong GHW und Goeddel DV: Induction of Manganous Superoxide Dismutase by Tumor Necrosis Factor: Possible Protective Mechanism. *Science* 242: 941-944, 1988

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C: Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994

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

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

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

Zhang Y, Zhao HJ, Domann FE, Oberley LW: Overexpression of superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 62: 1205-1212, 2002

Zhong W, Yan T, Lim R, Oberley LW: Expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase in glioma cells. *Free Rad Biol Med* 27: 1334-1345, 1999

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

Zobali F, Besler T, Ari N, Karasu C: Hydrogen peroxide-induced inhibition of vasomotor activity: evaluation of single and combined treatments with vitamin A and insulin in streptozotocin-diabetic rats. *Int J Exp Diabetes Res* 3:119-130, 2002

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin (MLD-STZ) auf die mRNA-Expression verschiedener antioxidativer Enzyme in pankreatischen Inseln und Leberproben untersucht. MLD-STZ induziert nur in männlichen C57BL/6-Mäusen einen Insulin-Mangel-Diabetes, wohingegen weibliche Mäuse dieses Stammes Diabetes-resistent sind.

Basierend auf dem Nachweis der In-vitro-Generierung von $\cdot\text{OH}$ und H_2O_2 durch STZ als auch der Ex-vivo-Generierung von H_2O_2 durch MLD-STZ in pankreatischen Inseln der Maus, der protektiven Effekte systemisch überexprimierter Kupfer/Zink Superoxiddismutase (CuZnSOD) bei Hoch-Dosis (HD)-STZ-behandelten Mäusen, der Prävention des HD-STZ-Diabetes durch Überexpression von Catalase (CAT) in Mäusen sowie die Relevanz der Kombination von antioxidativen Enzymen in Hinblick auf einen Schutz gegen ROS-Toxizität in vitro, sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt von MLD-STZ auf die mRNA-Expression cytoplasmatischer CuZnSOD, mitochondrialer Mangan (Mn)SOD, CAT sowie der cytoplasmatischen und der membranständigen Isoform der Glutathionperoxidase (GPx) 1 und 4 untersucht werden. Männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen wurde intraperitoneal MLD-STZ (40 mg/kg Körpergewicht STZ an fünf aufeinander folgenden Tagen) injiziert und die pankreatischen Inseln sowie Lebergewebe am ersten und am dritten Tag nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Kontrollmäuse blieben unbehandelt. Dabei zeigte sich, dass MLD-STZ keinen Effekt auf die mRNA-Expression antioxidativer Enzyme in Lebergewebe weiblicher und männlicher C57BL/6-Mäuse hatte. In pankreatischen Inseln beiderlei Geschlechts wurden alle fünf antioxidativen Enzyme konstitutiv in vergleichbarer Stärke schwach exprimiert. Nach MLD-STZ-Behandlung wurde jedoch nur in den Inseln Diabetes-resistenter weiblicher Mäuse die mRNA-Expression aller untersuchten antioxidativen Enzyme signifikant (mindestens $p < 0,05$) gesteigert, in Inseln Diabetes-suszeptibler männlicher Mäuse ergab sich dagegen kein signifikanter Effekt. Offensichtlich scheint die Hochregulation der antioxidativen Enzyme in pankreatischen Inseln als Antwort der weiblichen Mäuse auf MLD-STZ mit einem protektivem Effekt in Bezug auf die Entwicklung eines Diabetes assoziiert zu sein. Männliche Mäuse dagegen entwickeln einen MLD-STZ-induzierten Diabetes, da sie nicht in der Lage sind, ihre antioxidativen Enzyme in pankreatischen Inseln hochzu-regulieren, um sich vor den toxischen ROS-Effekten zu schützen.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Amanda Swantje Büchau

geboren am: 14. Juni 1980

Geburtsort: Düsseldorf

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/86 - 06/90 Grundschule Friedrich-von-Bodelschwingh, Düsseldorf

08/90 - 06/98 Cecilien-Gymnasium, Düsseldorf mit Abschluss
Abitur, großes Latinum: 08. Juni 1998

Ausbildung

10/98 - 11/04 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
Drittes Staatsexamen: 29. November 2004

seit 02/05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hautklinik des
Universitätsklinikums Düsseldorf

Famulaturen

09/00 - 10/00 Anästhesie in einer Praxis in Düsseldorf

02/01 - 03/01 Experimentelle Diabetologie, Deutsches Diabetes
Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

08/02 - 09/02 Innere Medizin/Diabetologie, Deutsches Diabetes
Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

03/03 - 04/03 Neurochirurgie, Neurochirurgische Klinik des Univer-
sitätsklinikums Düsseldorf

Praktisches Jahr

10/03 - 01/04 Dermatologie an der Hautklinik des Universitätsklini-
kums Düsseldorf

02/04 - 05/04 Chirurgie an der Chirurgischen Klinik des Univer-
sitätsklinikums Düsseldorf

05/04 - 08/04 Innere Medizin am St. Luke's Hospital der University
of Malta

Dissertation	09/01 –10/04	Ausarbeitung der Dissertation unter Prof. Dr. Helga Gleichmann, Deutsches Diabetes Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Thema: Differentielle Regulierung antioxidativer Enzyme durch multiple niedrige Dosen Streptozotocin im Mikromilieu pankreatischer Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse
Tätigkeiten neben dem Studium	08/99 - 06/00	Leitung und Koordination der studentischen Dienste in der Anästhesie einer Augenarztpraxis
	11/00 – 12/00 02/01	Nachwachtätigkeit in dem Universitätsklinikum Düsseldorf
	04/02 - 07/02	Tutorin für den Studentenkurs Spezielle Pathologie im Institut für Pathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den 30. November 2004

Amanda Büchau

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Friesen NTE, **Büchau AS**, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin.

Diabetologia 47: 676-685, 2004

Burchardt T, **Büchau A**, Ruzicka T, Megahed M

IgA pemphigus: Successful treatment with mycophenolate mofetil

Hautarzt 55: 387-389, 2004

Lewerenz V, Burchardt T, **Büchau A**, Ruzicka T, Megahed M

Livedoid vasculopathy with heterozygous factor V Leiden mutation and sticky platelet syndrome

Hautarzt 55: 379-381, 2004

Vorträge/ Poster

Burchardt T, **Büchau A**, Ruzicka T, Megahed M

IgA pemphigus

Successful treatment with mycophenolate mofetil

Düsseldorfer Dermatologen Abend am 21. April 2004

Büchau AS, Friesen NTE, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Generation of H₂O₂ and failure of upregulation of antioxidative enzymes in pancreatic islets of C57BL/6 mice is associated with susceptibility of diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin

1st International Conference, Molecular Research in Environmental Medicine, Düsseldorf, 18-20. März, 2004

Yehia H, **Büchau AS**, Burchardt T, Hodzic-Avdagic N, Becker J, Ruzicka T, Megahed M

α 6-Integrin ist das Autoantigen beim vernarbenden Pemphigoid der Mundschleimhaut

6. Tagung der Dermatologischen Wissenschafts- und Fortbildungsakademie, Köln, 28. November, 2003

Gewinn des Hauptpreises wissenschaftliches Poster

Büchau AS, Friesen NTE, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Generation of H₂O₂ and failure of upregulation of antioxidative enzymes in pancreatic islets of C57BL/6 mice is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin
38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Bremen, 30. Mai, 2003

Friesen NTE, **Büchau AS**, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin is associated with generation of H₂O₂ and deficient antioxidant enzyme responses in pancreatic islets of C57BL/6 mice
18th International Diabetes Federation Congress, Paris, 24.-29. August, 2003

Abstracts

Lgssiar A, Hassan M, Friesen NTE, **Büchau A**, Schott-Ohly P, Gleichmann H

Susceptibility of immune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin (MLD-STZ) is associated with down-regulation of anti-inflammatory cytokines, generation of reactive oxygen species, and activation of NF- κ B and AP-1
Immunobiology, 206:121, 1.8, 2002

Lgssiar A, Hassan M, Schott-Ohly P, Friesen NTE, **Büchau A**, Nicoletti F, Gleichmann H

Recombinant human interleucine-11 inhibits NF κ B and AP-1 in pancreatic islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin
Diabetes und Stoffwechsel, 12:55, 2003

Büchau AS, Friesen NTE, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Generation of H₂O₂ and failure of upregulation of antioxidative enzymes in pancreatic islets of C57BL/6 mice is associated with diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin
Diabetes und Stoffwechsel, 12:135, 2003

Schott-Ohly P, Partke H-J, Lgssiar A, Friesen NTE, **Büchau AS**, Gleichmann H

Zn²⁺-enriched drinking water prevented spontaneous diabetes in NOD mice
Diabetes und Stoffwechsel, 12:133, 2003

Friesen NTE, **Büchau AS**, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H

Diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin is associated with generation of H₂O₂ and deficient antioxidant enzyme responses in pancreatic islets of C57BL/6 mice

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

Lgssiar A, Hassan M, Schott-Ohly P, Friesen NTE, **Büchau AS**, Nicoletti F, Gleichmann H

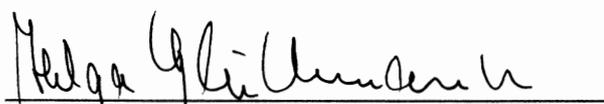
Recombinant human interleucine-11 inhibits NF- κ B and AP-1 in pancreatic islets and prevents diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin

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

Differentielle Regulierung antioxidativer Enzyme durch multiple niedrige Dosen Streptozotocin im Mikromilieu pankreatischer Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von multiplen niedrigen Dosen des diabetogen wirkenden Streptozotocins (MLD-STZ) auf die mRNA-Expression verschiedener intrazellulärer antioxidativer Enzyme in pankreatischen Inseln und Lebern untersucht. MLD-STZ induziert nur in männlichen Mäusen des untersuchten C57BL/6-Stammes einen Insulin-Mangel Diabetes, wohingegen weibliche Mäuse dieses Stammes Diabetes-resistent sind.

Basierend auf dem Nachweis der Generierung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) in vitro sowie der Generierung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in vitro als auch ex vivo in pankreatischen Inseln der Maus nach MLD-STZ Behandlung, der protektiven Effekte systemisch überexprimierter Kupfer/Zink Superoxiddismutase (CuZnSOD) bei Hoch-Dosis (HD)STZ -behandelten Mäusen, der Prävention des HD-STZ Diabetes durch Überexpression von Catalase (CAT) in Mäusen, sowie die Relevanz der Kombination von antioxidativen Enzymen in Hinblick auf einen Schutz gegen ROS-Toxizität in vitro, sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt von MLD-STZ auf die mRNA-Expression von cytoplasmatischer CuZnSOD, mitochondrialer Mangan (Mn)SOD, CAT sowie der cytoplasmatischen und der membranständigen Isoform der Glutathionperoxidase (GPx) 1 und 4 gezeigt werden. Männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäuse wurde intraperitoneal 40 mg/kg Körpergewicht STZ an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert und die pankreatischen Inseln sowie das Lebergewebe am ersten und am dritten Tag nach der letzten STZ-Injektion isoliert. Kontrollmäuse blieben unbehandelt. Dabei zeigte sich, dass MLD-STZ keinen Effekt auf die mRNA-Expression antioxidativer Enzyme in Leberwebe weiblicher und männlicher C57BL/6-Mäuse hatte. In pankreatischen Inseln beiderlei Geschlechts wurden alle fünf antioxidativen Enzyme konstitutiv in vergleichbarer Stärke schwach expremiert. Nach MLD-STZ Behandlung wurde jedoch nur in den Inseln Diabetes-resistenter weiblicher Mäuse die mRNA-Expression aller untersuchten antioxidativen Enzyme gesteigert, in Inseln Diabetes-suszeptibler männlicher Mäuse ergab sich dagegen kein signifikanter Effekt. Offensichtlich scheint die Hochregulation der antioxidativen Enzyme in pankreatischen Inseln als Antwort der weiblichen Mäuse auf MLD-STZ mit einem protektivem Effekt in Bezug auf die Entwicklung eines Diabetes assoziiert zu sein. Männliche Mäuse dagegen entwickeln einen MLD-STZ induzierten Diabetes, da sie nicht in der Lage sind ihre antioxidativen Enzyme hochzuregulieren.



Prof. Dr. med. Helga Gleichmann

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

Düsseldorf, den 30. November 2004