

**Untersuchung der Reaktivität von Ergothionein
gegenüber Singulett-Sauerstoff *in vitro* und intrazellulär**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Johanna Krüger

aus Münster

Düsseldorf, Februar 2016

aus dem Institut für Pharmakologie der
Universität zu Köln

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch
Korreferent: Prof. Dr. Dirk Gründemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2016

Für Ajay und meine Familie

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Gedankengut oder Daten, die aus fremden Quellen entliehen wurden, sind kenntlich gemacht. Diese Dissertation ist von mir noch an keiner anderen Stelle vorgelegt worden.

Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Köln, den 13. Februar 2016

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Überlassung dieses hochinteressanten Projekts und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung. Ich bin dankbar für seine stetige Ansprechbarkeit und die vielen lehrreichen Diskussionen. Ich habe ganz besonders seine Leidenschaft für die Wissenschaft geschätzt und bewundert mit der er mich immer wieder mitgerissen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Proksch dafür, dass er meine Arbeit begleitet hat und für die Erstellung des Gutachtens. Herrn Prof. Dr. Gohlke danke ich dafür, dass er meine Mentorenschaft übernommen hat.

Herrn Prof. Dr. Schmalz und seinen Mitarbeitern, Herrn Dr. Termath und Herrn Schlundt, danke ich für die Synthese von DHPNO_2 . Ich bin sehr glücklich über diese angenehme Kooperation, da meine Experimente nur durch die von ihnen synthetisierte Verbindung diese Aussagekraft erhalten haben. Mein Dank geht an Herrn PD Dr. Schäfer für seine Unterstützung bei dem Versuch unbekannte Differenz-Abtönungssignale aufzuklären.

Ich danke meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich Peter Skwara für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Simone Kalis für die tolle Einarbeitung und spätere konstruktive Zusammenarbeit am Massenspektrometer bedanken und für das Engagement, das sie für mein Projekt aufgebracht hat. Ich danke außerdem allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, die die Zeit für mich so besonders gemacht haben und die zu echten Freunden geworden sind. Ajay danke ich für seine grenzenlose Unterstützung, seine Geduld und dafür, dass er mich so gut versteht, wie kein anderer. Mein großer Bruder Tim war nicht nur 24-Stunden-IT-Support, Lektor

Danksagung

und mein kritischster Gutachter, sondern auch großer Motivator, besonders am Ende. Mein größter Dank gilt meiner gesamten Familie, die mir während meines Studiums und während meiner Promotion den besten Rückhalt für beste Arbeitsbedingungen gegeben hat und auf die ich mich immer verlassen konnte.

DANKE!

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	16
Abkürzungsverzeichnis	17
Zusammenfassung (Deutsch)	21
Zusammenfassung (Englisch)	23
1 Einleitung	25
1.1 Ergothionein	25
1.2 Der Ergothionein-Transporter	26
1.2.1 Expressionsprofil des Ergothionein-Transporters	27
1.3 Ergothionein-assoziierte Krankheiten	28
1.4 Physiologische Funktionen von Ergothionein	31
1.5 Reaktive Sauerstoff-Spezies	32
1.5.1 Singulett-Sauerstoff	33
1.6 Ziel der Arbeit	37
2 Material & Methoden	43
2.1 Verbrauchsmaterialien	43
2.2 Chemikalien	43
2.3 Lösungen und Puffer	44
2.4 Mikrobiologische Methoden	44
2.4.1 Bakterienstamm	45
2.4.2 Nährmedien	45
2.4.3 Kultur, Herstellung und Lagerung von E. coli	46
2.4.3.1 Flüssigkultur	46
2.4.3.2 Plattenkultur	46

2.4.3.3	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i>	46
2.4.3.4	Elektrotransformation	47
2.4.3.5	Glycerolstock.....	48
2.4.3.6	Plasmid-Präparation im Maximaßstab mit Säule	48
2.5	Zellbiologische Methoden.....	49
2.5.1	Zelllinie und Expressionssystem pEBTetD	49
2.5.2	Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen.....	50
2.5.3	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen.....	51
2.5.4	Vorbereitung der Zellen für Singulett-Sauerstoff Experimente	52
2.5.4.1	Aussaat nicht-transfizierter Zellen.....	52
2.5.4.2	Aussaat transfizierter Zellen.....	53
2.5.5	Zellaufschluss	53
2.5.6	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	54
2.6	Intrazelluläre Singulett-Sauerstoff-Freisetzung mittels Photosensibilisatoren	55
2.6.1	Bengal Rosa	57
2.6.2	Bengal Rosa Diacetat	58
2.6.3	Protoporphyrin IX.....	59
2.6.4	5-Aminolävulinsäure	60
2.6.5	TMPyP	61
2.7	Freisetzung von Singulett-Sauerstoff durch DHPN-Endoperoxid.....	62
2.8	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)	64
2.8.1	Full-Scan-Experimente (Q1-Scan).....	66
2.8.2	Produktionen-Scan (MS2).....	69
2.8.3	Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	70
2.9	Suche nach Indikator-molekülen zur Quantifizierung des Singulett- Sauerstoff-Schadens	75
2.9.1	2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF)	75
2.9.2	<i>In-vitro</i> -Inkubation von Aminosäuren, Guanin, Guanosin und Ascorbat mit DHPNO ₂	75
2.9.3	Strukturaufklärung unbekannter Full-Scan-Signale mittels Orbitrap Massenanalysator.....	76
2.10	<i>In-vitro</i> -Versuche von L-Methionin mit DHPN-Endoperoxid	76

3	Ergebnisse	79
3.1	Aufnahme- und Effluxversuch mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG)	79
3.1.1	Aufnahmeversuche mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG).....	79
3.1.2	Effluxversuch mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG)	81
3.2	Intrazelluläre Quantifizierung von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) nach ¹ O ₂ -Erzeugung durch Photosensibilisatoren.....	82
3.2.1	Bengal Rosa.....	82
3.2.2	Bengal Rosa Diacetat.....	85
3.2.3	TMPyP.....	89
3.2.4	Protoporphyrin IX	90
3.2.5	5-Aminolävulinsäure (ALA).....	91
3.3	Intrazelluläre Quantifizierung von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin nach ¹ O ₂ -Erzeugung durch DHPN-Endoperoxid	92
3.4	Identifikation von MSO als Singulett-Sauerstoff-Marker.....	93
3.5	Identifikation von Kynurenin als Singulett-Sauerstoff-Marker.....	99
3.6	Intrazelluläre Quantifizierung von MSO nach ¹ O ₂ -Erzeugung durch Photosensibilisatoren	100
3.7	Intrazelluläre Quantifizierung von MSO nach ¹ O ₂ -Erzeugung durch DHPN-Endoperoxid.....	102
3.8	Quantifizierung der Hemmung der MSO-Produktion durch ¹ O ₂ -Quencher <i>in vitro</i>	104
3.8.1	Puffertest.....	104
3.8.2	Zeitverlauf der Produktion von MSO	106
3.8.3	Zeitabhängigkeit der Quenchwirkung von ET und Azid	108
3.8.4	<i>In-vitro</i> -ET-Verbrauch durch ¹ O ₂	109
3.8.5	Hemmung der Produktion von Methioninsulfoxid aus Methionin und ¹ O ₂ durch ET und andere Quencher	110
3.9	Intrazelluläre Quantifizierung des schützenden Effekts von ET auf ¹ O ₂	112
3.10	Quantifizierung der intrazellulären Hemmung der MSO- Produktion durch ¹ O ₂ -Quencher intrazellulär	113

4	Diskussion	117
4.1	Experimentelle Singulett-Sauerstoff-Erzeugung.....	118
4.2	Quantifizierungsmarker für Singulett-Sauerstoff-Schaden	120
4.2.1	8-Oxoguanin	120
4.2.2	2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF)	125
4.2.3	Kynurenin.....	125
4.2.4	Methioninsulfoxid	126
4.3	<i>In-vitro</i> -Versuche	127
4.4	<i>In-vivo</i> -Versuche.....	129
5	Ausblick	131
	Literaturverzeichnis.....	133

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Ergothionein.....	26
Abb. 2: Gewebeverteilung der humanen ETT-mRNA	28
Abb. 3: Übersicht postulierte physiologische Funktionen von ET	32
Abb. 4: Besetzung der Energieniveaus der Molekülorbitale des Sauerstoffs in Grund- und angeregten Zuständen	33
Abb. 5: Addition von Singulett-Sauerstoff an das Kohlenstoffatom einer Doppelbindung	34
Abb. 6: [4+2]-Cycloaddition von $^1\text{O}_2$ an 1,3-Diene nach dem Prinzip von Diels-Alder.....	34
Abb. 7: Addition von $^1\text{O}_2$ an aktivierte Doppelbindungen.	34
Abb. 8: Geschätzter $^1\text{O}_2$ -Verbrauch intrazellulärer Targets in einer Leukozytenzelle	36
Abb. 9: ET-Gehalt von Geweben adulter Wildtyp- und ETT-Knockout-Fische ...	37
Abb. 10: Gehalt von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) in Ganzfisch- Gewebehomogenaten.....	38
Abb. 11: Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Guanosinderivaten	39
Abb. 12: Strukturverwandtschaft von 8-Oxoguanin und Ergothionein.	40
Abb. 13: Photosensibilisatoren erzeugen parallel zu Singulett-Sauerstoff auch andere Radikale	41
Abb. 14: Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pEBTetD	50
Abb. 15: Belichtung von HEK-293-Zellen mit UV-Licht.....	56
Abb. 16: Bengal Rosa	57
Abb. 17: Bengal Rosa Diacetat.....	58
Abb. 18: Protoporphyrin IX.....	59
Abb. 19: 5-Aminolävulinsäure	60
Abb. 20: Protoporphyrin IX-Synthese.....	60
Abb. 21: Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat.....	61
Abb. 22: N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid.....	62
Abb. 23: Elektrosprayionisierung	65
Abb. 24: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massen-Analysators	66
Abb. 25: LC-MS/MS-Differenz-Abtönung	69

Abb. 26: 2,5-Bis(hydroxymethyl)-furan	75
Abb. 27: Intrazelluläre Quantifizierung der 8OG-Konzentration	80
Abb. 28: Quantifizierung der 8OG-Konzentration im Zellüberstand	81
Abb. 29: Intrazelluläre 8OG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa ...	83
Abb. 30: Intrazelluläre 8OdG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa .	84
Abb. 31: Intrazelluläre Prolinkonzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa ...	85
Abb. 32: Intrazelluläre 8OG-Konz. nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat..	86
Abb. 33: Intrazelluläre 8OdG-Konz. nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat	87
Abb. 34: Intrazelluläre Prolin-Konz. nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat	87
Abb. 35: Intrazelluläre Guanin-Konz. nach Inkubation mit Bengal R. Diacetat...	88
Abb. 36: Intrazelluläre A: 8OG bzw. B: 8OdG-Konz. nach TMPyP-Inkubation...	89
Abb. 37: Intrazelluläre A: 8OG bzw. B: 8OdG-Konz. nach Inkubation mit PPIX.	91
Abb. 38: Intrazelluläre 8OG-Konzentration nach Inkubation mit DHPNO ₂	93
Abb. 39: Ergebnis einer Differenz-Abtönung	94
Abb. 40: Produktionen-Scan im Positiv-Modus, CE = 15 Volt	96
Abb. 41: Produktionen-Scan im Positiv-Modus, CE = 15 Volt	97
Abb. 42: HPLC-Bedingungen	98
Abb. 43: Vergleichsspektrum von DL-Methioninsulfoxid der Datenbank metlin.scripps.edu (MID 6428) im Positivmodus bei 10 Volt.....	99
Abb. 44: Reaktion von Methionin zu Methioninsulfoxid durch ¹ O ₂	99
Abb. 45: Reaktion von Tryptophan mit Singulett-Sauerstoff.....	100
Abb. 46: Intrazelluläre MSO-Konzentration in NT-Zelllysaten nach Inkubation mit A: 100 µmol/l Bengal Rosa (1 h) bzw. B: 100 µmol/l PPIX (4 h).....	101
Abb. 47: Intrazellulärer Anstieg der MSO-Konzentration durch DHPNO ₂	103
Abb. 48: Puffertest: 100 µmol/l Methionin wurden in Gegenwart von A: HEPES, B: TRIS und C: Phosphatpuffer in 5 mmol/l und 50 mmol/l Ansätzen für 1 h mit 10 mmol/l DHPNO ₂ inkubiert	105
Abb. 49: Zeitverlauf der Produktion von MSO	107
Abb. 50: Methionin und DHPNO ₂ HEPES/NaOH plus Quencher wurden für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert	109
Abb. 51: Methionin und DHPNO ₂ HEPES/NaOH (pH 7.4) plus ET wurden für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert	110
Abb. 52: Hemmung der Produktion von Methioninsulfoxid aus Methionin und ¹ O ₂ durch ET und andere Quencher	111

Abb. 53: Intrazelluläre Hemmung der MSO-Produktion durch Ergothionein..... 113

Abb. 54: Intrazelluläre Hemmung der MSO-Produktion durch $^1\text{O}_2$ -Quencher ..115

Abb. 55: Abnahme der Guanosin-Derivate und 8-Oxoguanosin-Derivate
relativ zur Anfangskonzentration..... 121

Abb. 56: Hauptoxidationsprodukte nach Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit 8-Oxo-7,8-
Dihydroguanin 121

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Full-Scan-Methoden	67
Tab. 2: Elutionsmittel für HPLC	68
Tab. 3: HPLC-Säulen.....	68
Tab. 4: Detektionsbedingungen der Analyten.....	73
Tab. 5: Übersicht der Kontrollansätze der <i>in-vitro</i> -Versuche	77
Tab. 6: Puffertest: Methioninsulfoxid-Peakflächen [units].....	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ALA	5-Aminolävulinsäure
AS	Ascorbinsäure
ASF	engl. Amphiphilic Solute Facilitator
BCA	Bicinchoninsäure
BHMF	2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan
BSA	engl. Beef Serum Albumin
CaCo-2-Zellen	heterogene humane epitheliale kolorektale Adenokarzinoma Zellen
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. Complementary DNA
CE	engl. collision energy
DHPN	N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid
DHPN*	deaktiviertes DHPN Endoperoxid
DHPNO2	N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid Endoperoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EBNA	engl. Epstein-Barr nuclear antigen
E. coli	Escherichia coli
ELISA	engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	engl. electrical potential
ESI	Elektrospray-Ionisation
ET	Ergothionein
ETT	Ergothionein-Transporter
ETTh	humaner Ergothionein-Transporter
FCS	engl. Fetal Calf Serum
FD	Fluoreszenzdiagnostik
g	Gramm

<i>g</i>	Erdbeschleunigung [m/s^{-2}]
GSH	Glutathion
HEK	engl. Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
h ν	Strahlung
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
K _m	Michaeliskonstante
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LC/MS-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
<i>m</i>	Steigung
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimolar
mRNA	eng. messenger Ribonucleic acid
msec	Millisekunden
MSO	Methioninsulfoxid
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
NT	Nicht-Transfiziert
OCTN1	engl. Organic-Cation-Transporter 1
8OdGuo	8-Oxo-7,8-dihydroguanosin
8OdG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin
8OG	8-Oxoguanin

p.a.	lat. pro analysi
PBG	Porphobilinogen
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDT	Photodynamische Tumorthherapie
pmol	Pikomol
PPIX	Protoporphyrin IX
RNA	engl. Ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. rotation per minute
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SEM	engl. standard error of the mean
SLC	engl. Solute Carrier
SOB	engl. Super Optimal Broth
SOC	engl. Super Optimal broth with Catabolite repression
spec.	lat. species
SV	Simianes Virus
$t_{0,5}$	Halbwertszeit
TfR-1	Transferrin-Rezeptor-1
TMPyP	Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPP	2',3',5'-Tris((tert-butyldimethylsilyl)oxy)guanosin
U	Umdrehungen
μ F	Mikrofarad
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent

ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)

Ergothionein (ET) ist ein natürlich vorkommendes, stabiles Antioxidans mit einzigartigen Eigenschaften. Der spezifische Ergothionein-Transporter (ETT) ist evolutionär in allen Vertebraten konserviert, was für einen gesundheitsfördernden Nutzen spricht. Um die physiologische Funktion dieser Verbindung aufzuklären wurde in der Arbeitsgruppe Gründemann ein ETT-Zebrafisch-Knockout-Modell erzeugt, in dem der globale ET-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp mehr als 1000-fach erniedrigt war. Die Analyse der Gewebehomogenate hat den Befund geliefert, dass 8-Oxoguanin (8OG) im Knockout-Zebrafisch signifikant erhöht vorlag. 8OG und die 8OG-Nukleoside 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin, aus denen 8OG enzymatisch freigesetzt werden kann, sind Marker für oxidative Schäden der DNA und RNA. 8OG wird intrazellulär entweder durch die Reaktion von Guanin mit Hydroxyl-Radikalen ($\cdot\text{OH}$) oder Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet. Hydroxyl-Radikale sind sehr reaktiv und modifizieren alle vier Nucleobasen, Singulett-Sauerstoff hingegen reagiert selektiv über [4+2]-Cycloaddition aufgrund seines Redoxpotentials nur mit Guanin. Dies führte zu der klaren Hypothese, dass die universelle und spezifische Funktion von Ergothionein der Schutz des Organismus vor Singulett-Sauerstoff ist.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des schützenden Effekts von Ergothionein in der lebenden Zelle. $^1\text{O}_2$ wurde intrazellulär mittels Photosensibilisatoren generiert und spezifisch, d.h. ohne Nebenproduktion anderer reaktiver Sauerstoff-Spezies, wie z. B. Hydroxyl-Radikale, H_2O_2 oder Superoxid-Anionen mit dem Endoperoxid von DHPN (N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid). Durch $^1\text{O}_2$ -Erzeugung konnten intrazellulär erhöhte 8OG-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden, was die Resultate aus dem Zebrafisch-Modell bestätigte.

Methioninsulfoxid (MSO) wurde als besserer Marker zur Quantifizierung des $^1\text{O}_2$ -Schadens identifiziert. Nach spezifischer $^1\text{O}_2$ -Erzeugung hemmte ET die MSO-

Produktion um den Faktor 3. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass ET intrazellulär d.h. unter physiologischen Bedingungen eine schützende Wirkung gegenüber Singulett-Sauerstoff hat. In weiteren Versuchen wurde der schützende Effekt von Ergothionein auf $^1\text{O}_2$ in der lebenden Zelle und *in vitro* mit anerkannten oder potentiellen Singulett-Sauerstoff-Quenchern, wie z. B. Azid, Ascorbat, Imidazol oder GSH verglichen. Es wurde im *in-vitro*-Versuch gezeigt, dass ET und Azid ein diametral unterschiedliches Reaktionsverhalten gegenüber $^1\text{O}_2$ zeigen und ET im Vergleich zu GSH 20 Mal wirksamer gegenüber $^1\text{O}_2$ ist.

ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)

Ergothioneine (ET) is a naturally occurring antioxidant with unique properties. The specific ergothioneine transporter (ETT) is evolutionarily conserved in all vertebrates that indicates health beneficial use. To elucidate the physiological function of ET an ETT-knockout-zebrafish-model was created in which the global ET content was more than 1000 times lower compared to wild type. Analysis of the tissue homogenates have shown that 8-Oxoguanine (8OG) was significantly increased in knockout-zebrafish. 8OG and 8OG-nucleosides (8-oxo-7,8-dihydroguanosin and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine), from which 8OG can be enzymatically released, are markers of oxidative damage of DNA and RNA. Intracellular production of 8OG is a result of either the reaction of guanine with hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) or singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). Hydroxyl radicals are highly reactive and modify all four nucleobases, however singlet oxygen reacts with guanine due to its redox potential by [4+2]-cycloaddition selectively. This led to the clear hypothesis that the universal and specific function of ergothioneine is the protection of the organism against singlet oxygen.

The primary aim of this study was to investigate the protective effect of ergothioneine in the living cell. $^1\text{O}_2$ was generated intracellularly by photosensitizers and specifically, that is, without side-production of other reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals, H_2O_2 or superoxide anions with the endoperoxide of DHPN (N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid). Intracellular $^1\text{O}_2$ production caused increased 8OG levels compared to control and similar to the results obtained with zebrafish-model.

Methionine sulfoxide (MSO) was identified as a better marker to quantify $^1\text{O}_2$ damage. After specific $^1\text{O}_2$ generation ET could inhibit the MSO-production by a factor of 3. This is the first time shown that ET has a protective effect on singlet oxygen under physiological conditions. In further experiments, the protective effect of ergothioneine was compared with well-established or potential singlet

oxygen quenchers such as azide, ascorbate, imidazole or GSH in living cells and *in vitro*. *In vitro* experiments have shown that ET and azide react diametrically different with $^1\text{O}_2$ and potency of ET is 20 times higher against $^1\text{O}_2$ compared to GSH.

1 EINLEITUNG

1.1 Ergothionein

Ergothionein (ET) ist ein natürlich vorkommendes, stabiles Antioxidans mit einzigartigen Eigenschaften. Es wurde bereits 1909 im Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) entdeckt [3, 4], seine physiologische Funktion ist jedoch bis heute unklar. Schimmelpilze wie z. B. *Aspergillus spec.* und *Penicillium spec.* [5], Cyanobakterien und einige Mykobakterien können ET synthetisieren [6], höher entwickelte Lebewesen hingegen sind auf die Aufnahme über die Nahrung angewiesen. Die Synthese verläuft in Pilzen und Mykobakterien ausgehend von der Aminosäure Histidin, wobei Cystein als Donor des Schwefelatoms fungiert [7, 8], über stabile Zwischenprodukte wie das Herzynin hin zum Ergothionein. Mit einem ET-Gehalt von 0,1–1 mg/g Trockenmasse stellen Pilze eine ideale ET-Quelle für den Menschen und andere Säugetiere dar [6]. Auch Spirulina-Präparate, gewonnen aus Cyanobakterien, sind neuerdings als gute ET-Nahrungsquellen bekannt [5-7, 9-11]. ET wird über den Darm resorbiert und reichert sich vorwiegend in Erythrozyten, Knochenmark und Augen an [12, 13]. Bei Ratten wurden Plasmahalbwertszeiten von 10–18 min gemessen [13, 14]. Eine Elimination über den Urin kann nicht nachgewiesen werden und auch sonstige Untersuchungen zur Ausscheidung deuten auf einen sehr langen Verbleib der Verbindung im Organismus hin [13, 15]. Bei der Ratte beispielsweise wurde unter ET-freier Ernährung eine Abnahme des ET-Gehalts auf die Hälfte erst nach einem Monat beobachtet [16]. Bisher ist nichts über einen Phänotyp bekannt, möglicherweise werden ET-Mangelsymptome bei Labortieren aber auch erst unter Belastung erkennbar [17, 18].

Chemisch betrachtet ist ET das Betain der Aminosäure L-Histidin und trägt ein Schwefelatom an Position 2 des Imidazolrings [19] (siehe Abb. 1).

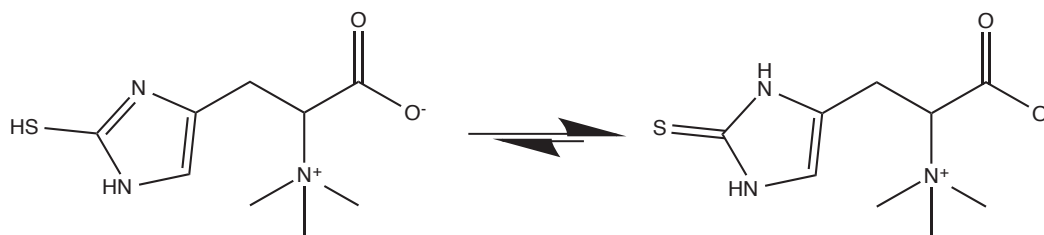


Abb. 1: Ergothionein: Das tautomere Gleichgewicht liegt bei physiologischem pH-Wert auf Seiten der Thion-Struktur (rechts).

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Thiol-Thion-Gleichgewicht auf Seiten der dem Schwefelharnstoff analogen Thion-Struktur. Diese charakteristische Eigenschaft besitzen andere physiologische Thiole, wie Glutathion oder Cystein, nicht, was bei physiologischem pH-Wert zu deren Autoxidation führt. Als Konsequenz kommt es zur Bildung von Hydroxylradikalen aus H₂O₂ und Fe²⁺-Ionen (Fenton-Reaktion) [12].

1.2 Der Ergothionein-Transporter

Aufgrund seiner zwitterionischen Struktur ist Ergothionein sehr hydrophil, was die freie Diffusion durch intakte Biomembranen unmöglich macht. Die Arbeitsgruppe Gründemann, Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln, hat mithilfe einer LC-MS-basierten Strategie der Substratsuche einen humanen Ergothionein-Transporter (ETT, alte Bezeichnung OCTN1; Gensymbol *SLC22A4*) entdeckt [20], der in allen Vertebraten vorhanden ist [21]. Der humane Ergothionein-Transporter ist ein aus 551 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein und ein Mitglied der *SLC22*-Familie (Solute-Carrier). Die Transporter dieser Familie transportieren wasserlösliche Verbindungen, weshalb sie auch als Amphiphilic Solute Facilitator (ASF) bezeichnet werden [22, 23]. Die Familie umfasst Transporter, die organische Anionen, Kationen, wie auch Zwitterionen transportieren und trotz ihrer unterschiedlichen Substrateigenschaften Gemeinsamkeiten aufweisen. Diese sind zum Beispiel der gleiche topologische Aufbau, bestehend aus zwölf α -helikalen Transmembrandomänen, und die intrazelluläre Lokalisation der C- und N-Termini. Bei dem ETT handelt es sich um einen hochspezifischen Transporter mit einem K_m -Wert für ET von 20 $\mu\text{mol/l}$ [20]. Der Transporter nutzt

den natürlichen Na^+ -Gradienten und treibt so durch Na^+ -Cotransport die ET-Aufnahme an [20]. In ETT-exprimierenden Geweben liegt ET intrazellulär im Vergleich zum extrazellulären Medium etwa um den Faktor 85 erhöht vor [20]. In Zellen ohne ETT-Expression findet praktisch keine ET-Aufnahme statt.

1.2.1 Expressionsprofil des Ergothionein-Transporters

Das Expressionsprofil des Ergothionein-Transporters sowie Studien an einem ETT-Knockout-Zebrafisch und an ETT-Knockout-Mäusen lassen darauf schließen, dass der spezifische Transporter allein für die Absorption im Ileum und die gesamte Verteilung über das Knochenmark im menschlichen Organismus zuständig ist (siehe Abb. 2) [20, 24, 25]. Wie schon erwähnt können keine Metabolite im Urin nachgewiesen werden, was durch das Vorhandensein des ETT in der Niere und die dadurch bedingte Reabsorption von ET zu erklären ist [20, 26]. Es ist auf der Basis der vorhandenen Daten zur Gewebeverteilung des ETT anzunehmen, dass der Transporter primär die Aufgabe hat, die Vorläuferzellen der Erythrozyten (CD71^+) mit ET zu versorgen. Außerdem ist die Expression, real-time-PCR-Daten nach zu urteilen, sehr stark ausgeprägt in Immunzellen (Monozyten und Makrophagen (CD14^+), siehe Abb. 2). In T- oder B-Lymphozyten (CD8 bzw. CD4) hingegen konnte keine Expression nachgewiesen werden [27]. Die hohe Konzentration von ET im Knochenmark ist durch die hohe ETT-Expression in kernhaltigen CD71^+ -Zellen (Pronormoblasten und basophile Normoblasten) zu erklären. Dieses Oberflächen-Antigen entspricht dem Transferrin-Rezeptor (TfR-1), der während der Hämatopoese Eisen-Ionen für die Hämoglobinsynthese in die Zelle einschleust [28]. Eine ausgeprägte Expression ist in der fötalen, nicht jedoch in der adulten Leber zu finden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Hämatopoese des Embryos in der Leber und noch nicht im Knochenmark stattfindet. Das nicht-ubiquitäre Vorkommen von ET, im Gegensatz zu den hydrophilen Antioxidantien Ascorbinsäure oder Glutathion, deutet auf spezifische, exklusive Eigenschaften von ET hin. Es sind zudem spezies-spezifische Expressionsunterschiede gefunden worden, die einen Hinweis auf einen unterschiedlichen ET-Bedarf in unterschiedlichen Geweben liefern [13]. In der adulten humanen Leber z. B.

findet man kein Signal für den ETT, in Maus und Ratte hingegen kann die mRNA des orthologen Transporters nachgewiesen werden [29, 30]. Außerdem konnten, je nach Spezies, unterschiedliche ET-Konzentrationen in den einzelnen Geweben gemessen werden. In der Augenlinse des Rinds liegt z. B. eine 250-fach höhere ET-Konzentration als in der Augenlinse des Schweins vor [31].

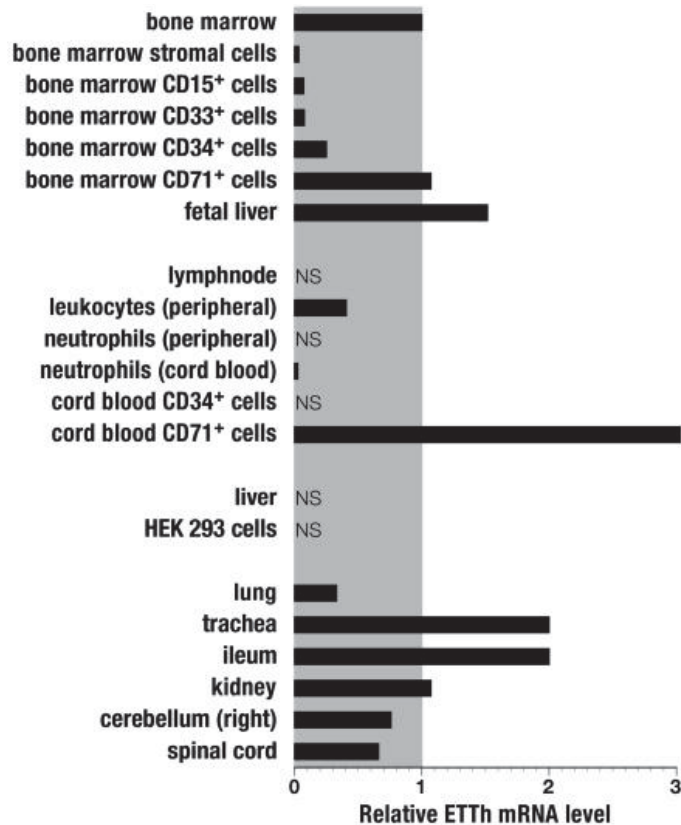


Abb. 2: Gewebeverteilung der humanen ETT-mRNA: Real-Time-PCR-Analyse nach dem TaqMan™ Verfahren. Es ist der humane ETT-mRNA-Gehalt relativ zum Gehalt im Knochenmark (bone marrow) dargestellt. [20]

1.3 Ergothionein-assoziierte Krankheiten

Einzelbasenpolymorphismen im *SLC22A4*-Gen scheinen eine Bedeutung bei der multifaktoriellen Entstehung von chronischen Entzündungserkrankungen zu spielen. In mehreren Fall-Kontroll-Studien wurde eine Assoziation mit Morbus Crohn [32-37] dokumentiert, aber auch für Colitis ulcerosa [38] und Typ-1-Diabetes [39] konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden. Morbus Crohn ist eine chronisch granulomatöse Entzündung, die im gesamten Verdauungstrakt von der Mundhöhle bis zum After auftreten kann. Bevorzugt befallen sind der

untere Dünndarm (*terminales Ileum*) und der Dickdarm (*Colon*), seltener die Speiseröhre (*Ösophagus*) und der Mund. Charakteristisch ist der diskontinuierliche, segmentale Befall (sog. *skip lesions*) der Darmschleimhaut. Morbus Crohn ist neben Colitis ulcerosa die häufigste chronisch-entzündliche Darmerkrankung mit einer Prävalenz in westlichen Industrienationen von 0,25–0,5 %. Ätiologie und Pathogenese sind bislang noch nicht eindeutig geklärt, jedoch sprechen der fehlende Nachweis eines spezifischen Erregers und das gute therapeutische Ansprechen auf Kortikosteroide für eine autoimmunvermittelte Entstehung. Genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren (z. B. Rauchen) scheinen dabei die Fehlregulation des Immunsystems der Darmmukosa zu stimulieren. Die Analyse der entzündeten Dünndarmmukosa von Morbus-Crohn-Patienten lieferte den Befund, dass sowohl die ET-Konzentration, als auch die ETT-mRNA-Level der betreffenden Gewebe im Vergleich zu denen gesunder Patienten relativ erhöht waren [40]. Eine Arbeit von Shimizu et al. an Mäusen zeigt, dass der ET-Gehalt von in inflammatorisches Dünndarmgewebe eingewanderten Makrophagen erhöht ist [41]. Die 503F-Variante des *SLC22A4*-Gens, die mit Morbus Crohn assoziiert ist, hat eine 50 % höhere Transporteffizienz als die der nicht-mutierten Variante (503L) [42]. Durch Unterstützung des Immunzellüberlebens wird ein erhöhter ET-Gehalt, aufgrund der anti-apoptischen Eigenschaften von ET [43], als entzündungsfördernd postuliert.

Bei Patienten mit milden Verlaufsformen der rheumatoiden Arthritis konnten ebenfalls signifikant höhere ET-Konzentrationen in Erythrozyten und Monozyten gemessen werden, die direkt mit der Expression an *SLC22A4*-mRNA in CD14⁺-Zellen korrelierten [44]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit kollagen-induzierter Arthritis ebenfalls hohe Expressionslevel des Ergothionein-Transporters in hämatologischem und immunologischem Gewebe der entzündeten Gelenke aufwiesen [27]. Die Assoziation zwischen ET und der Entstehung der rheumatoiden Arthritis konnte nur für eine japanische Kohorte nachgewiesen werden [27]; In Vergleichsstudien mit britischen [45] und spanischen [46] Kohorten konnten die Ergebnisse nicht bestätigt werden. Diese Beobachtung spricht für ethnische Unterschiede der Polymorphismen im

SLC22A4-Gen und dadurch bedingt unterschiedliche Krankheitsprävalenzen in spezifischen Populationen. Tatsächlich konnten solche ethnischen Variationen der Polymorphismen, die mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert sind, bereits durch mehrere Studien belegt werden [47-51]. Einige Studien geben Hinweise darauf, dass die erhöhten ET-Konzentrationen Zytokin-vermittelt sind. Inkubationen von Caco-2-Zellen mit TNF α zeigten einen Anstieg der ETT-Expression und in der Konsequenz erhöhte ET-Spiegel, die das Überleben von Immunzellen fördern [40, 42]. Es wird angenommen, dass in gleicher Weise auch mit rheumatoider Arthritis assoziierte inflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 β und über den Transkriptionsfaktor RUNX1 die ETT-Expression gesteigert wird [52]. Allerdings ist nicht geklärt, ob der Zytokin-vermittelte Anstieg der ETT-Expression Teil der Pathogenese der Entzündungskrankheiten ist oder eine Abwehrreaktion der Zelle auf das inflammatorische Geschehen ist. Es gibt nämlich auch kontroverse Studienergebnisse, die zeigen, dass der ET-Gehalt im Blut einer japanischen Morbus-Crohn-Patienten-Kohorte signifikant unter dem der gesunden Probanden lag [24]. Diese Beobachtungen stimmen auch mit denen aus einem ETT-Knockout-Mausmodell überein, in dem die ET-defizienten Mäuse häufiger von intestinalen Entzündungen betroffen waren als der Wildtyp [24].

Des Weiteren gibt es Arbeiten die zeigen, dass ET den TNF α -vermittelten Anstieg von IL-8 in Epithelzelllinien inhibiert [53] sowie schützend auf den durch freie Fettsäuren vermittelten Zelltod, der durch die p38- und JNK-Signalkaskade eingeleitet wird, wirkt und die IL-6-Expression inhibiert [54].

Auch ein verminderter ET-Gehalt im Gewebe kann mit der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Bei Patienten mit Katarakt (Grauer Star) wurde ein verminderter ET-Spiegel nachgewiesen, der mit einem ebenfalls geringeren Glutathion- und Ascorbinsäurespiegel einhergeht [55]. Weiterführende Studien mit Hühnerküken, bei denen künstlich durch Hydrocortisoninjektion in das Ei Katarakt induziert wurde, zeigen, dass eine Linsentrübung durch spätere ET-Injektion bei manchen Tieren abgemildert oder gar verhindert werden konnte [56].

Bei Diabetes-Typ-1-Patienten konnten erhöhte ET-Spiegel nachgewiesen werden. Dies lieferte Hinweise auf die Pathogenese von Diabetes mellitus durch Chelatbildung von Zink, einem wichtigen Spurenelement zur Speicherung von Insulin und Glucagon [57-59]. In Alloxan-induzierten diabetischen Ratten hingegen konnte kein ET-Anstieg beobachtet werden und Untersuchungen zur Chelatbildungsfähigkeit von ET haben gezeigt, dass ET keinen Einfluss auf Zinkmetalloproteine hat [60, 61]. In Kulturen von Maus-Myoblasten konnte gezeigt werden, dass ET die Palmitinsäure-Induktion von IL-6, die mit der Insulinresistenz im Typ-2-Diabetes assoziiert ist, inhibiert [54, 62, 63]. Außerdem wurde bei tragenden diabetischen Ratten die Fehlbildungsrate – bedingt durch hyperglykämischen oxidativen Stress – durch ET-Injektionen im Vergleich zur Kontrolle gesenkt [64].

1.4 Physiologische Funktionen von Ergothionein

Die Tatsache, dass ein spezifischer Transporter für Ergothionein existiert und evolutionär über eine Vielzahl an Spezies konserviert ist, lässt auf einen elementaren Nutzen dieser Verbindung im Organismus schließen. Ausgehend von Mutationen im *SLC22A4*-Gen und den damit assoziierten Krankheiten (siehe 1.3) und durch ET-bedingte Veränderungen von Signalkaskaden hat man eine Reihe von möglichen Hypothesen zur physiologischen Funktion aufgestellt (siehe Abb. 3). Es wird postuliert, dass ET als Komponente der Bioenergetik [65], als Regulator der Genexpression [66] oder Immunregulator eine Rolle spielt [53, 54, 65]. In diversen *in-vivo*-Arbeiten wird ET als Kation-Chelator für Cu(II)-Chlorid [60, 67] oder Au(III)-Chlorid [4] gehandelt. Die antioxidativen und cytoprotektiven Eigenschaften von ET sind jedoch am besten belegt [12, 68-70]. Das Expressionsmuster (siehe Abb. 2) zeigt eine Akkumulation von ET in Geweben mit hoher Exposition zu oxidativem Stress. Dazu zählen z. B. Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen, Augen und z.B. Seminalplasma. *In vitro* zeichnet ET sich als hervorragender Radikalfänger für Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), Hypochlorige Säure (HOCl), und Peroxynitrit (ONOO^-) aus. Zu Häm-Gruppen zeigt ET eine hohe Affinität, was auf eine schützende Wirkung des Hämoglobins in den

Erythrozyten hindeuten könnte [31]. Außerdem – und dass stützt die in dieser Arbeit geprüfte Hypothese zur physiologischen Funktion von ET – wurde in einer Arbeit von Rougee et. al die Singulett-Sauerstoff deaktivierende Wirkung von ET ($k = 2,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gezeigt, die der anderer einfacher Thiole, wie z. B. GSH, deutlich überlegen ist [71].

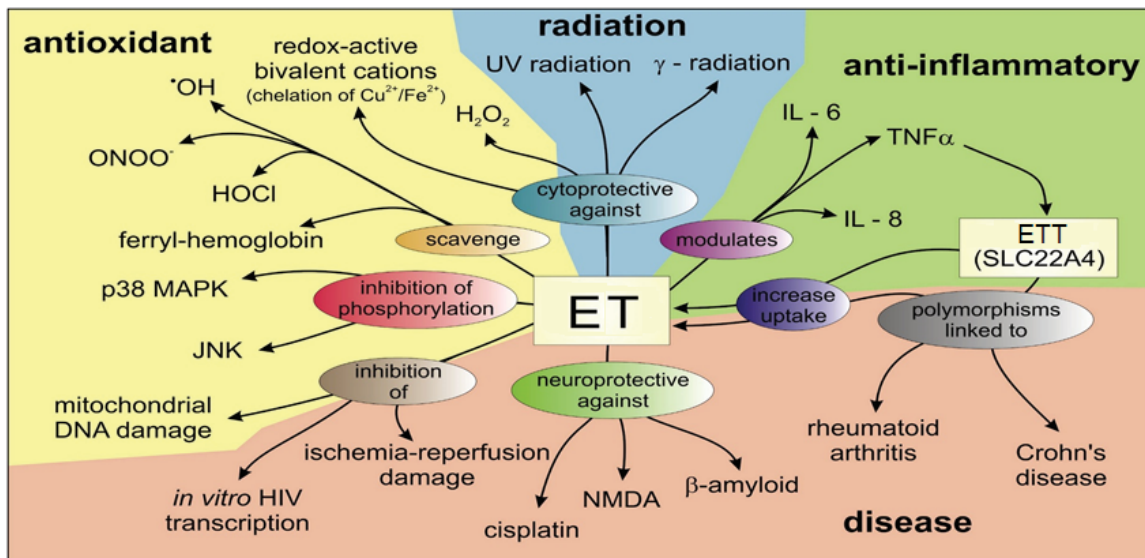


Abb. 3: Übersicht postulierte physiologische Funktionen von ET. Antioxidative Funktionen sind gelb unterlegt, anti-entzündliche Wirkungen grün, schützende Wirkungen gegen Strahlung blau und die Assoziationen von ET mit Krankheiten orange. Modifiziert nach [72].

1.5 Reaktive Sauerstoff-Spezies

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) entstehen durch Umwelteinflüsse wie Zigarettenrauch oder UV-Strahlung, aber auch als natürliche Stoffwechselprodukte des Organismus, z. B. in den Mitochondrien während der Zellatmung. Sie werden sogar von Lymphozyten zur natürlichen Keimabwehr produziert [65] oder dienen in Pflanzen zur Abwehr von Pathogenen (*oxidative burst*) [66]. ROS sind Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Valenzelektronen (Radikale). Sie sind hoch reaktiv und äußerst schädlich für eine Vielzahl zellulärer Verbindungen. Bei Schädigungen der DNA-Basen kann es zu Chromosomveränderungen und dadurch zur Entstehung neoplastischer Erkrankungen kommen [68]. Werden Proteinstrukturen mit Enzymaktivität angegriffen, kann es zum Aktivitätsverlust kommen. Oxidationen

der ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran führen zum Stabilitätsverlust und dadurch zum unmittelbaren Zelltod [69].

1.5.1 Singulett-Sauerstoff

Beim Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sind die Spins der beiden Valenzelektronen entgegen der Hundschen Regel antiparallel ausgerichtet (siehe Abb. 4), was dazu führt, dass er eine deutlich höhere Energie als der unreaktive Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) besitzt. Er kommt in zwei unterschiedlich angeregten Zuständen vor. Die beiden Zustände unterscheiden sich dadurch, dass sich die beiden Elektronen in einem ($^1\Delta_g$) oder beiden ($^1\Sigma_g^+$) π^* -Orbitalen befinden, wobei der $^1\Sigma_g^+$ -Zustand energetisch ungünstiger ist und sich schnell in den $^1\Delta_g$ -Zustand umwandelt.

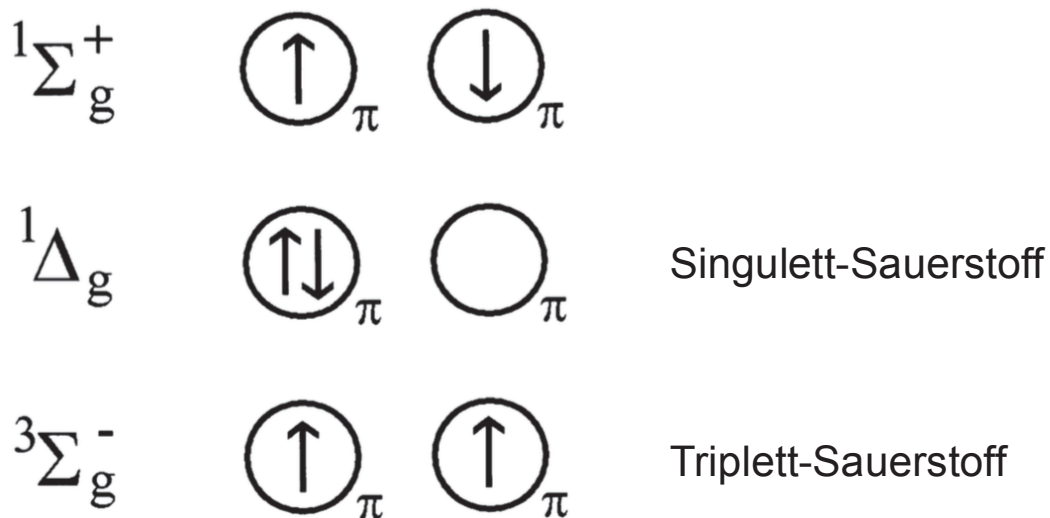


Abb. 4: Besetzung der Energieniveaus der Molekülorbitale des Sauerstoffs in Grund- und angeregten Zuständen. Die Pfeile markieren die Valenzelektronen, die beim Singulett-Sauerstoff antiparallel ausgerichtet sind. [70]

$^1\text{O}_2$ ist ein starkes Oxidationsmittel und reagiert im Gegensatz zu Triplett-Sauerstoff mit elektronenreichen organischen Verbindungen, wie ungesättigten Fettsäuren, Nukleinsäuren und vorzugsweise mit den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Dies geschieht über drei unterschiedlich bekannte Hauptmechanismen (siehe Abb. 5 bis Abb. 7) [73].

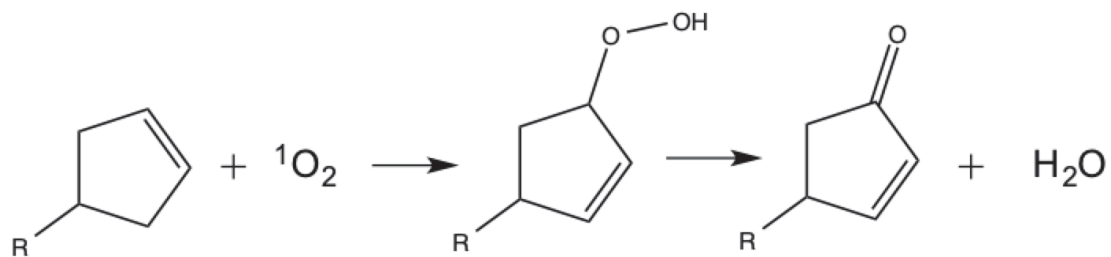


Abb. 5: Singulett-Sauerstoff kann an das Kohlenstoffatom einer Doppelbindung addiert werden. Dabei lagert sich die Doppelbindung zum Nachbarkohlenstoffatom um und es entsteht ein Hydroperoxid. Bei dieser Reaktion entsteht kein freies Radikal.

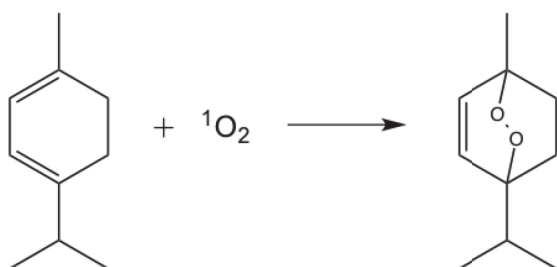
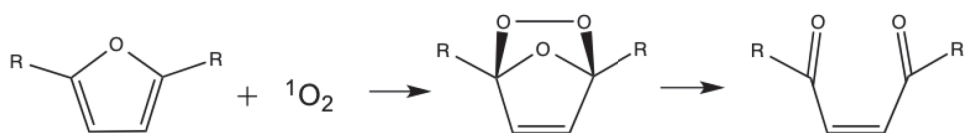


Abb. 6: Bei der [4+2]-Cycloaddition von $^1\text{O}_2$ an 1,3-Diene nach dem Prinzip von Diels-Alder entstehen Endoperoxide.

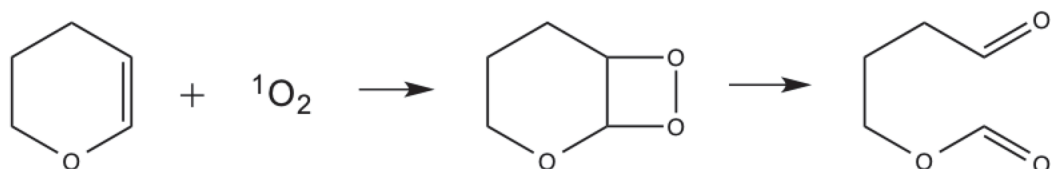


Abb. 7: Addition von $^1\text{O}_2$ an aktivierte Doppelbindungen.

$^1\text{O}_2$ hat in H_2O eine intrazelluläre Lebensdauer von $t_{0.5} \approx 3 \mu\text{s}$ und eine Wanderungstrecke von 155 nm. In D_2O ist die Lebensdauer aufgrund von Lösemittel-Isotopeneffekten mit $t_{0.5} \approx 67 \mu\text{s}$ erheblich länger [74]. Intrazellulär entsteht $^1\text{O}_2$ aus $^3\text{O}_2$ als Abbauprodukt während metabolischer Reaktionen, unter anderem z. B. bei der Atmungskette oder Photosynthese. Mechanistisch geschieht dies hauptsächlich über zwei unterschiedliche Wege: Entweder photochemisch mittels Photosensibilisatoren (z. B. Porphyrinen) und Licht oder enzymatisch (z. B. durch Myeloperoxidase) [69, 75]. Die natürliche Entstehung von $^1\text{O}_2$ als physiologisches Abfallprodukt wird auch experimentell zur $^1\text{O}_2$ -Erzeugung genutzt, in dem Myeloperoxidasen verwendet werden oder Photosensibilisatoren, wie z. B. Methylenblau, Bengal Rosa oder Acridin Orange oder auch Porphyrine eingesetzt und mit Licht im entsprechenden Wellenlängenbereich bestrahlt werden [71, 76, 77]. Desweiteren kann zur experimentellen Singulett-Sauerstoff-Erzeugung der Fluoreszenzfarbstoff ReAsH, der an ein proteingebundenes Tetracysteinmotif bindet und so gesteuert nach Belichtung $^1\text{O}_2$ intrazellulär freisetzt, genutzt werden [78]. Die thermolytische Freisetzung von $^1\text{O}_2$ mittels chemisch inerten Naphthalin-Endoperoxiden stellt die reinste derzeit bekannte $^1\text{O}_2$ -Quelle dar. Das heißt, dass neben Singulett-Sauerstoff keine anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) erzeugt werden [79, 80]. Intrazelluläre Angriffspunkte sind Proteine, Lipide, Ascorbat und die Guanin- bzw. Guanosinbausteine der DNA oder RNA (siehe Abb. 8) [1, 81]. Der intrazelluläre Angriff von $^1\text{O}_2$ hat einen direkten Einfluss auf den Stoffwechsel verschiedener Enzyme, hemmt die DNA-Replikation [82] und führt zu Mutagenesen [83].

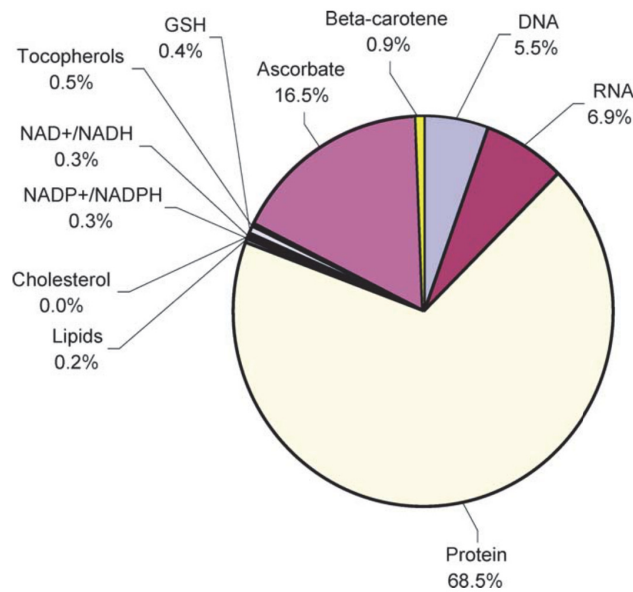


Abb. 8: Geschätzter $^1\text{O}_2$ -Verbrauch intrazellulärer Targets in einer Leukozytenzelle [1].

Singulett-Sauerstoff kann auf physikalische oder chemische Weise deaktiviert werden (Quenching). Beim physikalischen Quenching wird die Energie des $^1\text{O}_2$ auf den sogenannten Quencher übertragen, der dann relaxiert, indem er die Energie in Form von Wärme abgibt und erneut Energie vom $^1\text{O}_2$ aufnehmen kann. Der Quencher, der die Lebenszeit von $^1\text{O}_2$ auf diese Weise am besten verkürzt und auch in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen ist, ist Natriumazid. Bei der chemischen $^1\text{O}_2$ -Deaktivierung findet eine strukturelle, irreversible Veränderung, z. B. durch eine Oxidationsreaktion des Quenchers statt. Zu beachten ist, dass im Gegensatz zu den physikalischen Quenchern, die unerschöpflich für die $^1\text{O}_2$ -Deaktivierung im Gemisch zur Verfügung stehen, die chemischen Quencher in einer Reaktion verbraucht werden und es daher zu unterschiedlichen Reaktionskonstanten kommen kann. Nachweisbar ist $^1\text{O}_2$ durch Lumineszenz bei 1270 nm beim Übergang in den Triplet-Zustand oder indirekt durch Nachweis chemischer Oxidationsprodukte.

Von besonderer pharmakologischer Bedeutung ist $^1\text{O}_2$ gegenwärtig im Zusammenhang mit der photodynamischen Therapie (PDT). Bei diesem Verfahren zur Behandlung von Tumoren wird dem Patienten entweder lokal oder systemisch ein sogenannter Photosensibilisator verabreicht und das betroffene

Gewebe anschließend mit Licht passender Wellenlänge bestrahlt. Der entstandene $^1\text{O}_2$ schädigt dabei gezielt entartete Zellen [84, 85].

1.6 Ziel der Arbeit

In der Arbeitsgruppe Gründemann wurde von Markus Bach mittels retroviraler Insertion ein ETT-Zebrafisch-Knockout-Modell erzeugt, welches anschließend von Carolin Pfeiffer auf molekularer Ebene untersucht wurde. Durch die *SLC22A4*-Geninaktivierung wurde ein Modell geschaffen, in dem der globale ET-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp mehr als 1000-fach ($(0,06 \pm 0,01)$ ng/g gegen (138 ± 61) ng/g Feuchtmasse; Standard-Futter; $n = 3$; $p = 0,09$) erniedrigt war (siehe Abb. 9).

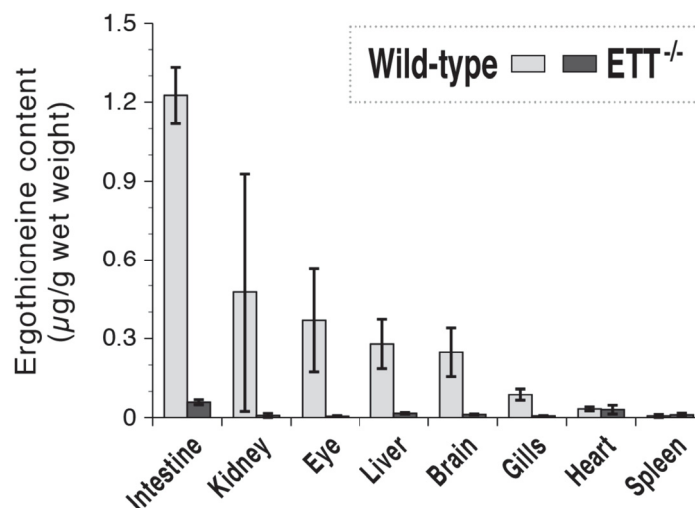


Abb. 9: ET-Gehalt von Geweben adulter Wildtyp- und ETT-Knockout-Fische. Der ET-Gehalt wurde mittels LC-MS/MS bestimmt und die Fische (Ekkwill-Stamm) waren mit Standardfutter gefüttert worden. [2]

Die massenspektrometrische Analyse der Gewebekomponenten von Knock-out-Zebrafischen hat ein signifikantes, reproduzierbares Signal geliefert, was als 8-Oxoguanin (8OG; alias 8-Oxo-7,8-dihydroguanin) identifiziert werden konnte (siehe Abb. 10). 8OG war in der Haut der ETT-Knockout-Zebrafische um den Faktor $3,8 \pm 0,7$ und somit signifikant erhöht. Dieser starke Effekt in der Haut korreliert mit der Erkenntnis, dass die höchsten ET-Gehalte im Wildtyp ebenfalls in der Zebrafischhaut gemessen wurden. 8OG und die 8OG-Nukleoside 8-Oxo-

7,8-dihydroguanosin und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin, aus denen 8OG enzymatisch freigesetzt werden kann, sind Marker für oxidative Schäden der DNA und RNA [86]. 8OG wird intrazellulär entweder durch die Reaktion von Guanin mit Hydroxyl-Radikalen ($\cdot\text{OH}$) oder Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet [87] (siehe Abb. 11).

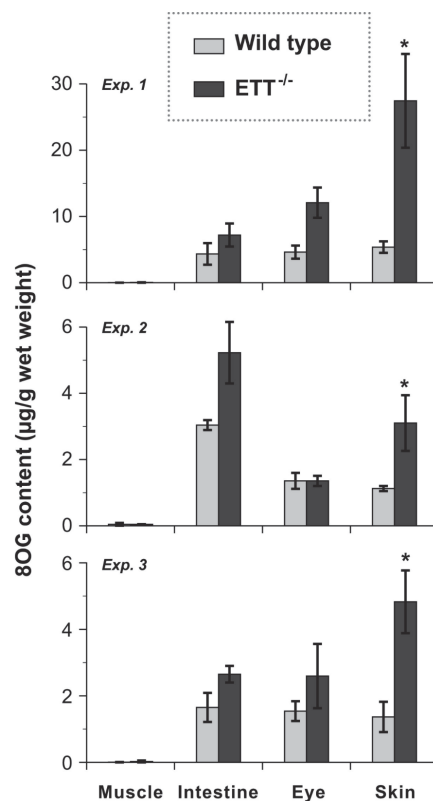


Abb. 10: Gehalt von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) in Ganzfisch-Gewebehomogenaten. Verglichen wurden ausgewachsene Wildtyp- und Knockout-Zebrafische und abgebildet sind Daten von drei unabhängigen Analysen. Der Analyt wurde per LC/MS-MS vermessen ($n = 5$; Median \pm median absolute deviation). Der Stern markiert $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test, zweiseitig). [2]

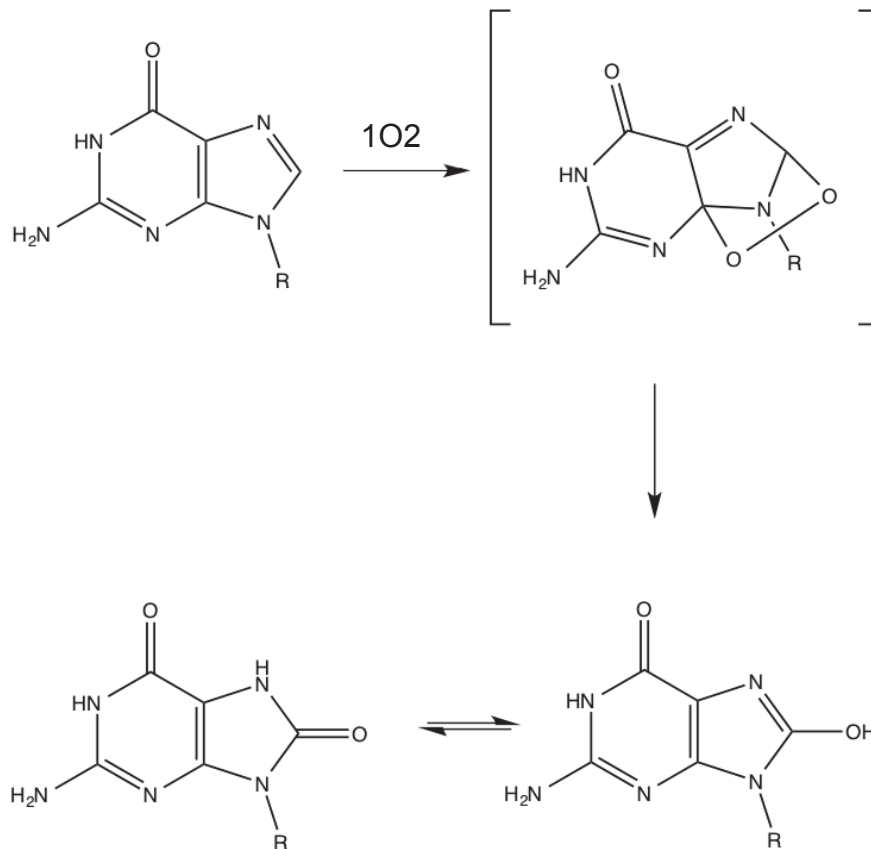


Abb. 11: Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Guanosinderivaten. Der Mechanismus verläuft über ein instabiles Endoperoxid-Intermediat (modifiziert nach [73]).

Die aus dem Zebrafisch-Modell gewonnenen Daten und die Tatsache, dass Hydroxyl-Radikale sehr reaktiv sind und alle vier Nucleobasen modifizieren, Singulett-Sauerstoff hingegen selektiv über [4+2]-Cycloaddition aufgrund seines Redoxpotentials nur mit Guanin reagiert [87, 88], führt zu einer klaren Hypothese: Die universelle und spezifische Funktion von Ergothionein ist der Schutz des Organismus vor Singulett-Sauerstoff. Als Imidazol-Derivat mit offensichtlicher Strukturverwandtschaft zum 8OG (siehe Abb. 12) hat ET die chemischen Eigenschaften, die für eine Reaktion mit Singulett-Sauerstoff erforderlich sind. Um die Beteiligung des Imidazolrings an der Reaktion zu zeigen, wurde z. B. Diphenylimidazol eingesetzt [89] und auch das unmodifizierte Imidazol findet vielfach, auch intrazellulär, Anwendung als physikalischer Singulett-Sauerstoff-Quencher [90]. Bei der [4+2]-Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an Imidazol entstehen 2,5-Endoperoxide (siehe Abb. 6). Dieses instabile Intermediat lagert sich zu einem 2-Hydroxyperoxid um, das intrazellulär zu einem 2-Hydroxyl reduziert wird [87]. Es ist allerdings auch

bekannt, dass 8-Oxoguanin etwa 100 Mal schneller mit Singulett-Sauerstoff weiterreagiert, als Guanin [73, 91]. Das Cytosol, einem Bereich mit hohem Singulett-Sauerstoff Aufkommen, ist für lipophile, antioxidative Verbindungen, wie Retinoide (Vitamin A) und Tocopherole (Vitamin E) unzugänglich, aber für ET aufgrund seiner hydrophilen Struktur erreichbar.

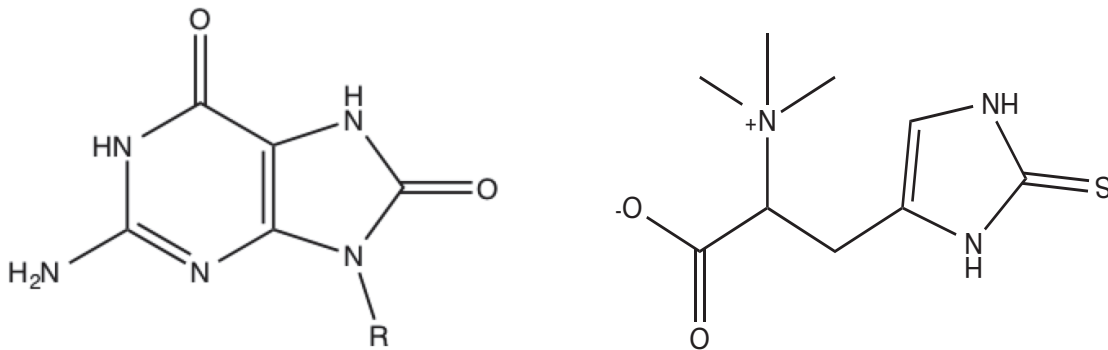


Abb. 12: Strukturverwandtschaft von 8-Oxoguanin (links) und Ergothionein (rechts).

Bisher ist über die Wirkung von ET auf $^1\text{O}_2$ nicht viel bekannt. Es gibt einige wenige Arbeiten, in denen die Wirkung *in vitro* untersucht wurde, jedoch sind physiologische Bedingungen nicht mit denen einer Pufferlösung vergleichbar. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des potentiell schützenden Effekts von Ergothionein gegen Singulett-Sauerstoff in der lebenden Zelle. Ein steuerbares, heterologes Expressionssystem, mit dem die gezielte ET-Beladung von HEK-293-Zellen möglich ist, ist seit vielen Jahren in der Arbeitsgruppe Gründemann etabliert. Es ist jedoch erforderlich, in einem ersten Schritt Methoden zu entwickeln, $^1\text{O}_2$ möglichst spezifisch, d.h. ohne Nebenproduktion anderer, sogenannter Typ-I-ROS, wie z. B. Hydroxyl-Radikalen, H_2O_2 oder Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^- \cdot$) (siehe Abb. 13) zu generieren. Singulett-Sauerstoff intrazellulär enzymatisch zu erzeugen schien unter den gegebenen Voraussetzungen nicht realisierbar; Photosensibilisatoren, wie z. B. Bengalrosa oder Porphyrine hingegen sind relativ einfach und günstig zu beschaffen. Sie gelangen über freie Diffusion in die Zelle und durch Belichtung passender Wellenlänge wird kontinuierlich $^1\text{O}_2$ freigesetzt. Zu beachten bei dieser konventionellen Methode ist allerdings, dass neben einer großen Menge $^1\text{O}_2$

auch in erheblichem Maße Typ-I-Radikale gebildet werden, die ebenfalls einen oxidativen Zellschaden verursachen und zum Anstieg potentieller Marker von $^1\text{O}_2$ -Reaktionen führen können [88].

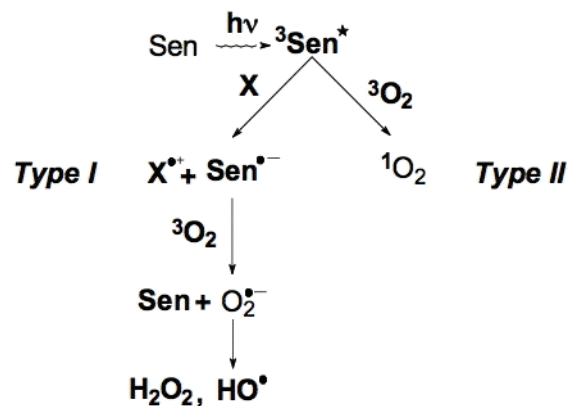


Abb. 13: Photosensibilisatoren erzeugen parallel zu Singulett-Sauerstoff auch andere Radikale [73].

Mit dem Naphthalin-Derivat DHPN (N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid), welches eigens für dieses Projekt von Herrn Prof. Dr. Günther Schmalz und seinen Mitarbeitern (Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln) synthetisiert wurde, kann dieses Problem der unspezifischen ROS-Erzeugung umgangen werden. Mit dieser Verbindung wird Singulett-Sauerstoff in der Kälte angelagert und als Endoperoxid über Diffusion in die Zellen eingebracht, wo über thermische Dissoziation ausschließlich $^1\text{O}_2$ freigesetzt wird.

Eine weitere Herausforderung ist die Quantifizierung des oxidativen Schadens. Die erhöhten 8OG-Konzentrationen in den Zebrafisch-Knockout-Fischen liefern erste Hinweise auf einen potentiellen Marker, aber wir wollen darüber hinaus weitere intrazelluläre Angriffspunkte von Singulett-Sauerstoff ausfindig machen, um ein umfangreicheres Verständnis der komplexen Reaktionen zu erlangen. Ein Teil der 20 essentiellen Aminosäuren reagiert mit $^1\text{O}_2$. Bei der Reaktion mit Histidin, Tyrosin und Tryptophan kommt es zur Bildung von Endo- und Hydroperoxiden und bei den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein wird jeweils das Schwefelatom oxidiert [1, 81]. Des Weiteren ist nach unserem Kenntnisstand wenig in der Literatur über die Vergleichbarkeit der

schützenden Wirkung von ET mit anerkannten oder potentiellen Singulett-Sauerstoff-Quenchern, wie z. B. Azid, Ascorbat, Imidazol oder GSH bekannt. Dazu werden *in vitro* Versuche durchgeführt, bei denen Methioninsulfoxid als chemisches Reaktionsprodukt von Methionin und Singulett-Sauerstoff als Quantifizierungsmarker dient [1].

2 MATERIAL & METHODEN

Alle für diese Arbeit durchgeführten Experimente haben in der Arbeitsgruppe Gründemann, Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln stattgefunden. Die Synthese von DHPN und die Beladung zu DHPNO₂ wurde im Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln von der Arbeitsgruppe Schmalz durchgeführt. Die Analysen mittels Orbitrap Massenanalysator wurden von der Arbeitsgruppe Schäfer am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln durchgeführt.

2.1 Verbrauchsmaterialien

Glas- und Plastikgefäße wurden von den Firmen Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Alle Materialien wurden entweder steril verpackt gekauft oder vor dem Gebrauch bei 121 °C in Wasserdampf bei 1,2 bar für 20 min im Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert. Alle Glasgefäße wurden 4 h in einem Heißluftsterilisator (Typ T12, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland) bei 200 °C sterilisiert.

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ verwendet. Die verwendeten Farbstoffe Protoporphyrin IX, 98 % und Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat, 98 % wurden von der Firma Porphyrin

Systems GbR (Appen, Deutschland) bezogen. 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan wurde von der Firma AK Scientific, Inc. (Union City, USA) bezogen. Ergothionein wurde bei den Firmen OXIS, International, Inc. (Tampa, USA) und bei der Bachem AG (Bubendorf, Schweiz) eingekauft.

2.3 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen bzw. deren Stammlösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur hergestellt und autoklaviert oder steril filtriert (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Leuven, Niederlande). Der pH-Wert der jeweiligen Lösungen und Puffer wurde mit einem pH-Meter (Typ 761 bzw. 766 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland) gemessen bzw. gegebenenfalls justiert. Genaue Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind in den jeweiligen Kapiteln der entsprechenden Methoden beschrieben.

2.4 Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden an einer Reinraumwerkbank (Laminar Flow, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Verwendete Lösungen und Gegenstände, die mit *E. coli* in Kontakt kamen, wurden zuvor autoklaviert oder steril filtriert (0,22 µm Porengröße) bzw. mit 70 % Isopropanol desinfiziert.

2.4.1 Bakterienstamm

Der verwendete Bakterienstamm war *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10B (Genotyp: F-, *mcrA*, (*mrr-hsdRMs-mcrBC*), *80dlacZ* M15, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, (*ara*, *leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*). *E. coli* wurde in Flüssigmedium sowie auf Agarplatten kultiviert, wobei Ampicillin zur Selektion diente.

2.4.2 Nährmedien

Die *E. coli* Bakterien wurden in einem Luria Bertani (LB)-Medium aufgezogen. Nach der Herstellung wurde das Nährmedium jeweils direkt autoklaviert und bei 4 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Der Selektionsdruck wurde mit Hilfe von steril filtriertem Ampicillin aufgebaut, da das verwendete Plasmid (siehe Abb. 14) eine Ampicillin-Resistenz-Kassette enthält. 100 mg/ml Vorverdünnungen von Ampicillin wurden 1:10 verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 10 µg/ml in der Lösung vorherrschte.

Für die Agarplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt, welches dann autoklaviert und bei 4 °C gelagert werden konnte. Vor dem Gießen der Platten wurde der Agar auf maximal 37 °C erwärmt und mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Die warme LB-Agar-Lösung wurde in sterile Petrischalen (Durchmesser 10 mm) gegossen und aushärten gelassen. Nach dem Erkalten konnten die Platten bei 4 °C gelagert werden.

LB-Medium		LB-Agar	
10 g/l	Casein Hydrolysat	10 g/l	Casein Hydrolysat
5 g/l	Hefeextrakt	5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl	5 g/l	NaCl
		15 g/l	Agar

2.4.3 Kultur, Herstellung und Lagerung von *E. coli*

2.4.3.1 Flüssigkultur

Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium entweder in einem Reagenzglas mit Kapsenberg-Kappe in 2 ml LB-Medium bzw. für größere Mengen in 200 ml in einem 500 ml-Schüttelkolben mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (siehe Nährmedien). Die Flüssigkulturen wurden mit einem Einzelklon, der mit einer ausgeglühten Platinöse von der Agarplatte entnommen wurde oder einem Abstrich des Glycerolstocks (siehe 2.4.3.5) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert (Inkubationsschüttler, Minitron HT, Infors Ag, Bottmingen, Deutschland).

2.4.3.2 Plattenkultur

Für Kulturen auf Agarplatten wurden 100 µl einer Bakteriensuspension und eine hundertfache Verdünnung der Suspension auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem sterilen Drigalsky-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit Parafilm abgedichtete Platten konnten bis zu 8 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.4.3.3 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde ein Verdünnungsausstrich vom DH10B Glycerolstock auf einer Agarplatte ausgestrichen und für ca. 20 h bei 37 °C inkubiert. Vier Einzelkolonien wurden mit einer ausgeglühten Impföse gepickt und in je 5 ml Super Optimal Broth (SOB)-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler (Inkubationsschüttler, Minitron HT, Infors Ag, Bottmingen, Deutschland) inkubiert. Diese Vorkulturen wurden in jeweils 200 ml SOB-Medium in einen Schikanekolben überführt und für weitere 2–3 Stunden bei ebenfalls 37 °C inkubiert. Der Inhalt von je 2 Schikanekolben wurde anschließend vereinigt und für 15 min auf Eis gestellt bevor er für 10 min

bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 ml eiskalter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Zentrifugation und ein sich anschließender Waschschrift wurden ein weiteres Mal wiederholt und final wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abgießen des Überstands in dem Restüberstand gelöst und zu je 25 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

SOB-Medium	
20,0 g/l	Casein Hydrolysat
5,0 g/l	Hefeextrakt
10,0 mmol/l	NaCl
2,5 mmol/l	KCl

2.4.3.4 Elektrotransformation

Zellmembranen von Bakterien sind impermeabel für Nucleinsäuren, um eine DNA-Replikation und Proteinexpression möglich zu machen. Bei der elektrischen Transformation werden die Bakterienzellen kurzzeitig einer sehr hohen Spannung ausgesetzt, wodurch die Membran zeitweise porös wird und ein ungehinderter Stoffaustausch zwischen Cytosol und Medium erlaubt wird [92].

Für die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation wurden 25 µl elektrokompente Zellen mit 1–20 ng DNA gemischt und für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette (1 mm Elektrodenabstand, Biorad, München, Deutschland) überführt. Bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 200 µF und einer Spannung von 1,6 kV mittels eines Gene-Pulsers der Firma Bio-Rad konnte ein optimales Ergebnis erwartet werden. Eine Zeitkonstante von < 5 msec sollte bei diesen Voreinstellungen nicht überschritten werden. Nach Übertragung des elektrischen Impulses auf die Bakterien wurden sie direkt mit SOC-Medium (37 °C) versetzt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der unverdünnten Bakterienkulturlösung und eine 1:100-Verdünnung auf je einer

Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) (siehe 2.4.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium	
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glukose
	in SOB-Medium aufgenommen

2.4.3.5 Glycerolstock

Für die Langzeitlagerung der Bakterien, deren Archivierung in der arbeitsgruppeninternen Datenbank und um einfach und schnell neue DNA zur Verfügung zu haben, wurde 1 ml LB-Medium mit einem einzelnen gepickten Klon für 4–5 h angeimpft und über einen Zeitraum von 4–5 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-suspension mit 10 % (v/v) Glycerol in LB-Medium gemischt und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen bei –80 °C eingefroren.

2.4.3.6 Plasmid-Präparation im Maximaßstab mit Säule

Die Plasmid-DNA wurde mittels des DNA-Präparations-Kits NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Dafür war es erforderlich entweder eine einzelne Kolonie der Agarplatte oder einen Abstrich eines Glycerol-Stocks in 200 ml ampicillinhaltiger Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm zu inkubieren. Nach ca. 20 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation (Sorvall® RC 5B Plus mit Ausschwing-Rotor Sorvall HS-4, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) für 15 min bei 4 °C und 3000 g geerntet. Die weiteren Schritte wurden nach Vorgaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.5 Zellbiologische Methoden

Zur Gewährleistung einer sterilen Arbeitsweise wurden alle Arbeiten unter einer Sicherheitsbank mit vertikalem Luftstrom (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die Sicherheitsbank, sowie alle Utensilien wurden vor Gebrauch mit 70 %-igem Isopropanol desinfiziert. Verwendete Lösungen und Puffer wurden autoklaviert und Antibiotika wurden steril filtriert (Steril Syringe Filter 0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Darmstadt, Deutschland). Medien wurden vor Gebrauch bei 37 °C vorgewärmt.

2.5.1 Zelllinie und Expressionssystem pEBTetD

Die Klonierung des humanen *SLC22A4*-Transporters wurde von Beatrix Steinrücken durchgeführt. Die Expression des *SLC22A4*-Transporters fand in der humanen Nieren-Karzinom-Zelllinie (Human Embryonic Kidney (HEK-293) American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) statt. HEK-293-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die mit dem humanen Adenovirus transformiert wurden [93].

Für die Expression der entsprechenden cDNA wurde der in der Arbeitsgruppe entwickelte Expressionsvektor pEBTetD verwendet [94]. Dieser Vektor ist aufgebaut auf Elementen des Epstein-Barr-Virus. Das Plasmid pCEP-PU [95] dient als Grundgerüst und die Expression wird über ein Tetracyclin-Repressor-System gesteuert. Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes DNA-Virus aus der Familie der Herpesviren. Der Replikationsursprung oriP und das DNA-Bindeprotein EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) [96] wurden als Regionen der Virus-DNA identifiziert, die eine autonome Replikation zirkulärer DNA erlauben. Der große Vorteil dieses Expressionssystems gegenüber anderen ist, dass sich alle benötigten Komponenten für die induzierbare Expression auf einem einzigen Vektor befinden, der nicht in das Genom von HEK-293-Zellen integriert wird und eine Zelllinie somit schon nach einer einzigen Transfektion und nachfolgender Selektionsphase etabliert ist.

In Abb. 14 ist der schematische Aufbau von pEBTetD dargestellt. pEBTetD enthält zur Vermehrung in Bakterien einen pUC-Replikationsursprung (engl., plasmid of the University of California) mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette. Zusätzlich enthält der Vektor einen SV40 Promotor (Simianes Virus 40), der ein Protein exprimiert, was in humanen Zelllinien nach erfolgreicher Transfektion für eine konstante Puromycinresistenz sorgt. Der Tet-Repressor wird kontinuierlich exprimiert und bildet Homodimere aus, die an die Tet-Operatoren (tetO2) andocken und die Transkription der Downstream cDNA unterbinden. Die Bindung von Doxycyclin an den Tet-Repressor ändert dessen Konformation, wodurch die Bindung an den Operator verhindert wird und die Transkription induziert wird.

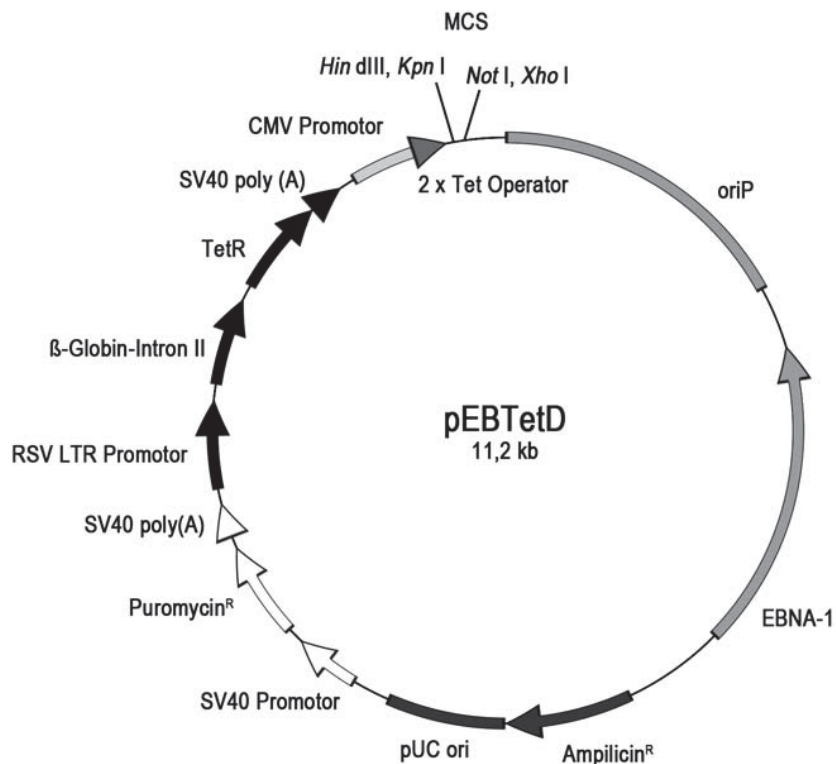


Abb. 14: Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pEBTetD. Die funktionellen Komponenten des Vektors und deren Orientierung sind als Pfeile dargestellt. [94]

2.5.2 Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen

Die Kultivierung der HEK-293-Zellen (human embryonic kidney, American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) fand bei 37 °C und 5 % CO₂ in

wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Hera Cell, Hereus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) statt. Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden in 75 cm² Plastikkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert und als Wachstumsmedium wurde ein mit 10 % hitzeinaktiviertem (60 min bei 56 °C) fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetztes Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Transfizierte Zellen wurden in 175 cm² Plastikkulturflaschen in Selektionsmedium, bestehend aus DMEM, 10 % hitzeinaktiviertem FCS und Puromycin (MP Biomedicals, Ohio, USA) in einer Endkonzentration von 3 µg/ml gezogen. Ein Mediumwechsel fand alle zwei bis drei Tage statt und eine Passage der Zellen erfolgte, sobald die Zellen zu fast 100 % konfluent waren. Die Zellen wurden subkultiviert in dem das Medium gewechselt und die Zellen vom Flaschenboden abgeklopft und resuspendiert wurden. Je nach Bedarf wurde die Zellsuspension auf eine neue Flasche überführt und mit entsprechendem Medium zu 15 ml bei den 75 cm² und zu 30 ml bei den 175 cm² aufgefüllt.

2.5.3 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Bei dem Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen spricht man von der sogenannten Transfektion. Hierbei wird unterschieden zwischen der transienten Transfektion, bei der das Plasmid nur temporär in die Wirtszelle eingebracht wird und der stabilen, dauerhaften Transfektion.

Im vorliegenden Fall wurde stabil transfiziert und als Reagenz TurboFect™ (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine polymer-vermittelte Transfektion, wobei die Aminogruppen der Polymere als Ladungsträger dienen. Ihre protonierten, positiv geladenen Stickstoffe binden durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und bilden dadurch kleine stabile Polymer-DNA-Komplexe, die endozytiert werden. Der sogenannte Protonenschwamm-Effekt dieser Komplexe puffert den sauren, endosomalen pH-Wert dadurch, dass eine

hohe Dichte an protonierbaren Stickstoffen zur Aufnahme von weiteren Protonen und passiv zum Influx von Cl^- führt. Der Anstieg des osmotischen Drucks sorgt für einen Wassereinstrom, was schließlich zur Osmolyse der Endosomen führt und zur Freigabe dessen Inhalts ins Cytoplasma. Die DNA translokiert in den Nukleus. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz aus den Kulturflaschen entfernt und durch 10 ml DMEM mit 10 % FCS ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde auf Selektionsmedium umgestellt, welches sich aus 15 ml DMEM, 10 % FCS (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) und 3 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin, zusammensetzte.

2.5.4 Vorbereitung der Zellen für Singulett-Sauerstoff Experimente

2.5.4.1 Aussaat nicht-transfizierter Zellen

Um Oxidationsprodukte von Singulett-Sauerstoff im Zelllysat identifizieren und quantifizieren zu können, wurden die nicht-transfizierten Zellen in Polystyrol-Schälchen (\varnothing 60 mm, Nunclon™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Für eine bessere Adhärenz der Zellen während der Versuchsdurchführung wurden die Polystyrol-Schälchen zuvor mit 2 ml steril filtriertem Poly-L-Ornithin beschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schälchen wurden mit 3 ml serumfreiem DMEM gewaschen und anschließend ca. 2 Mio. Zellen in 4 ml DMEM mit 10 % FCS ausgesät.

Poly-L-Ornithin-Lösung	
0,1 g/l	Poly-L-Ornithin
150,0 mmol/l	Borsäure
	pH 8,4 mit NaOH

2.5.4.2 Aussaat transfizierter Zellen

Um einen Effekt von Ergothionein auf Singulett-Sauerstoff messen zu können, wurden transfizierte Zellen, wie in 2.5.4.1 beschrieben, ausgesät. Die Zellen wurden auf den Schälchen in 4 ml DMEM mit 10 % FCS und 3 µg/ml Puromycin inkubiert und mindestens 20 h vor dem Aufnahmeversuch wurde die Expression der Transporter durch einen Wechsel des Mediums mit dem Zusatz von 1 µg/ml Doxzyklin induziert. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung lag die Konfluenz der Zellen bei mindestens 70–90 %. Der gemessene Effekt sollte auch mit dem bekannter Quencher verglichen werden. Dafür wurden Zellen analog behandelt und anstatt mit 100 µmol/l Ergothionein mit Imidazol in Konzentrationen von 10 mmol/l, 30 mmol/l und 100 mmol/l, 30 mmol/l Natriumazid oder 100 µmol/l Ascorbinsäure inkubiert.

2.5.5 Zellaufschluss

Die Zellen wurden, wenn die Analyse mittels LC-MS/MS erfolgte, nach dreimaligem Waschen mit jeweils 4 ml 4 °C kaltem Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (KRH-Puffer) mit 1 ml Methanol lysiert. Bei einem Aufnahmeversuch, bei dem zusätzlich eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde, wurden parallel 3 Schälchen ausgesät, da für diese Bestimmung mittels des BCA-Assays (siehe 2.5.6) ein alkalisches Milieu benötigt wird. Diese Zellen wurden ebenfalls gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,1 % Triton-X-100 (v/v) in 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) lysiert. Die Inkubationszeit betrug für beide Methoden 20 min bei Raumtemperatur. Die Zelllysate wurden bis zur Analyse bei –20 °C eingefroren.

KRH	
5,6 mmol/l	(+)-Glucose
125,0 mmol/l	NaCl
4,8 mmol/l	KCl
1,2 mmol/l	KH ₂ PO ₄
1,2 mmol/l	CaCl ₂
1,2 mmol/l	MgSO ₄
25,0 mmol/l	HEPES
	pH 7,4 mit NaOH

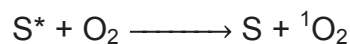
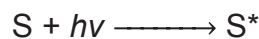
2.5.6 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

In einigen Versuchen wurden die Proteinkonzentrationen der gewonnenen Zelllysate aus individuellen Schälchen der Belichtungsversuche (siehe 2.6) bzw. der DHPNO₂-Versuche (siehe 2.7) mittels Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt. Für diese Methode mussten separat Zellen ausgesät werden, die mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7,4 lysiert wurden. Dazu wurde das Protein-Assay Kit der Firma Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) herangezogen, welches auf der Biuret-Reaktion basiert, bei der Proteine im Alkalischen Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren. Als Reaktionsprodukt entsteht ein wasserlöslicher und intensiv purpur gefärbter Chelatkomplex aus Bichinolin-4-Carbonsäure (BCA) und Cu⁺-Ionen. Hierfür wurden die Proben 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, bevor sie 1:10 mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt wurden. Jeweils 40 µl dieses Ansatzes wurden auf eine 96-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht- Rommelsdorf, Deutschland) pipettiert. 200 µl Färbelösung bestehend aus 50 Teilen Reagenz A (BCA) und 1 Teil Reagenz B (4%-ige Kupfersulfatlösung) wurden zu der Probe in die Vertiefung gegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde jede Probe dreifach bestimmt und Rinderserumalbumin (BSA) als Standard mit bekannten Konzentrationen (0,0 µg/ml, 59,1 µg/ml, 113,35 µg/ml, 172,75 µg/ml und 227,25 µg/ml) für eine Eichgerade verwendet. Die Eichgerade, anhand dessen später die Proteinkonzentrationen berechnet wurden, ist zweifach hergestellt und parallel vermessen worden. Die Extinktion wurde mit einem

ELISA-Reader (Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA bzw. Nano Quant Infinite M200 PRO, TECAN, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 568 nm gemessen.

2.6 Intrazelluläre Singulett-Sauerstoff-Freisetzung mittels Photosensibilisatoren

Klassischerweise wird Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von Photosensibilisatoren erzeugt. Dabei absorbieren konjugierte Doppelbindungssysteme Lichtenergie (Photonen) geeigneter Wellenlänge und übertragen die Energie in einem weiteren Schritt auf Sauerstoff:



(Gleichung 1)

Beispiele für etablierte Sensibilisatoren sind Farbstoffe wie Metylenblau und Bengal Rosa [70]. Es werden aber auch Biomoleküle, wie z. B. Riboflavin, Bilirubin und besonders Porphyrine verwendet. Die aufgeführten Verbindungen sind alle sehr hydrophob und gelangen passiv zumindest bis in die Zellmembran. Eine Auswahl geeigneter etablierter Photosensibilisatoren wurde in dieser Arbeit getestet.

Die im Folgenden beschriebenen methodischen Versuchsabläufe fanden nicht mehr unter sterilen Bedingungen statt. Nicht-transfizierte 293-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.5.4.1 beschrieben, als Monolayer in Plastikschälchen gezogen. Mit pEBTetD/ETTh stabil transfizierte 293-Zellen [94] wurden, wie in Kapitel 2.5.4.2 beschrieben, ausgesät. Als Kontrollzellen dienten hier Zellen, die nicht über 20 h mit 1 µg/ml Doxzyklin inkubiert wurden. Die ETT-exprimierenden Zellen wurden dann 1 h mit 100 µmol/l Ergothionein (ET) (Hersteller: Tetrahedron, Romainville, Frankreich) in Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (KRH) inkubiert, um eine intrazelluläre Konzentration von ungefähr 1 mmol/l zu erreichen. Die Triebkraft

liefert der Kotransport mit Natrium [20]. Das Nährmedium bzw. der KRH-Puffer, in dem ET gelöst war, wurde abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit jeweils 4 ml eiskaltem KRH gewaschen, bevor sie bei 37 °C mit den jeweiligen Konzentrationen der Photosensibilisatoren in KRH (2 ml) über unterschiedliche Zeiten inkubiert wurden (Kontrolle: kein Sensibilisator). Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen in 2 ml KRH mit entweder sichtbarem Licht oder UVA-Licht über unterschiedliche Zeiten bestrahlt (Kontrolle: dunkle Inkubation). Die mit Bengal Rosa, Bengal Rosa Diacetat und 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan inkubierten Zellen wurden mit Licht im Bereich von 480–550 nm bestrahlt, was dem grünen Bereich des sichtbaren Lichts entspricht. Als Lichtquelle diente eine Leuchtstoffröhre bzw. in späteren Versuchen ein handelsüblicher Baustrahler mit stärkerer Lichtintensität. Zur Belichtung der mit Porphyrinen und ALA inkubierten Zellen mit UVA-Licht (385 nm) diente ein UV-Betrachter, der invertiert in einem eigens konstruierten Gerüst aufgestellt wurde, sodass das Licht mit konstantem Abstand nach unten auf die Zellen abgegeben wurde (siehe Abb. 15).

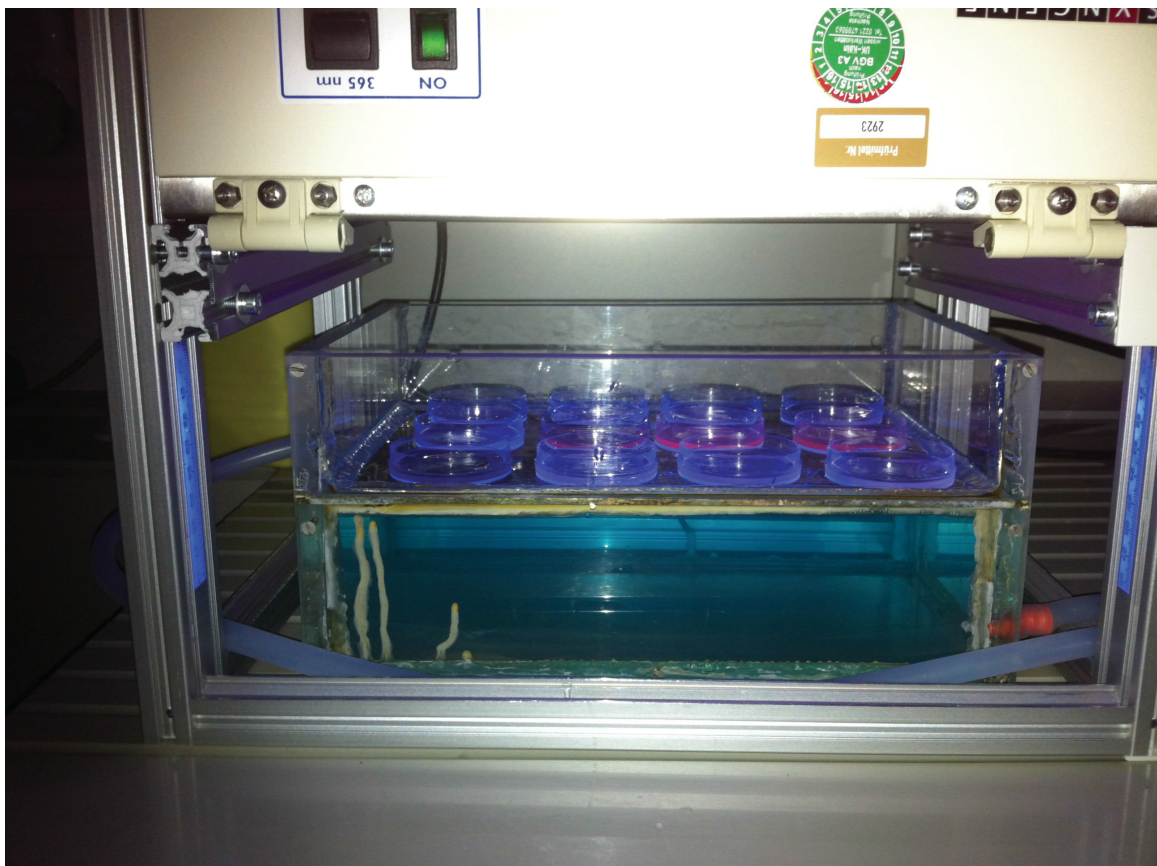


Abb. 15: Belichtung von HEK-293-Zellen mit UV-Licht. Die Zellen befinden sich auf Polystyrol-Schälchen ohne Deckel, die auf einer von unten mit 37 °C warmen Wasser erwärmten Kupferplatte stehen. Die unterschiedlichen Photosensibilisatoren fluoreszieren in unterschiedlicher Farbe und Intensität.

Um die Temperatur während der Belichtung konstant bei 37 °C zu halten, wurden die Polystyrol-Schälchen – ohne Deckel – auf einer 5 mm starken Kupferplatte aufgestellt, welche von unten mit umgewälztem Wasser erwärmt wurde. Für die LC-MS/MS-Analytik wurden die Zellen mit 1 ml Methanol für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Wenn die so gewonnenen Lysate nicht sofort analytisch weiterbearbeitet werden konnten, wurden sie bei –20° C gelagert.

Die Analyse fand mittels LC-MS/MS auf einem Triplequadrupol-Tandem-Massenspektrometer Q Trap 4000 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) statt (siehe 2.8); das HPLC-Gerät ist ein SLC-20AD Prominence (Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Zellen, die der Proteinbestimmung wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben dienen, wurden separat ausgesät und bis auf den Aufschluss mit dem Detergenz (0,1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7,4), anstatt mit Methanol, identisch behandelt.

2.6.1 Bengal Rosa

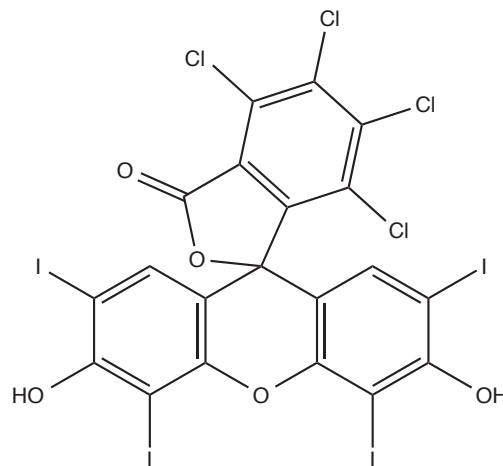


Abb. 16: Bengal Rosa

Bengal Rosa ist ein halogenhaltiges Fluoresceinderivat (siehe Abb. 16) und ein effizienter Singulett-Sauerstoff produzierender Photosensibilisator [71, 76]. Es liegt in fester Form als rotes Pulver und in Lösung rosa vor. Das

Absorptionsmaximum liegt in einem Bereich zwischen 480–550 nm. Dieser Bereich entspricht dem grünen Bereich des sichtbaren Lichts, weshalb die mit Bengal Rosa inkubierten Zellen zur Freisetzung von $^1\text{O}_2$ mit einer handelsüblichen Leuchtstoffröhre (380–750 nm) bestrahlt werden konnten. Im Verlauf der Methodenoptimierung wurde die Konzentration von Bengal Rosa von 800 $\mu\text{mol/l}$ auf 100 $\mu\text{mol/l}$ reduziert und die Inkubationszeit von 24 h über 4 h auf 1 h.

2.6.2 Bengal Rosa Diacetat

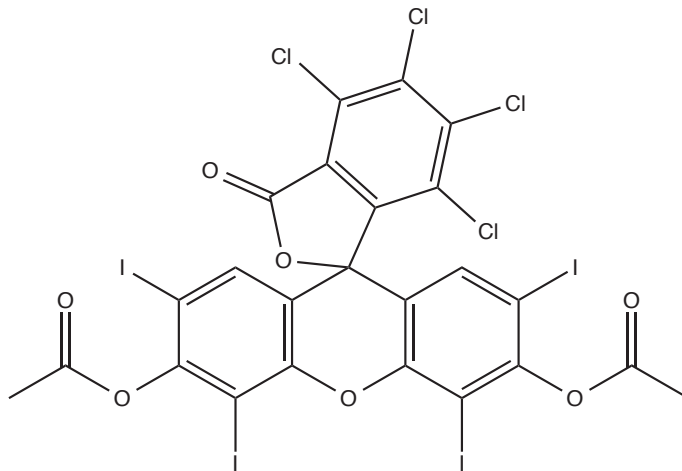


Abb. 17: Bengal Rosa Diacetat

Die diacetylierte Variante von Bengal Rosa ist weniger hydrophob und gelangt somit einfacher in das Zellinnere [97]. Intrazellulär wird durch eine Acetylesterase die Acetatgruppe abgespalten, wodurch das native konjugierte Doppelbindungssystem, das einfache Bengal Rosa, entsteht. Gemäß einer Studie von Bottiroli et al., die an Rattengliomazellen durchgeführt wurde, ist der Singulett-Sauerstoff-Umsatz dieses Bengal Rosa Precursors im Vergleich zum konventionellen Bengal Rosa um ein Vielfaches gesteigert [97].

2.6.3 Protoporphyrin IX

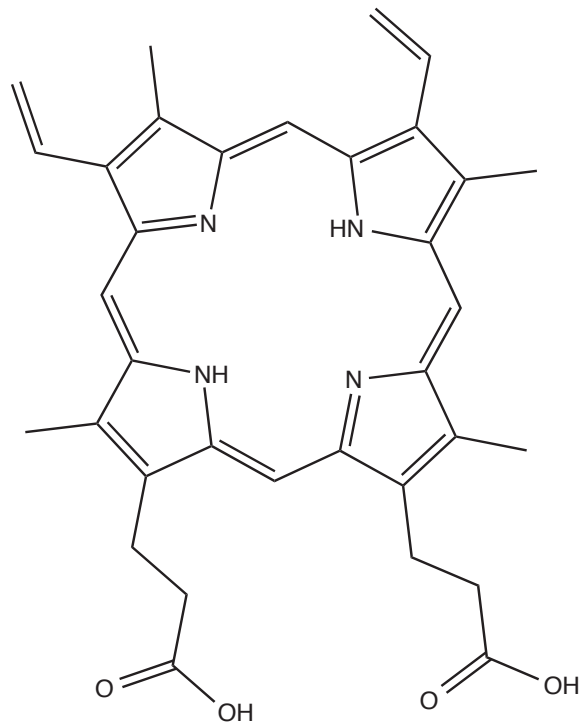


Abb. 18: Protoporphyrin IX

Protoporphyrin IX (PPIX) ist ein Tetrapyrrol und fungiert als Precursor bei der Synthese essentieller prosthetischer Gruppen, wie dem Cytochrom C, Chlorophyll und dem Blutfarbstoff Hämoglobin. Ein Protoporphyrin IX, an das ein Eisenatom gebunden ist, wird als Häm bezeichnet. Bei dem Einbau von Häm in Hämoglobin ändert sich die Oxidationsstufe des Eisenatoms und es kann ein Sauerstoffmolekül binden und übernimmt somit dessen Transportfunktion innerhalb des Organismus.

2.6.4 5-Aminolävulinsäure

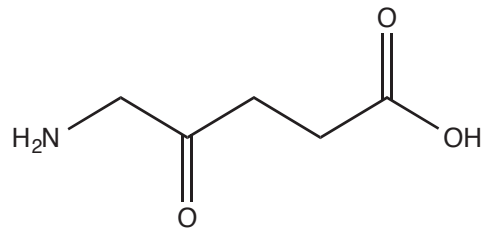


Abb. 19: 5-Aminolävulinsäure

5-Aminolävulinsäure (ALA) ist eine Aminosäure aus der Gruppe der Ketocarbonsäuren und wird, wie auch TMPyP und PPIX, in der photodynamischen Tumorthherapie (PDT) [84, 85] und der Fluoreszenzdiagnostik (FD) [98] eingesetzt. ALA ist eine kleine, im depolarisierten Zustand, hydrophile Verbindung, die mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Zellmembran verbleibt, sondern zu einem gewissen Maß das Zytosol erreicht. Die Aminosäure ist Bestandteil des Protoporphyrin IX, was wiederum eine Vorstufe des Häms darstellt. Zwei Moleküle ALA reagieren unter enzymatischer Abspaltung von zwei Wassermolekülen zu Porphobilinogen (PBG, siehe Abb. 20). Das beteiligte Enzym ist δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase (alias: Porphobilinogen-Synthase). Nach dem Weitertransport der entstandenen Verbindung aus dem Mitochondrium in das Zytosol wird über drei weitere Zwischenschritte aus vier Molekülen PBG der wirksame Photosensibilisator Protoporphyrin IX gebildet.

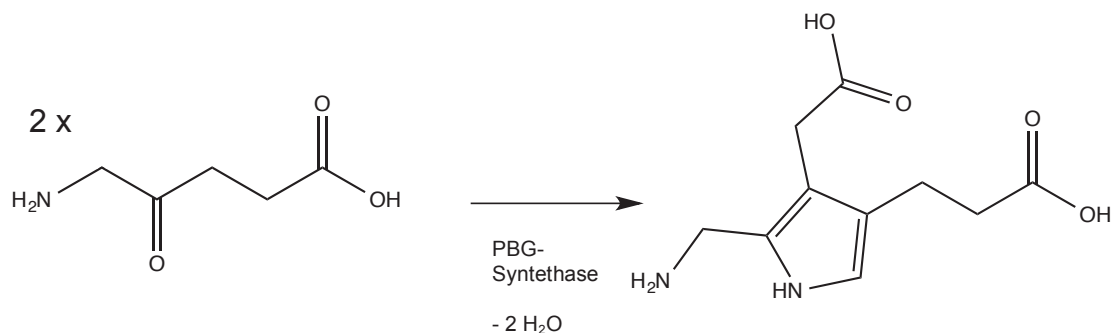


Abb. 20: Reaktion von 2 Molekülen 5-Aminolävulinsäure unter Abspaltung von 2 Molekülen H_2O zu Porphobilinogen (PBG). Das beteiligte Enzym ist Porphobilinogen-Synthase. Vier Moleküle PBG lagern sich zu einem Molekül Protoporphyrin IX zusammen.

2.6.5 TMPyP

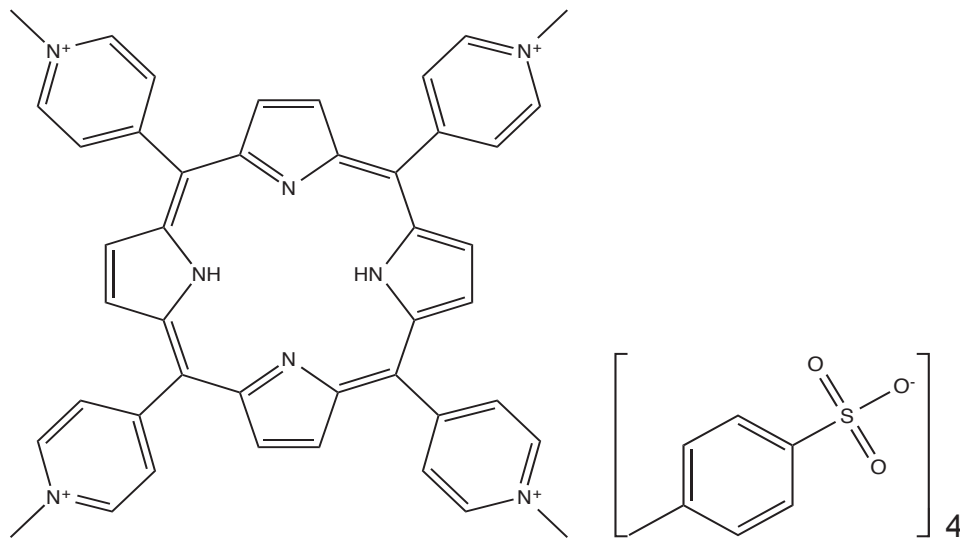


Abb. 21: Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat

Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat (TMPyP) ist ein geladenes, hydrophiles Porphyrin, das laut Literatur nach seiner Diffusion ins Zellinnere zum Nukleus migriert [77]. Hier lokalisiert bildet es mit der negativ geladenen DNA eine polare Atombindung aus. Der nach Belichtung mit UVA Licht (315–380 nm) erzeugte Singulett-Sauerstoff greift direkt das in der DNA eingebaute Guanosen und die in der nahen Umgebung befindlichen Guaninbausteine an. Aufgrund seiner Affinität zum Zellkern eignet sich dieser Photosensibilisator besonders für die photodynamische Tumorthherapie. Für die hier vorliegende Arbeit war er ein interessanter Kandidat, um 8-Hydroxyguanin (8OG; alias 8-Oxo-7,8-dihydroguanin) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosen (8OdG) zu erzeugen.

2.7 Freisetzung von Singulett-Sauerstoff durch DHPN-Endoperoxid

Im Gegensatz zu den in Kapitel 2.6 beschriebenen Versuchen wird bei der hier beschriebenen Methode ausschließlich Singulett-Sauerstoff im Zytosol erzeugt und es werden keine anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies, wie z. B. Superoxid-Anionen ($O_2^- \cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\cdot OH$) gebildet. Das Endoperoxid des Naphthalin-Derivats DHPN (N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid, siehe Abb. 22) ist in der Kälte ($< 4 \text{ }^\circ\text{C}$) über Monate stabil; Erst durch Erwärmen (Thermolyse) wird 1O_2 und unreaktiver Triplett-Sauerstoff freigesetzt. DHPNO₂ zerfällt unter Freisetzung von insgesamt 59 % 1O_2 . In Wasser bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sind nach 23 min 50 % und nach 99 min 95 % des gesamten Singulett-Sauerstoffs freigesetzt [79]. Die Lebensdauer von 1O_2 in mit H_2O inkubierten Zellen beträgt $3 \text{ } \mu\text{s}$ und wird verlängert durch eine Inkubation der Zellen mit schwerem Wasser (D_2O) auf $15\text{--}30 \text{ } \mu\text{s}$ [74]. Das Endoperoxid ist mit 39 mmol/l bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gut wasserlöslich und aufgrund der nicht-ionischen Struktur kann es Biomembranen gut über freie Diffusion überwinden [80].

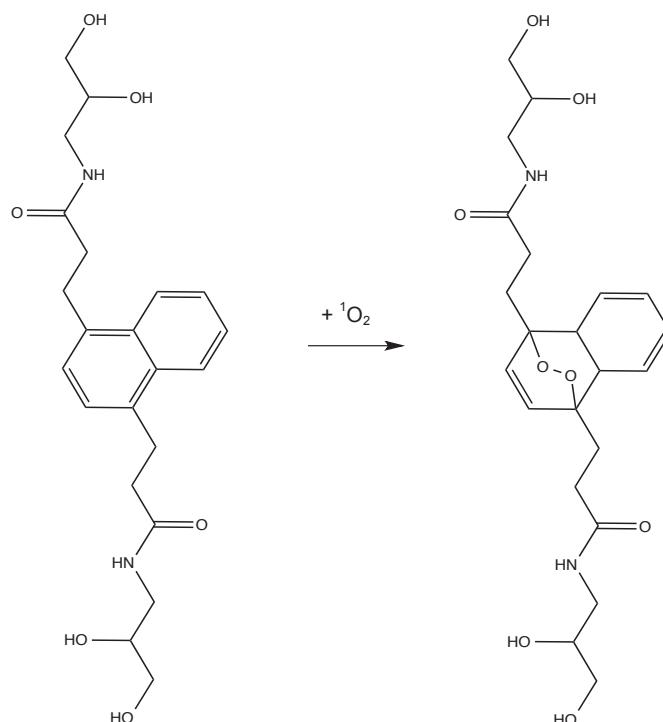


Abb. 22: N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid

Da DHPNO₂ nicht fertig eingekauft werden kann, wurde die Synthese von DHPN und die Beladung zu DHPNO₂ nach [79] von Herrn Prof. Dr. Günther Schmalz aus dem Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln (siehe <http://www.schmalz.uni-koeln.de>) und seinen Mitarbeiter Andreas Termath und Waldemar Schlundt übernommen. Herr Termath hat die Synthese optimiert und in einem ersten Ansatz \approx 10 g DHPN produziert, woraus sich 7–10 Chargen DHPNO₂ á 50 ml mit einer Konzentration von 35–50 mmol/l ergeben haben. Die Beladung mit Sauerstoff erfolgte im Prinzip wie beschrieben [79] durch eine photochemische Bereitstellung über Methylenblau und Licht in Gegenwart von Sauerstoff mit anschließender Abtrennung des Farbstoffs durch Säulenchromatographie. Die qualitative und quantitative Analytik fand per HPLC im Labor für Organische Chemie statt.

Das Auftauen und Aliquotieren der gefrorenen 50 ml DHPNO₂-Lösung in D₂O musste schnell und bei 4 °C im Kühlraum stattfinden. Dazu wurden alle benötigten Materialien vorgekühlt und die Aliquots unmittelbar bei –80 °C eingefroren.

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog zu Kapitel 2.5.4.. DHPNO₂ wurde in eiskaltem Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer in Konzentrationen von 5–30 mmol/l gelöst und jeweils 1,5 ml der Lösung auf die Schälchen gegeben. Die Thermolyse fand bei 37 °C im Inkubator für 2 h statt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 4 ml eiskaltem KRH-Puffer gewaschen, bevor sie mit 1 ml Methanol lysiert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit unbeladenem DHPN inkubiert, um eine Toxizität des Trägers auszuschließen. Außerdem wurden Zellen mit DHPNO₂, nach vorhergehender Thermolyse für 2 h bei 50 °C (DHPN*) inkubiert, um zu prüfen, ob das Endoperoxid frei ist von toxischen Verunreinigungen aus der Phase der Beladung mit ¹O₂ durch Methylenblau und Licht. Schälchen für die Proteinbestimmung wurden separat ausgesät, analog behandelt und in 1 ml 0,1 % (v/v) Triton X-100 lysiert.

2.8 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Das verwendete Massenspektrometer ist ein Triplequadrupol-Tandem-Massenspektrometer Q Trap 4000 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland). Die chemische Auftrennung der Verbindungen erfolgte mittels einer SLC-20AD Prominace HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, Duisburg, Deutschland.

Bei der Kopplung einer HPLC Anlage (high performance liquid chromatography) mit einem Massenspektrometer werden Substanzgemische hochauflösend aufgetrennt, fragmentiert und entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) detektiert. Massenspektren erlauben Rückschlüsse auf Strukturen von Einzelsubstanzen, sowie Bestimmungen von qualitativen und quantitativen Zusammensetzungen von Substanzgemischen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Identifikation der Oxidationsprodukte von Singulett-Sauerstoff und seinen Reaktionspartnern, sowie zur quantitativen Bestimmung dieser gefundenen Produkte herangezogen. Außerdem wurde per LC-MS/MS das synthetisierte DHPN-Endoperoxid qualitativ geprüft.

Da nur geladene Moleküle, die sich in der Gasphase befinden, gemessen werden können [99], müssen die Verbindungen initial in der Ionisierungsquelle ionisiert werden. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) bei einem Ionisierungspotential (Sprayvoltage) von 4500 V. Das Überführen der Substanzen in die Gasphase (Coulomb-Explosion), wie in Abb. 23 gezeigt, wird unterstützt durch N_2 und zwei regelbare Turboheizer (bis 550 °C).

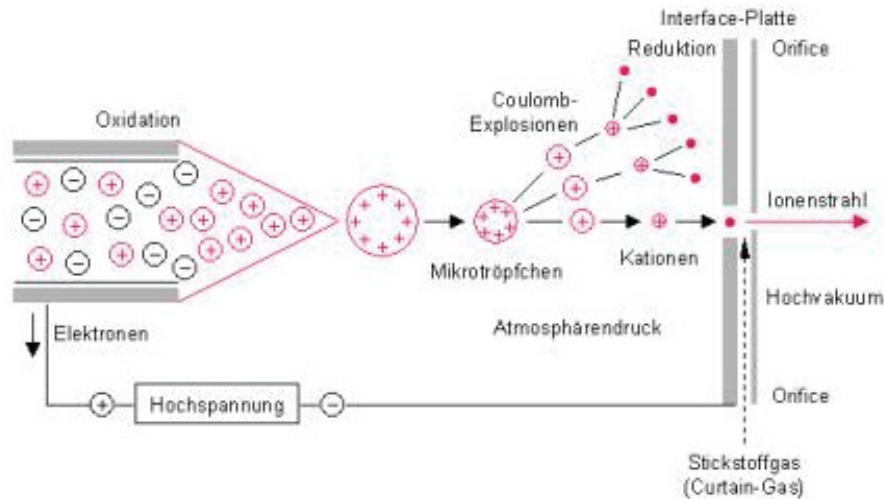


Abb. 23: Elektroprayionisierung. Im elektrischen Feld wird der Eluent unter Atmosphärendruck in kleine geladene Tröpfchen dispergiert. Diese werden kontinuierlich evaporiert, wodurch dessen Ladungsdichte zunimmt und es zu einem weiteren spontanen Zerplatzen der Tröpfchen in sogenannte Mikrotropfen kommt (Coulomb Explosion). Die vollständig desolvatisierten Ionen gelangen durch eine Öffnung in der Interface-Platte in das Massenspektrometer. Quelle: <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/>

Die geladenen Moleküle werden dann durch ein elektrisches Potential EP (engl., electrical potential) im Hochvakuum des Quadrupols beschleunigt. Die gasförmigen Ionen gelangen durch die sogenannte Q0-Region in den ersten Quadrupol, welcher als Massensfilter fungiert. Auf dem Weg durch die Quadrupole 1 und 3 bewegen sich die ionisierten Moleküle auf einer sinusförmigen Flugbahn, die von der eingestellten Frequenz und Spannung abhängt, wobei sich nur die Moleküle mit passendem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) auf der Mittelachse der Quadrupolstäbe halten. Moleküle mit einem nicht zur eingestellten Frequenz passendem m/z treffen auf die Quadrupolstäbe und verlieren an ihnen ihre Ladungen. In der zwischen den Quadrupolen 1 und 3 gelegenen Kollisionszelle (Q2) werden die Analyten durch die Kollision mit Stickstoffatomen und durch das Zuführen kinetischer Energie mittels Potentialdifferenz fragmentiert. Das so entstandene Fragmentmuster ist für jedes Molekül charakteristisch und kann unter zur Hilfenahme von z. B. Datenbanken zur Identifikation einer Ausgangssubstanz herangezogen werden.

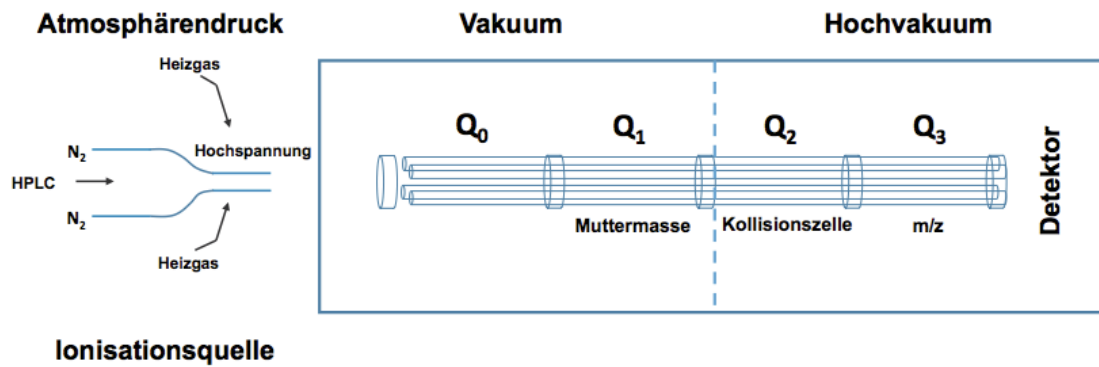


Abb. 24: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massen-Analysators

2.8.1 Full-Scan-Experimente (Q1-Scan)

Um geeignete Marker für intrazelluläre Schäden, die durch Singulett-Sauerstoff entstanden sind aufzuspüren, wurden Massenspektren im Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 50–400 mit DHPNO₂-inkubierten Aminosäuren, die potentielle Angriffspunkte für ¹O₂ darstellen und mit DHPNO₂-inkubiertem Guanin und Guanosin aufgenommen. Zudem wurden Scans von Lysaten von Zellen, die mit ¹O₂ gestresst wurden und ungestressten Zellen aufgenommen und verglichen. Für die Generierung der Massenspektren im Q TRAP 4000 wird für den Full Scan Modus nur Q1 benötigt. Die Kollisionenzelle und Q3 dienen in diesem Fall lediglich zum Weitertransport der Ionen. Es wurde sowohl im Negativ- als auch im Positivmodus gemessen; die Scanzeit betrug 2 Sekunden. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Full-Scan-Methoden sind in Tab. 1 aufgeführt.

	Positiv			Negativ	
	HILIC	zic-HILIC	DC18	ZIC-pHILIC	xBridge
Vorsäule	ja	nein	ja	nein	ja
Laufmittel A	0,1 % Ameisensäure	10 mmol/l Ammoniumformiat (pH 3,75)	0,1 % Ameisensäure	10 mM Ammoniumacetat (pH 8,9)	10 mM Ammoniumacetat (pH 8,9)
Laufmittel B	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril	Methanol	0,1 % Ameisensäure in Methanol	Acetonitril	Methanol
Gradient	ja	ja	ja	ja	nein
Laufzeit [min]	15	15	10	15	15
Flussrate [ml/min]	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
Temperatur [°C] Säulenofen (CTO-20AC Prominence)	40	40	35	40	40
Injektionsvol. [µl] Autosampler (SIL-20AC Prominence)	20	10	20	10	10

Tab. 1: Verwendete Full-Scan-Methoden

Die Herstellung der Zelllysate der nicht-transfizierten HEK-293-Zellen erfolgte wie in 2.5.4 beschrieben. Die Lysate wurden für 2 min bei Raumtemperatur mit 13000 rpm zentrifugiert und 100 µl der Überstände in Mikroeinsätze (G30, Chromatographie Service, Düren, Deutschland) pipettiert. Während des Laufs wurden die Proben konstant in der Probenkassette des Autosamplers der HPLC Anlage bei 6 °C gekühlt. Um eine möglichst große Bandbreite an chromatographischen Bedingungen abzudecken, wurden unterschiedlich modifizierte Säulen mit Eluenten unterschiedlicher Hydrophobizität in unterschiedlichen Elutionskompositionen verwendet. Alle relevanten Informationen zu den verwendeten Elutionsmitteln befinden sich in Tab. 2.; Informationen zu verwendeten HPLC-Säulen sind in Tab. 3 aufgeführt.

Elutionsmittel	Reinheitsgrad	Hersteller
Acetonitril	HPLC Gradient Grade	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	HPLC Gradient Grade	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
0,1 % Ameisensäure	puriss. p.a.	Fluka (Steinheim, Deutschland)
10 mmol/l Ammoniumacetat	puriss. p.a.	Fluka (Steinheim, Deutschland)
10 mmol/ Ammoniumformiat	puriss. p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 2: Elutionsmittel für HPLC

Säule	Hersteller	Vorsäule	Eigenschaften
HILIC	Atlantis™, Waters, Milford, USA	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 mm, Länge 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 mm, Länge 50 mm
zic-HILIC	SeQuant™, Merck, Darmstadt, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 mm, Länge 100 mm
DC18	Atlantis™, Waters, Milford, USA	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 mm, Länge 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 mm, Länge 100 mm
ZIC-pHILIC	SeQuant™, Merck, Darmstadt, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 mm, Länge 100 mm
xBridge	Atlantis™, Waters, Milford, USA	Partikelgröße 3,5 µm, Ø 3 mm, Länge 20 mm	Partikelgröße 3,5 µm, Ø 3 mm, Länge 100 mm
T3	Atlantis™, Waters, Milford, USA	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 mm, Länge 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 mm, Länge 100 mm

Tab. 3: HPLC-Säulen

Für die Auswertung der Full-Scans wurden die Datensätze der beiden zu vergleichenden Massenspektren, um Unterschiede zu identifizieren, durch einen von Herrn Prof. Dr. Gründemann selbstentwickelten Algorithmus verglichen [20]. Mit Hilfe einer eigens für die Auswertung entwickelten Software "DS Data Convert" wurden die Daten in den Dimensionen Intensität, Retentionszeit und Masse-zu-Ladung (m/z) konvertiert und wie folgt dargestellt: x-Achse = m/z ; y-Achse = Retentionszeit und die Intensität sigmoidal in Form von 256 Graustufen (8 Bit) auf der z-Achse. Dadurch erschienen Signale schwacher Intensität schwarz (RGB 0, 0, 0) und Signale hoher Intensität weiß (RGB 255, 255, 255).

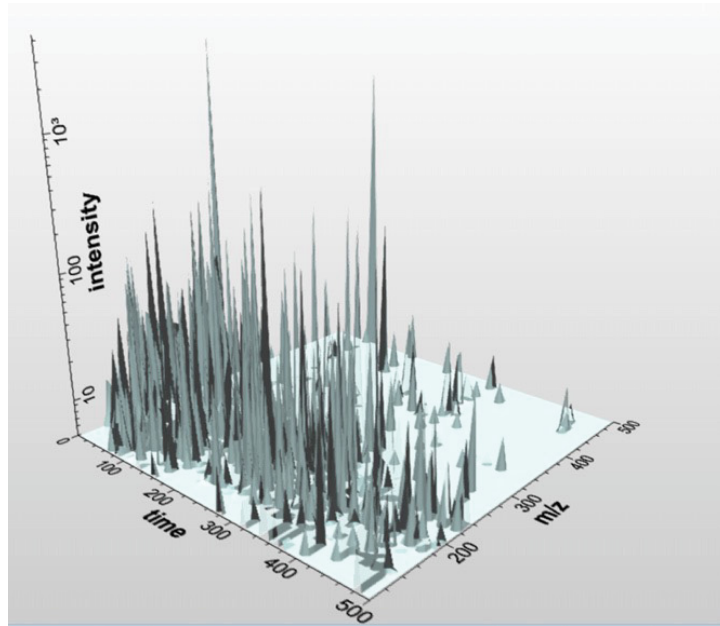


Abb. 25: LC-MS/MS-Differenz-Abtönung. Auf der x-Achse darstellt ist die Retentionszeit in Sekunden, auf der y-Achse das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und auf der z-Achse die relative Signalstärke in 256 Graustufen (8 Bit) [100]

In einem zweiten Schritt wurden die Datensätze von mit Singulett-Sauerstoff gestressten und ungestressten Zellen mit dem ebenfalls von Herrn Prof. Gründemann programmierten Programm "DS Full View" so übereinandergelegt, dass die Differenz der Intensitäten abgebildet wurde. Signale des roten Farbkanals repräsentierten hierbei Verbindungen, die ausschließlich oder in höheren Konzentrationen in den gestressten Zellen vorkamen (Effektzellen). Signale des cyanfarbenen Kanals repräsentierten Verbindungen, die ausschließlich oder in höheren Konzentrationen in den ungestressten Zellen vorkamen (Kontrollzellen). Verbindungen, die keinen Konzentrationsunterschied zwischen Effekt- und Kontrollzellen aufwiesen, waren durch Grautöne gekennzeichnet. Schwarz bedeutet, dass kein Signal generiert wurde.

2.8.2 Produktionen-Scan (MS2)

Die in den Full Scans aufgespürten Unterschiede der Massenspuren zwischen Kontroll- und Effektzellen wurden, wie im Folgenden beschrieben, weiter untersucht. Die Muttermasse $[M-H^+]$ oder $[M+H^+]$ wurde isoliert und

fragmentiert, um das resultierende Fragmentmuster mit den bekannten, in Datenbanken (<http://www.massbank.jp>, <http://metlin.scripps.edu>) hinterlegten, Fragmentmustern abzugleichen und gegebenenfalls darüber einen Hinweis auf die Struktur der unbekanntes Verbindung zu erhalten. Die chromatographischen Bedingungen stimmten mit denen der Full Scan Methode überein, in der das Signal entdeckt wurde. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Für die Kollision in Q2 wurden Kollisionsenergien (engl. collision energy CE) von 5 V, 15 V, und 25 V gewählt. Sofern ein Fragmentmuster mit dem eines Referenzspektrums übereinstimmte, wurde dieses durch sogenanntes "spiken" des Zelllysats mit 1 µg/ml der Referenzsubstanz geprüft. Hierfür wurde das Zelllysate zunächst ohne Referenzsubstanz gemessen und der resultierende Peak mittels der Software Analyst 1.4.2 integriert. Handelte es sich bei der Referenzsubstanz tatsächlich um die zu identifizierende Verbindung, war die Fläche unter der Kurve (analyte peak area [counts]) bei der zugespikten Verbindung größer und damit ein Konzentrationsanstieg nachweisbar. In diesem Fall konnte man davon ausgehen, dass es sich bei der unbekanntes Verbindung um die Referenzsubstanz handelte.

2.8.3 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

In diesem Modus wurden die Analyten quantifiziert. Um robuste Fragmentmuster bei entsprechenden Kollisionsenergien zu ermitteln wurden zuvor 100–500 ng/ml des reinen in Methanol gelösten Analyten direkt in das Massenspektrometer mit einer Flussrate von 10 µl/min infundiert ("Tunen"). Die Flächeninhalte der Peaks aller Proben wurden erfasst und mit Eichgeraden in Konzentrationen von z. B. 0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml und 800 ng/ml wurde die Messmethode auf Linearität geprüft und gegebenenfalls optimiert (Compound Optimization). Es wurde in entsprechender Matrix (z. B. NT-Zelllysate) gemessen, um Ionisierungsunterschiede zu minimieren.

Zunächst wurde die Peakfläche des Analyten durch die Steigung (m) der parallel vermessenen Eichgerade der Referenzsubstanz dividiert (siehe Gleichung 2). Durch Division der so erhaltenen Analytkonzentration in [ng/ml] im Lysate mit dem

jeweiligen Molekulargewicht [g/mol] des Analyten konnte die Stoffmenge ermittelt werden (siehe Gleichung 3). Die Zellzahl der einzelnen Schälchen wurde über die Proteinbestimmung (siehe 2.5.6) oder über die massenspektrometrisch bestimmten Prolinkonzentrationen, normiert. In Gleichung 4 dargestellt ist die Berechnung der Normierung der Analytkonzentration mithilfe der Bestimmung der Zellzahl über den BCA-Assay. Die Berechnung der Proteinkonzentration in [mg/ml] basiert auf Ergebnissen früherer Studiendaten, die belegen, dass 1 mg Protein einem intrazellulären Volumen von 6,7 µl entspricht [20].

$$\text{Analytkonzentration im Lysat [ng/ml]} = \frac{\text{Peakfläche Analyt [counts]}}{m} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\text{Analytkonzentration im Lysat [pmol/ml]} = \frac{\text{Analytkonzentration im Lysat [ng/ml]}}{\text{Molekulargewicht Analyt [g/mol]} \cdot 1000} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$\text{Analytkonzentration im Lysat [pmol/mg} \cdot \text{Protein}^{-1}] = \frac{\text{Analytkonzentration im Lysat [pmol/ml]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/ml]}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Zur Normierung der Analytkonzentration über die massenspektrometrisch bestimmte Prolinkonzentration wurde zunächst ein Faktor aus den Prolinwerten der Kontrollzellen und der Anzahl dessen Messungen ermittelt (siehe Gleichung 5). Weiter wurde die Peakfläche des Prolinwertes des Analyten mit dem in Gleichung 6 ermittelten Faktor in ein Verhältnis gesetzt. Die Analytkonzentration in [pmol/ml] wurde durch diesen Wert dividiert, wodurch sich die Stoffmengenkonzentration des Analyten in [pmol/ml] relativ zur Prolinkonzentration im Lysat ergeben hat (siehe Gleichung 7).

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Peakfläche Prolin Kontrollzellen [counts]}}{n} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$\text{Verhältnis Prolinwert Analyt/Faktor} = \frac{\text{Peakfläche Prolinwert Analyt [counts]}}{\text{Faktor}}$$

(Gleichung 6)

$$\text{Analytkonzentration im Lysat [pmol/ml]} = \frac{\text{Analytkonzentration im Lysat [pmol/ml]}}{\text{Verhältnis Prolinwert Analyt/Faktor}}$$

(Gleichung 7)

Die Konzentration der Aminosäure Prolin in den Zelllysaten korreliert mit den Ergebnissen der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test (Daten nicht gezeigt) und stellt somit einen validen Korrekturfaktor dar, um die Analytkonzentration pro Volumeneinheit zu errechnen. Der Vorteil gegenüber der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test ist, dass sich der Korrekturfaktor hierbei direkt auf dasselbe Schälchen und nicht auf ein repräsentatives, gleichbehandeltes Schälchen bezieht, was dann in einem anderen Detergenz (0,1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7,4) lysiert wird. Außerdem müssen für dieses Verfahren keine separaten Schälchen ausgesät werden, was eine erhebliche Ersparnis an Ausgangsmaterial (auch DHPNO₂) bedeutet. Nachteilig ist, dass man die Analytkonzentration nur pro Volumeneinheit und nicht pro Masseneinheit pro Protein erhält.

Analyt	Polarität	Q1 Mass [amu]	Q3 Mass [amu]	DP [Volt]	CE [Volt]	CXP [Volt]	Säule	Laufzeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluenten
5-Aminolävulinsäure	(+)	132,157	116,1	36	11	8	HILIC	6		A: 0,1 % Ameisensäure; B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
2-Desoxyguanosin	(+)	268,1	152	41	14	8	HILIC			A: 0,1 % Ameisensäure; B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
Ergothionein	(+)	230,294	127	41	30	10	T3 (Δ) HILIC (□)	6	0,4	A: 0,1 % Ameisensäure; B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
Glutathion	(+)	308,244	179,1	46	19	16	T3	6 (Δ) 11 (□)	0,4	Δ: 10 mmol/l Ammoniumformiat, pH 3,75; B: ACN □: A: 0,1% Ameisensäure; B: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure
		308,244	76	46	41	12				
		308,244	84	46	51	6				
		308,244	59	46	81	10				
Glutathiondisulfid	(+)	613,28	231,2	71	33	14	zic-HILIC	4	0,4	A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 2,3; B: 10 mM Ammoniumacetat, pH 2,3 in Acetonitril
Guanin	(+)	152,045	135	71	27	10	zic-HILIC	6	0,4	
Guanosin	(+)	284,2	152	41	14	8	HILIC	6	0,4	A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 4,3; B: 0,1 % Ameisensäure
Imidazol	(+)	69	42	60	26	5	HILIC	6	0,2	A: 0,1% Ameisensäure; B: 0,1% Ameisensäure in Methanol
Kynurenin	(+)	209,304	94	46	21	16	HILIC	6	0,4	A: 0,1% Ameisensäure; B: 0,1% Ameisensäure in Methanol
		209,304	146	46	27	8				

Analyt	Polarität	Q1 Mass [amu]	Q3 Mass [amu]	DP [Volt]	CE [Volt]	CXP [Volt]	Säule	Laufzeit [min]	Flussrate [ml/min]	Eluenten
Methioninsulfoxid	(+)	165,968	149	31	15	26	T3 (Δ) HILIC (□)	6	0,2 (Δ) 0,4 (□)	Δ: A: 10 mmol/l Ammoniumformiat, pH 3,75; B: ACN □: A: 0,1% Ameisensäure; B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
		165,968	75,1	31	15	12				
		165,968	74	31	19	12				
		165,968	55,9	31	39	8				
8-Oxo-7,8-dihydro-2'- desoxyguanosin	(-)	281,937	191,800	-85	-28	-9	xBridge	6	0,2	A: H ₂ O; B: ACN
8-Oxo-7,8- dihydroguanin	(-)	165,834	148,8	-60	-20	-7	xBridge	6	0,2	A: H ₂ O; B: ACN
		165,834	123,9	-60	-22	-5				
		165,834	122,9	-60	-20	-7				
		165,834	96,9	-60	-24	-5				
8-Oxo-7,8- dihydroguanosin	(-)	297,786	147,6	-85	-38	-7	xBridge	6	0,2	A: H ₂ O; B: ACN
		297,786	65,9	-85	-58	-11				
		297,786	148	-85	-36	-9				
		297,786	42,1	-85	-80	-1				
Prolin	(+)	115,906	70	36	23	12	universal			

Tab. 4: Detektionsbedingungen der Analyten: Detektionszeit 150 msec. Δ – in vitro; □ – intrazellulär

2.9 Suche nach Indikator-molekülen zur Quantifizierung des Singulett-Sauerstoff-Schadens

2.9.1 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF)

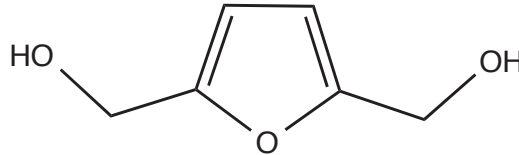


Abb. 26: 2,5-Bis(hydroxymethyl)-furan

Primär ionisierbare Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, wie z. B. Pyrrole [101] eignen sich als unphysiologische Reaktionspartner von $^1\text{O}_2$. Bei 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF) handelt es sich um einen solchen extern zuführbaren Reaktionspartner [102]. Die Zellen werden für 1 h mit BHMF inkubiert, bevor sie wie in den Kapiteln 2.6 oder 2.7 weiterbehandelt werden. Das Reaktionsprodukt von $^1\text{O}_2$ und BHMF wird massenspektrometrisch analysiert. In weiteren Schritten kann anhand dieses Indikators der schützende Effekt von Ergothionein im Vergleich zu weiteren bekannten Singulett-Sauerstoff-Quenchern untersucht werden.

2.9.2 *In-vitro*-Inkubation von Aminosäuren, Guanin, Guanosin und Ascorbat mit DHPNO₂

Es wurden Guanin, Guanosin, sowie die Aminosäuren Histidin, Methionin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan und Ascorbat in Konzentrationen von 1000 ng/ml mit jeweils 5 mM, 10 mM und 30 mM DHPNO₂ für 1 h bei 37 °C inkubiert (Kontrolle DHPN; DHPN*; kein Singulett-Sauerstoff-Generator). Alle Substanzen wurden in Wasser gelöst, bis auf Guanosin in konzentrierter Essigsäure, Tyrosin in 2 M Natronlauge und Guanin in 1 M Salzsäure. Es wurden mit der in 2.8.1 beschriebenen Methode eine Reihe von Signalen gefunden, die fragmentiert, aber anhand des Fragmentmusters mit den gegebenen Methoden nicht zu identifizieren waren. Zur Überprüfung, ob ET überhaupt einen

Einfluss auf das entsprechende unbekannte Signal hat, das einen möglichen Indikator für einen Singulett-Sauerstoff-Schaden darstellen könnte, wurde den Lysaten vor der Inkubation mit $^1\text{O}_2$ in einem weiteren Versuch 100 μM Ergothionein zugesetzt.

2.9.3 Strukturaufklärung unbekannter Full-Scan-Signale mittels Orbitrap Massenanalysator

Die Lösungen von 100 μM Guanin und Guanosin, die mit 10 mM DHPNO₂ inkubiert wurden, sind zur weiteren Untersuchung an die Arbeitsgruppe Schäfer am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln übergeben worden, die über einen Orbitrap Massenanalysator verfügt. Mit dieser Methode ist es möglich die exakte Masse eines Moleküls auf vier Nachkommastellen genau zu messen, was die Strukturaufklärung erheblich vereinfacht. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine Lösung von 100 μM ET, die mit 10 mM DHPNO₂ inkubiert wurde (Kontrolle: DHPN*), um die Reaktionsprodukte von ET mit $^1\text{O}_2$ auf diese Weise aufzuklären, zur Analyse an die Arbeitsgruppe Schäfer geliefert. Außerdem wurde mit dem Orbitrap Massenanalysator das Lysat von NT-Zellen analysiert, welche für 2 h bei 37 °C mit 30 mM DHPNO₂ gestresst wurden (Kontrolle s. o.).

2.10 *In-vitro*-Versuche von L-Methionin mit DHPN-Endoperoxid

Eines der mittels LC-MS-Differenz-Abtönung (siehe 2.8.1) aufgespürten, reproduzierbaren Signale konnten wir als Methioninsulfoxid (MSO) identifizieren. Um für die Reaktion von $^1\text{O}_2$ und Methionin die Potenz bekannter oder potentieller Quencher *in vitro* zu bestimmen, wurden 0,1 mmol/l L-Methionin mit 10 mmol/l DHPNO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion fand in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 200 rpm im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) statt. Die Reaktionsansätze hatten ein jeweiliges Gesamtvolumen von 50 μl und das System war abgepuffert durch 10 mmol/l HEPES/NaOH, pH 7,4. Der Puffer HEPES/NaOH, pH 7,4 hat sich

nach umfangreichen Tests, u. a. den Einfluss auf die Ionisierung am Massenspektrometer betreffend, gegenüber TRIS und einem reinen Phosphatpuffer durchgesetzt (siehe 3.8.1). Nach diversen Vorversuchen hat sich eine Konzentrationsreihe der Quencher von 0,001 mmol/l, 0,01 mmol/l, 0,1 mmol/l, 1 mmol/l und 10 mmol/l der Quencher als optimal herausgestellt. Nach 1 min, 5 min, 10 min und 120 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumazid, bei einer Endkonzentration von 200 mmol/l im Reaktionsansatz, gestoppt und das Reaktionsprodukt MSO anschließend per LC-MS/MS quantifiziert (siehe 2.8.3). Um die gemessenen Ergebnisse relativ in ein Verhältnis setzen zu können, wurde in einem Ansatz die MSO Generation ohne Einfluss potentieller Quencher gemessen und als 100 %-Wert festgelegt. Die durchgeführten Kontrollexperimente sind in Tab. 5 aufgeführt.

L-Methionin + HEPES/NaOH, pH 7,4	+ DHPNO ₂
	+ DHPN* (2 h, 50 °C)
	+ DHPNO ₂ + D ₂ O anstatt H ₂ O
	kein ¹ O ₂ -Generator

Tab. 5: Übersicht der Kontrollansätze der *in-vitro*-Versuche. In einem Kontrollansatz wurden 10 mmol/l DHPNO₂, welches zuvor 2 h bei 50 °C inaktiviert wurde, verwendet. Ein weiterer Kontrollansatz enthielt anstelle von H₂O ein äquivalentes Volumen an D₂O und in einem Kontrollansatz waren ausschließlich L-Methionin, HEPES/NaOH, pH 7,4 und H₂O enthalten.

3 ERGEBNISSE

Alle dargestellten Ergebnisse stellen, wenn es nicht anders gekennzeichnet ist, repräsentative Einzelexperimente dar. Alle Werte sind gemittelte Werte von $n = 2-5$ Einzelmessungen mit Standardfehler vom Mittelwert (Mittel \pm SEM). * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$ (ungepaarter t-Test, zweiseitig).

3.1 Aufnahme- und Effluxversuch mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG)

Im ETT-Knockout-Zebrafisch konnte ein Anstieg von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) gemessen werden, dessen Ursache zunächst völlig unklar war. Um zu überprüfen, ob der Anstieg durch eine gesteigerte 8OG-Aufnahme bedingt ist oder durch einen verminderten Efflux katalysiert wird, wurden Aufnahme- und Effluxversuche mit 8OG durchgeführt.

3.1.1 Aufnahmeversuche mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG)

Die Aufnahmeversuche wurden mit 100 μ M 8OG für 1 min durchgeführt. Dazu wurden Ergothionein-Transporter-exprimierende Zellen, wie in Kapitel 2.5.4.2 beschrieben, vorbereitet. Der 8OG-Gehalt ist angegeben in pmol/mg Protein. Durch die Proteinnormierung wurden Schwankungen der Zellzahl zwischen den einzelnen Versuchseinheiten mittels des BCA-Assays nivelliert (siehe 2.5.6).

Verglichen wurden Zellen, bei denen der Transporter 24 h zuvor durch Doxycyclin eingeschaltet wurde (*ETTh+*) mit Kontroll-Zellen (*ETTh-*). In Abb. 27 ist das Resultat nach vorausgehender einstündiger Äquilibration in 37 °C warmem KRH-Puffer nach einminütiger Aufnahme mit 100 μ M 8OG dargestellt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Ergothionein-Transporter-exprimierenden und nicht-Ergothionein-Transporter-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Das bedeutet, dass 8OG kein Substrat für den Ergothionein-Transporter darstellt. Auch wird nicht durch Abwesenheit von ET dekomparatorisch 8OG über Diffusion von extrazellulär vermehrt in die Zelle eingeschleust, was die erhöhten 8OG-Level in den Geweben des Knockout-Zebrafisches erklären könnte.

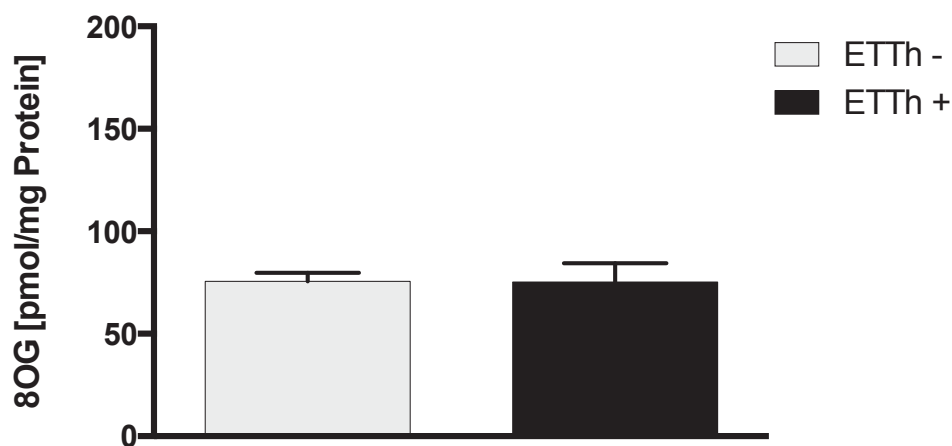


Abb. 27: Intrazelluläre Quantifizierung der 8OG-Konzentration. Lyse nach vorausgehender Äquibrierung in KRH-Puffer (1 h) und Aufnahme mit 100 μ M 8OG (1 min); ETTh-transfizierte Zellen wurden bereitgestellt wie in 2.5.4 beschrieben. Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurde 8OG per LC-MS/MS gemessen und anhand der mittels des BCA-Assays bestimmten Proteinwerte normiert (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

3.1.2 Effluxversuch mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG)

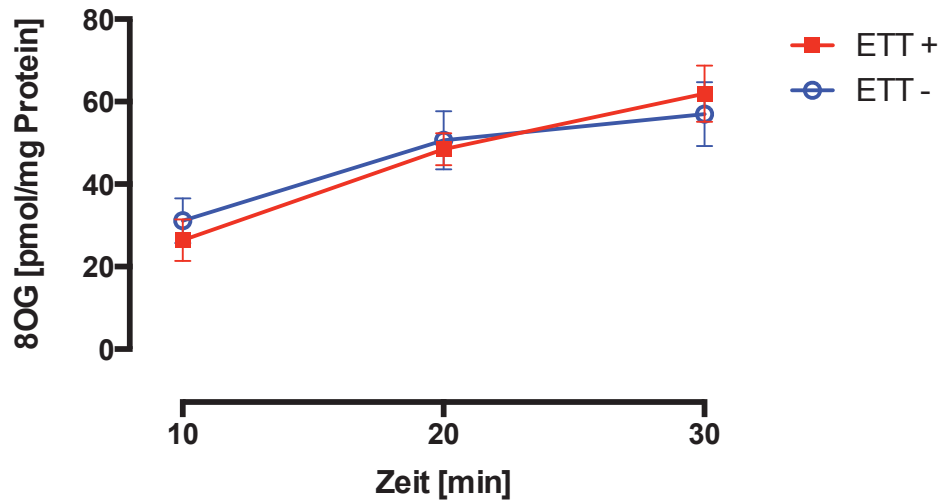


Abb. 28: Quantifizierung der 8OG-Konzentration im Zellüberstand nach 10 min, 20 min und 30 min. Details siehe Abb. 27 (Mittel \pm SEM; n = 3).

Um auszuschließen, dass der erhöhte Gehalt von 8OG in den Lysaten der Knockout-Zebrafische durch einen verminderten Efflux von 8OG bedingt ist, wurden Effluxversuche durchgeführt. Dafür wurden Zellen für 1 h mit 100 μ M 8OG vorinkubiert und dann nach Entfernen der Inkubationslösung nach 10 min, 20 min und 30 min jeweils 200 μ l des Zellüberstandes abgenommen. Die Resultate eines repräsentativen Einzelerperimentes sind in Abb. 28 dargestellt. Angegeben ist der extrazelluläre 8OG-Gehalt in pmol/mg normiert auf den Proteingehalt. Verglichen wurden Zellen, die den humanen Ergothionein-Transporter (*ETTh*) gezielt über eine 24-stündige Inkubation mit Doxycyclin in der Zellmembran exprimierten (*ETTh+*) mit transfizierten, aber nicht Doxycyclin-induzierten Zellen (*ETTh-*). Es ist kein signifikanter Unterschied der 8OG-Effluxaktivität zwischen *ETTh*-exprimierenden (*ETTh+*) und nicht-*ETTh*-exprimierenden Zellen (*ETTh-*) zu beobachten. Dieses Resultat führt zu der Erkenntnis, dass der ETT kein Efflux-Transporter für 8OG ist. Der Hauptbefund aus dem Zebrafisch-Modell (der erhöhte 8OG-Gehalt insbesondere in der Haut der Knockout-Fische) kann nicht durch einen verminderten bzw. aufgehobenen 8OG-Efflux durch Abwesenheit des ETT erklärt werden.

3.2 Intrazelluläre Quantifizierung von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) nach $^1\text{O}_2$ -Erzeugung durch Photosensibilisatoren

Das primäre Ziel der im Abschnitt 3.2 vorgestellten Experimente war es, ein geeignetes System zur intrazellulären Erzeugung von Singulett-Sauerstoff zu etablieren. Da der Hauptbefund aus der Arbeit mit dem Knockout-Zebrafisch-Modell – der signifikante Anstieg der 8-Oxoguaninkonzentration (8OG) in der Zebrafischhaut (siehe Abb. 10) – erwartungsgemäß als oxidativer Stressmarker auch im Zellmodell wiedergefunden werden sollte, wurde er zunächst zur Quantifizierung des Singulett-Sauerstoff-Schadens herangezogen. Es war zu beachten, die generierte Menge an 8OG nicht durch latent vorhandenes ET zu reduzieren und dadurch möglicherweise vorhandene Effekte zu verschleiern. Bekannt ist, dass die Ergothionein-Transporter-exprimierenden Zellen, vermutlich durch Aufnahme aus dem Nährmedium, einen geringen ET-Gehalt aufweisen. Daher wurden zur intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Erzeugung nicht-transfizierte HEK-293-Zellen mit den Photosensibilisatoren inkubiert. Zellen ohne Ergothionein-Transporter (*ETT*) nehmen praktisch kein ET auf, da diese sehr hydrophile Verbindung die Zellmembran nicht passiv durchdringen kann [20]. Was Photosensibilisatoren sind, welche zur $^1\text{O}_2$ -Erzeugung ausgewählt wurden, die jeweiligen Beschreibungen der Eigenschaften und die Einzelheiten zu methodischen Durchführungen sind ausführlich in Kapitel 2.6 beschrieben.

3.2.1 Bengal Rosa

In Abb. 29 ist die intrazelluläre Konzentration von 8-Oxoguanin (8OG) und in Abb. 30 die intrazelluläre Konzentration von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) in pmol/ml Lysat nach einstündiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Bengal Rosa und Belichtung im Wellenlängenbereich zwischen 380–750 nm (*Bengal Rosa hv*) gezeigt. Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder nur mit Bengal Rosa inkubiert, aber nicht bestrahlt (*Bengal Rosa*), oder nicht mit Bengal Rosa inkubiert, aber mit Licht im oben genannten Wellenlängenbereich bestrahlt wurden (*hv*). Die dritte Kontrollgruppe wurde

analog behandelt, aber weder mit Bengal Rosa inkubiert, noch bestrahlt (*unbehandelt*). Es konnte beobachtet werden, dass die Effektzellen (*Bengal Rosa hv*), sowie deren Lysate stark rosa gefärbt waren. Die Konzentration von 8OG stieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant um den Faktor 1,9 (*unbehandelt*: 1526 ± 83 pmol/mg, $n = 4$; *Bengal Rosa hv*: 2856 ± 373 pmol/mg, $n = 4$; $p = 0,0132$, ungepaarter t-Test). Es ist an dieser Stelle zu bemerken, dass der gemessene 8OG-Gehalt dieser Kontrollgruppe um den Faktor 3,8 höher ist als bei der Kontrollgruppe, die mit Bengal Rosa behandelt, aber nicht bestrahlt wurde (*Bengal Rosa*: 400 ± 20 pmol/mg, $n = 4$). Das Ergebnis der erhöhten 8OG-Konzentration in den mit Bengal Rosa inkubierten und belichteten Zellen korreliert mit den Resultaten aus dem Zebrafisch-Modell, in dem ein 3,8-facher Anstieg von 8OG in den Knockout-Fischen gemessen werden konnte. Warum das 8OG-Level der unbehandelten Zellen oberhalb dessen der mit Bengal Rosa inkubierten, aber unbestrahlten Zellen liegt ist unklar. Da die dunkel inkubierten Zellen nicht vollständig vor Lichteinstrahlung geschützt werden konnten war zu erwarten, dass die 8OG-Konzentration in dieser Kontrollgruppe (*Bengal Rosa*) höher vorliegt.

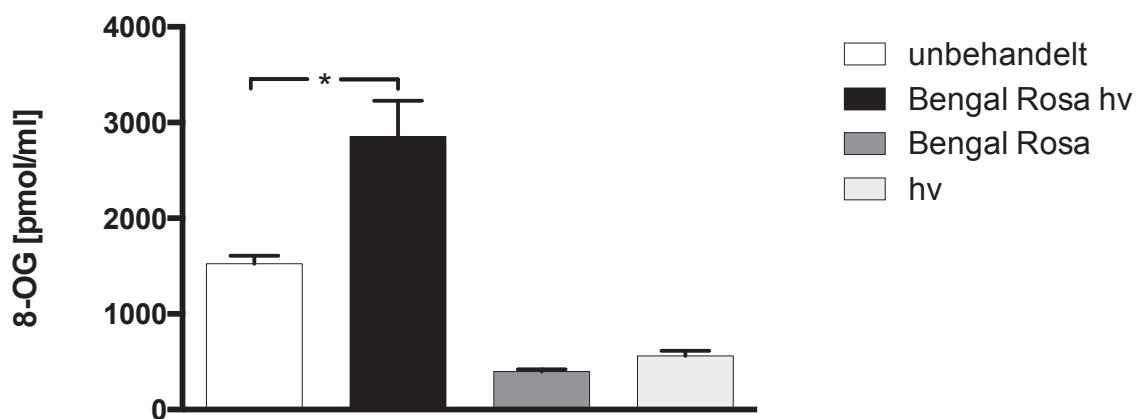


Abb. 29: Intrazelluläre 8OG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa. Nicht-transfizierte Zellen wurden bereitgestellt und für 1 h mit $100 \mu\text{mol/l}$ Bengal Rosa inkubiert wie in 2.4.1 beschrieben. Die Zellen wurden gewaschen und 1 h mit sichtbarem Licht bestrahlt (380–750 nm). Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurde 8OG per LC-MS/MS gemessen und anhand der ebenfalls massenspektrometrisch bestimmten Prolinwerte normiert. (Mittel \pm SEM; $n = 4$).

Durch die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ mit Bengal Rosa stieg die Konzentration von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) signifikant um den Faktor 19,8

(unbehandelt: $0,5 \pm 0,1$ pmol/mg, $n = 4$; Bengal Rosa hv: $9,8 \pm 1,1$ pmol/mg, $n = 4$; $p = 0,0001$, ungepaarter t-Test). Die Konzentration dieses oxidativen Stressmarkers blieb innerhalb der Kontrollgruppen auf einem konstanten Niveau. 8OdG kann durch Reaktion von Desoxyguanosin mit Singulett-Sauerstoff entstehen und als Vorstufe von 8OG dienen. Das hier abgebildete Experiment bestätigt einen durch Bengal Rosa hervorgerufenen intrazellulären oxidativen Schaden.

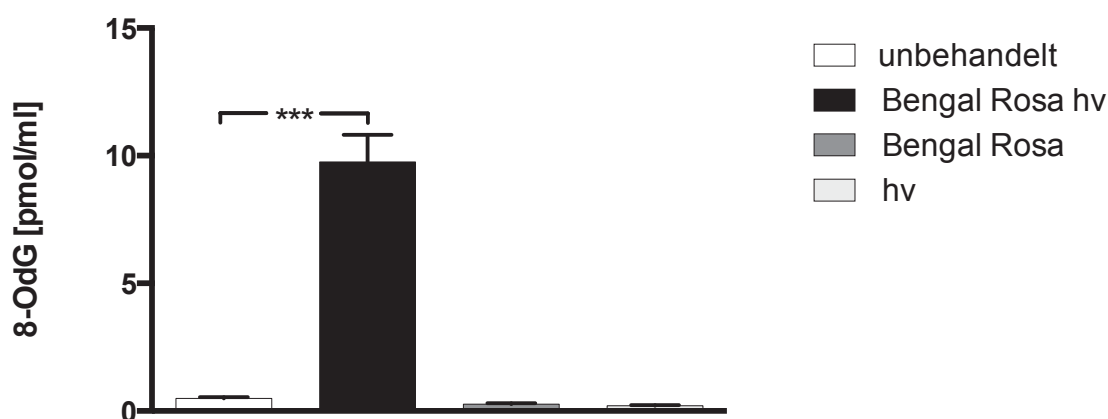


Abb. 30: Intrazelluläre 8OdG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa. Details siehe Abb. 29 (Mittel \pm SEM; $n = 4$).

Grundsätzlich zeigten die mit Bengal Rosa behandelten und bestrahlten Zellen in allen Versuchsansätzen massive unter dem Lichtmikroskop zu beobachtende morphologische Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen und desolaten Prolinwerte (siehe Abb. 31). In dem in diesem Kapitel abgebildeten repräsentativen Einzelexperiment lag der Prolingehalt der Effektzellen 30-fach geringer vor als in den Kontrollzellen (unbehandelt: $3,2 \pm 0,6 \cdot 10^7$ pmol/mg, $n = 4$; Bengal Rosa hv: $1,0 \pm 0,1 \cdot 10^6$ pmol/mg, $n = 4$; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test). Die mit Bengal Rosa inkubierten, aber unbestrahlten Zellen wiesen nur einen geringfügig niedrigeren Prolingehalt auf als die bestrahlten Zellen (hv) und unbehandelten Kontrollzellen (unbehandelt). Die Prolinkonzentration korreliert mit der Anzahl überlebender Zellen (genaue Ausführungen siehe 2.8.3). Basierend auf dieser Tatsache liefern die hier abgebildeten Daten den Hinweis darauf, dass der durch Bengal-Rosa-Inkubation und Belichtung hervorgerufene oxidative Stress einen immensen Zellschaden verursacht. Da die mit dem

Photosensibilisator inkubierte, aber nicht belichtete Kontrollgruppe (*Bengal Rosa*) einen mit den unbehandelten Zellen vergleichbaren Prolingehalt aufwies, ist nicht davon auszugehen, dass die unbelichtete Verbindung cytotoxisch wirkt.

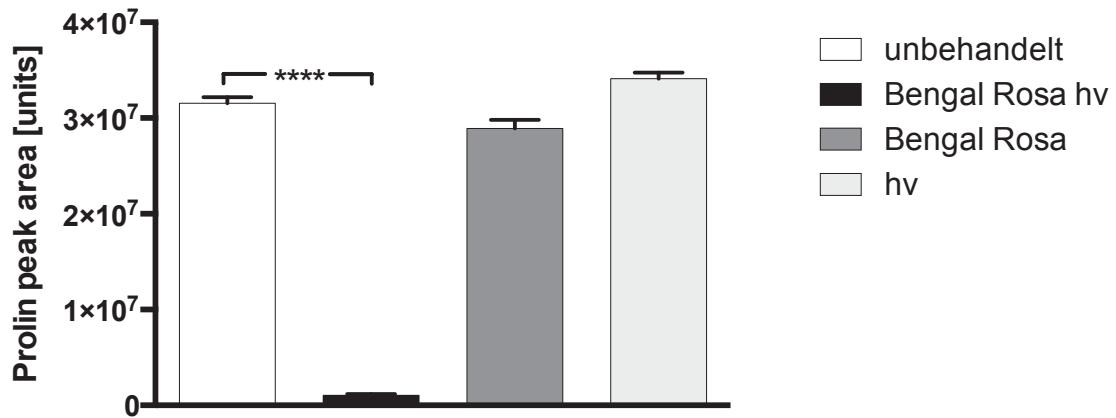


Abb. 31: Intrazelluläre Prolinkonzentration nach Inkubation mit dem Photosensibilisator Bengal (Details siehe Abb. 29). Dargestellt sind die Rohdaten als Integration der Peakflächen (peak area units, Mittel ± SEM; $n = 4$).

3.2.2 Bengal Rosa Diacetat

Wie in den in Kapitel 3.2.1 gezeigten Versuchen zur Singulett-Sauerstoff-Erzeugung mit Bengal Rosa ist es durch die Inkubation mit dem Photosensibilisator und Belichtung zu einem massiven Zellsterben gekommen. Bengal Rosa ist eine relativ große Verbindung, die möglicherweise aufgrund ihrer Hydrophobizität in der Zellmembran verbleibt. Der gebildete Singulett-Sauerstoff und parallel gebildete ROS können hier nicht durch cytosolisch vorliegende Quencher abgefangen werden, wodurch ein nicht-kalkulierbarer oxidativer Schaden entstehen kann und es zum Zelltod kommen kann. Die diacetylierte Variante von Bengal Rosa ist weniger hydrophob und gelangt somit einfacher in das Zellinnere [97]. Intrazellulär wird durch eine Acetylerase die Acetatgruppe abgespalten, wodurch das native konjugierte Doppelbindungssystem, das einfache Bengal Rosa, entsteht. Gemäß einer Studie von Bottiroli et al., die an Rattengliomazellen durchgeführt wurde, ist der Singulett-Sauerstoff-Umsatz dieses Bengal Rosa Precursors im Vergleich zum konventionellen Bengal Rosa um ein Vielfaches gesteigert [97].

Die Zellen wurden in unterschiedlichen Experimenten mit 10 µmol/l oder 100 µmol/l Bengal Rosa Diacetat für 1 h, 4 h und 24 h inkubiert, mit KRH-Puffer gewaschen und anschließend bestrahlt. Bengal Rosa Diacetat und seine Lösung sind farblos, jedoch konnte beobachtet werden, dass die mit dem Photosensibilisator behandelten Zellen wie die mit Bengal Rosa behandelten Zellen ebenfalls eine Rosafärbung zeigten. Die Färbung der Zellen und deren Lysate war im Vergleich zu den mit Bengal Rosa behandelten Zellen weniger intensiv. In Abb. 32(A) ist die 8OG-Produktion in nicht-transfizierten Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100 µmol/l Bengal Rosa Diacetat dargestellt. Die Ergebnisse lassen auf keinen signifikanten Unterschied zwischen Effekt und Kontrolle schließen. Der 8OG-Gehalt lag im Effekt-Zellysate (*Bengal Rosa Diacetat hv*) bei 62 ± 9 pmol/ml gegenüber 51 ± 8 pmol/ml in dem unbehandelten Kontroll-Zellysate (*unbehandelt*). Die Kontrollzellen, die nicht mit dem Photosensibilisator inkubiert, aber ebenfalls für 1 h mit sichtbarem Licht bestrahlt wurden, wiesen einen vergleichbaren 8OG-Gehalt wie die Effektzellen auf (61 ± 10 pmol/ml, $n = 3$). Die Inkubationen über 4 h mit 100 µmol/l Bengal Rosa Diacetat und anschließender Belichtung führten ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg der 8OG-Konzentration (siehe Abb. 32(B)). Das 8OG-Gesamtniveau in den über einen längeren Zeitraum inkubierten Zellen liegt niedriger, was durch reguläre Schwankungen der Zellzahl innerhalb der unterschiedlichen Versuchsdurchführungen erklärt wird.

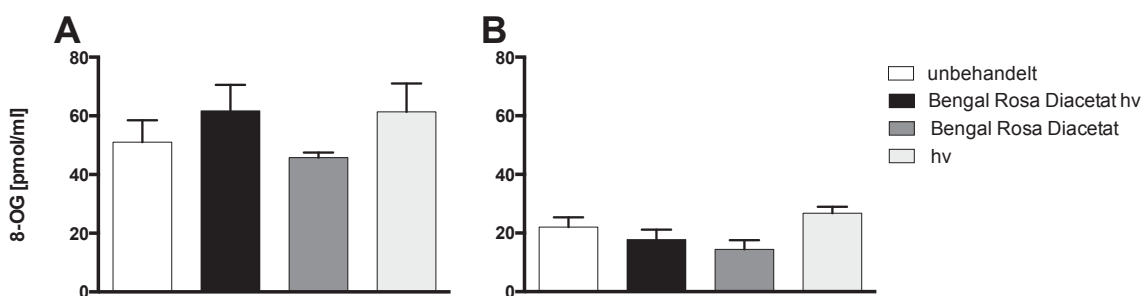


Abb. 32: Intrazelluläre 8OG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat. Nicht-transfizierte Zellen wurden bereitgestellt und für A: 1 h bzw. B: 4 h mit 100 µmol/l Bengal Rosa Diacetat inkubiert wie in 2.4.1 beschrieben. Die Zellen wurden gewaschen und 1 h mit sichtbarem Licht bestrahlt (380–750 nm). Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurde 8OG per LC-MS/MS gemessen und anhand der ebenfalls massenspektrometrisch bestimmten Prolinwerte normiert (Mittel ± SEM; $n = 3$).

In Abb. 33 ist die 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin-Konzentration (8OdG) nach Bengal-Rosa-Diacetat-Behandlung in pmol/ml im Lysat der NT-Zellen gezeigt. Weder durch einstündige noch durch vierstündige Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat und anschließender Belichtung konnte ein Konzentrationsanstieg von 8OdG beobachtet werden. Es ist im Gegenteil sogar eine Abnahme der 8OdG-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

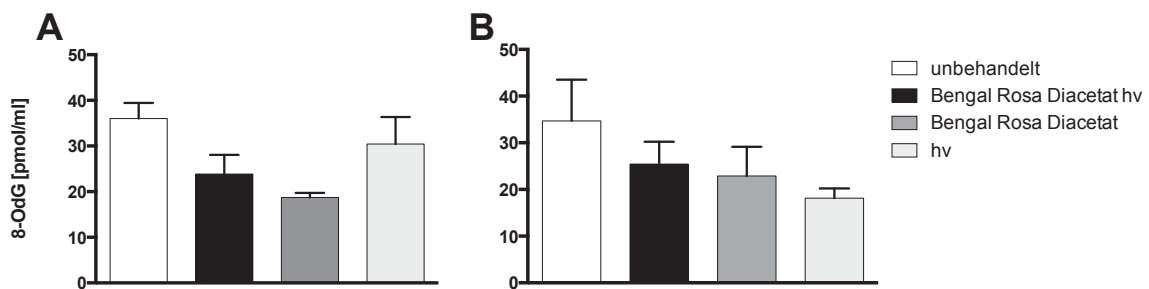


Abb. 33: Intrazelluläre 8OdG-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat. Details siehe Abb. 32 (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

Im Gegensatz zu den mit nicht-modifiziertem Bengal Rosa behandelten und bestrahlten Zellen waren die mit Bengal Rosa Diacetat behandelten und bestrahlten Zellen morphologisch unauffällig. Diese Beobachtung wird auch durch die Prolinmessung, die in Abb. 34 dargestellt ist, bestätigt.

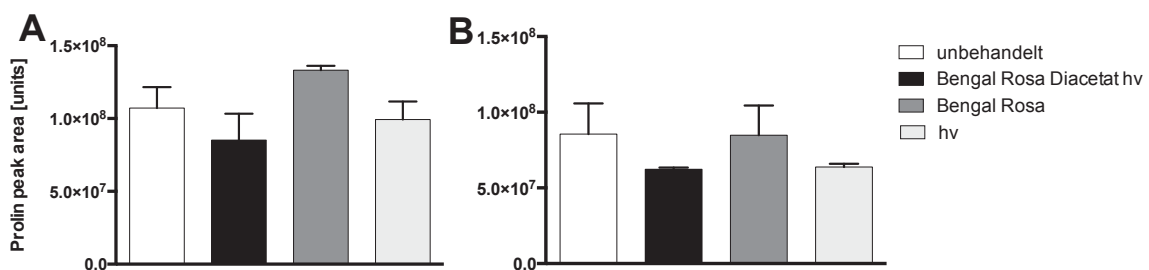


Abb. 34: Intrazelluläre Prolinkonzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat (Details siehe Abb. 32). Dargestellt sind die Rohdaten als Integration der Peakfläche (peak area units, Mittel \pm SEM; $n = 3$).

Bengal Rosa Diacetat hat sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zwar als nichttoxisch erwiesen, aber es konnten nicht die zu erwartenden Singulett-Sauerstoff-Effekte gezeigt werden, die erwartungsgemäß durch den Photosensibilisator hervorgerufen werden sollten. Um zu überprüfen, ob die Konzentration an Bengal Rosa Diacetat nicht ausreichend ist oder der Wellenlängenbereich des Leuchtmittels außerhalb des Absorptionsmaximums des Photosensibilisators liegt, wurde der intrazelluläre Guanin-Gehalt gemessen (siehe Abb. 35).

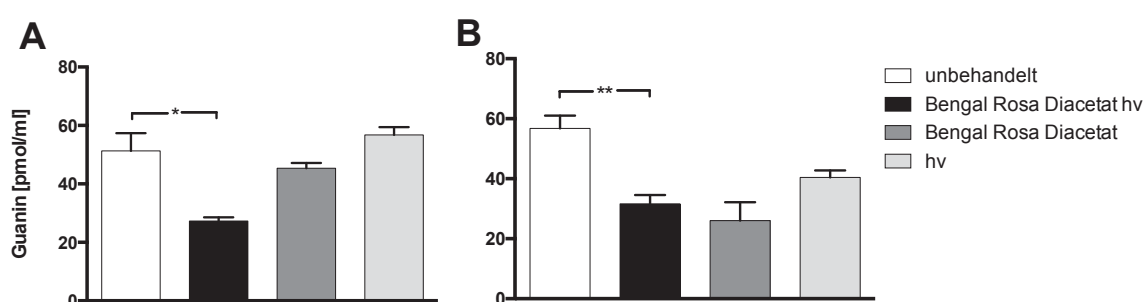


Abb. 35: Intrazelluläre Guanin-Konzentration nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat. Details siehe Abb. 32 (Mittel ± SEM; $n = 3$).

Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Guanin-Gehalt, angegeben in pmol/ml auf Prolin normiert, nach einstündiger (*unbehandelt*: 51 ± 6 pmol/mg, $n = 3$; *Bengal Rosa Diacetat hv*: 27 ± 1 pmol/mg, $n = 3$; $p = 0,0184$, ungepaarter t-Test) und vierstündiger Bengal-Rosa-Diacetat-Inkubation (*unbehandelt*: 57 ± 4 pmol/mg, $n = 3$; *Bengal Rosa Diacetat hv*: 32 ± 3 pmol/mg, $n = 3$; $p = 0,008$, ungepaarter t-Test) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erniedrigt war. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Reaktion von Guanin mit Singulett-Sauerstoff und ROS stattgefunden hat, allerdings kein 8OG bzw. 8OdG als Produkt entstanden ist. Die in Abb. 35 gezeigten Resultate bekräftigen auch die Hypothese, dass Bengal Rosa Diacetat wegen seiner geringeren Hydrophobizität mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht in der Zellmembran verbleibt und das Cytosol erreicht. Die geringere Toxizität ist dementsprechend nicht die Konsequenz einer nicht-stattgefundenen $^1\text{O}_2$ -Erzeugung.

3.2.3 TMPyP

Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat (TMPyP) ist ein geladenes, hydrophiles Porphyrin, das laut Literatur nach seiner Diffusion ins Zellinnere zum Nukleus migriert [77]. Hier lokalisiert bildet es mit der negativ geladenen DNA eine polare Atombindung aus. Der nach Belichtung mit UVA Licht (315–380 nm) erzeugte Singulett-Sauerstoff greift direkt das in der DNA eingebaute Guanosin und die in der nahen Umgebung befindlichen Guaninbausteine an. Für die hier vorliegende Arbeit war er ein geeigneter Photosensibilisator, um 8-Hydroxyguanin (8OG; alias 8-Oxo-7,8-dihydroguanin) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanidin (8OdG) zu erzeugen, da Porphyrine physiologische Photosensibilisatoren darstellen.

In Abb. 36 sind die gemessenen Konzentrationen von 8OG und 8OdG in pmol/mg Protein nach vierstündiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ TMPyP dargestellt. Der Gehalt von 8OG hat um den Faktor 5,5 gegenüber der Kontrolle abgenommen, wobei der Gehalt von 8OdG nahezu unverändert geblieben ist. In den Lysaten der Zellen, die nicht mit TMPyP inkubiert, aber mit UV-A-Licht (385 nm) bestrahlt wurden, konnte kein 8OG nachgewiesen werden. Die Singulett-Sauerstoff-Erzeugung mit TMPyP ist unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht gelungen bzw. die Methode hat zu keinem messbaren Anstieg des intrazellulären 8OG-Gehalts geführt.

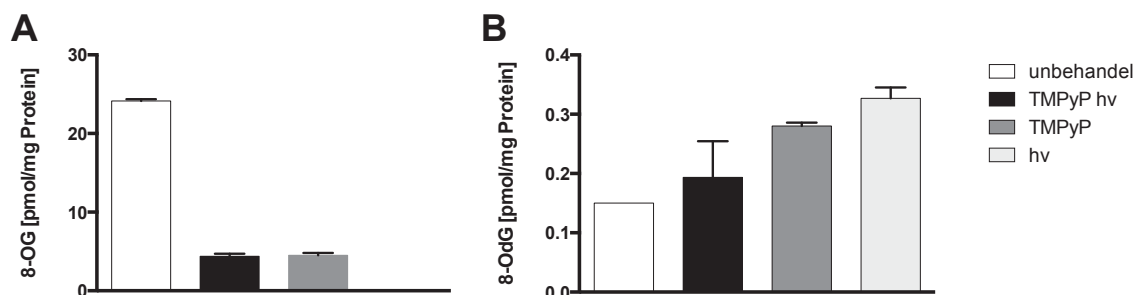


Abb. 36: Intrazelluläre A: 8OG bzw. B: 8OdG Konzentration nach Inkubation mit TMPyP. Nicht-transfizierte Zellen wurden bereitgestellt und für 4 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ TMPyP inkubiert wie in 2.4.1 beschrieben. Die Zellen wurden gewaschen und 10 min mit UV-A Licht bestrahlt (385 nm). Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurden 8OG und 8OdG per LC-MS/MS gemessen und mittels der BCA-Methode (siehe 2.5.6) normiert (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

3.2.4 Protoporphyrin IX

Der Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PPIX) ist ein Tetrapyrrol und fungiert als Precursor bei der Synthese essentieller prosthetischer Gruppen, wie z. B. dem Blutfarbstoff Hämoglobin. Da ET in hohen Konzentrationen in Erythrozyten vorliegt und unter physiologischen Bedingungen auf durch PPIX erzeugtes $^1\text{O}_2$ treffen könnte, wurde dieser Photosensibilisator für Versuche im Zellmodell verwendet. In Abb. 37(A) dargestellt sind die intrazellulären Gehalte von 8OG und in Abb. 37(B) die Gehalte von 8OdG, angegeben in pmol/mg Protein. Es kann, wie auch bei den Experimenten mit TMPyP (siehe 3.2.3), kein Anstieg, sondern eine Abnahme der Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. 8OG lag nach Inkubation mit PPIX etwa um den Faktor 3,7 geringer vor als in den Kontrollzellen (*unbehandelt*: 113 ± 1 pmol/mg, $n = 3$; *PPIX hv*: 31 ± 5 pmol/mg, $n = 3$). Der Gehalt von 8OdG lag insgesamt deutlich unter dem 8OG-Gehalt (*unbehandelt*: $0,15 \pm 0$ pmol/mg, $n = 3$; *PPIX hv*: $0,07 \pm 0,03$ pmol/mg, $n = 3$), was dadurch erklärt werden kann, dass PPIX im Gegensatz zu TMPyP vorwiegend cytosolisch vorliegt und der durch PPIX erzeugte $^1\text{O}_2$ mit höherer Wahrscheinlichkeit das freie Guanin angreift.

Die lichtmikroskopische Analyse der mit 100 $\mu\text{mol/l}$ PPIX inkubierten Zellen hat gezeigt, dass die Zellen bereits nach kurzer Inkubationszeit deutlich gestresst erschienen. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigten sie eine kugelförmige Gestalt. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der Proteinanalyse wider, mittels derer eine um den Faktor 1,8 verminderte Proteinkonzentration der Effektzellen gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen wurde (*unbehandelt*: $0,19 \pm 0$ pmol/mg, $n = 3$; *PPIX hv*: $0,12 \pm 0$ pmol/mg, $n = 3$). Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass auch die mit UV-Licht bestrahlten Zellen (*hv*) und die mit PPIX inkubierten, aber nicht bestrahlten Zellen (*PPIX*) stark gelitten haben und ebenfalls eine vergleichbare Proteinabnahme zeigten (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum geladenen TMPyP ist PPIX lipophiler. Analog zum Bengal Rosa ist es möglicherweise zu einer Einlagerung von PPIX in die Zellmembran und einem damit verbundenen Zellschaden gekommen.

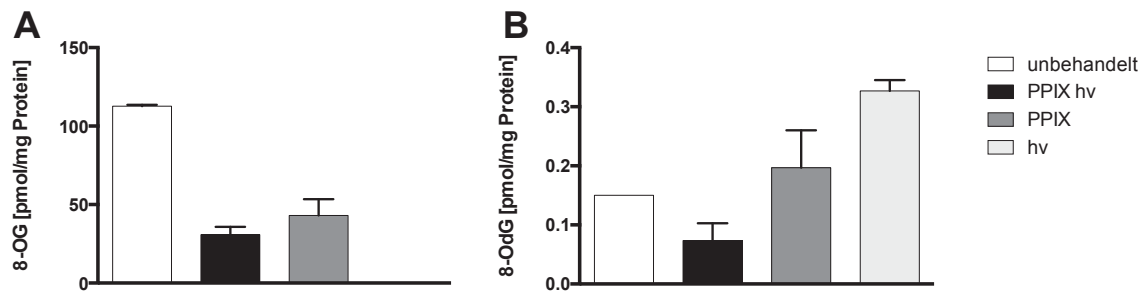


Abb. 37: Intrazelluläre A: 8OG bzw. B: 8OdG Konzentration nach Inkubation mit PPIX. Details siehe Abb. 36 (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

3.2.5 5-Aminolävulinsäure (ALA)

ALA ist eine kleine, im ungeladenen Zustand, hydrophile Verbindung, die mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Zellmembran verbleibt, sondern zu einem gewissen Maß das Zytosol erreicht. Die Aminosäure ist Bestandteil des Protoporphyrin IX. Zwei Moleküle ALA reagieren unter enzymatischer Abspaltung von zwei Wassermolekülen zu Porphobilinogen (PBG) (siehe Abb. 20). Nach dem Weitertransport der entstandenen Verbindung aus dem Mitochondrium in das Zytosol wird über drei weitere Zwischenschritte aus vier Molekülen PBG der wirksame Photosensibilisator Protoporphyrin IX gebildet.

NT-Zellen wurden für 4 h und 24 h mit jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aminolävulinsäure (ALA) inkubiert. Bevor die Zellen mit UV-Licht bestrahlt wurden, wurde überschüssiges ALA im Außenmedium und an den Zelloberflächen durch Waschen mit KRH-Puffer entfernt. Die in dieser Arbeit mit ALA durchgeführten Experimente zeigten keinen Effekt auf die intrazellulären 8OG- und 8OdG-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Die Interpretation der Daten führt zu dem Schluss, dass die Inkubation der Zellen mit ALA keinerlei Effekt hatte – weder auf die Markerkonzentrationen (8OG, 8OdG), noch auf die Proteinkonzentrationen (Daten nicht gezeigt). Um die Ursache dieses ausbleibenden Effekts näher zu beleuchten, wurde die intrazelluläre Konzentration an ALA per LC-MS/MS gemessen. Das Resultat dieser Untersuchung war, dass keine Differenz der ALA-Konzentrationen innerhalb der Kontrollgruppen und im Vergleich von Effektzellen mit Kontrollzellen festgestellt

werden konnte. Es ist folglich nicht zu einer intrazellulären Akkumulation von ALA gekommen, wodurch die Voraussetzungen für eine PPIX-Synthese und die daraus resultierende Singulett-Sauerstoff Produktion nach Belichtung nicht gegeben waren.

3.3 Intrazelluläre Quantifizierung von 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8OG) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin nach $^1\text{O}_2$ -Erzeugung durch DHPN-Endoperoxid

Bei der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung mittels Photosensibilisatoren werden parallel immer auch andere reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), wie z. B. Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^- \cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) gebildet (siehe Abb. 13). Die Anwesenheit dieser parallel erzeugten ROS kann die Aussagekraft der Versuchsergebnisse beeinträchtigen, da sie ebenfalls mit Guaninderivaten und anderen potentiellen intrazellulären Reaktionspartnern von Singulett-Sauerstoff reagieren können. Im Gegensatz zu den in Kapitel 2.6 beschriebenen Versuchen wird bei der hier beschriebenen Methode mit N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid (DHPN) ausschließlich Singulett-Sauerstoff im Zytosol erzeugt. Das Endoperoxid von DHPN (DHPNO_2) diffundiert aufgrund der nicht-ionischen Struktur über die Biomembran der Zelle in das Zytosol, wo erst durch Erwärmen (Thermolyse) $^1\text{O}_2$ und unreaktiver Triplett-Sauerstoff freigesetzt wird [80]. Ausführlich sind die Eigenschaften der Verbindung und Details zur Methodik in Kapitel 2.7 beschrieben.

Abb. 38 zeigt die intrazelluläre Konzentration von 8OG in der Einheit pmol/mg, normiert auf die Proteinmenge, die mittels des BCA-Assays (siehe 2.5.6) bestimmt wurde. Es wurde eine um den Faktor 1,4 (DHPNO_2 : 1763 ± 60 pmol/mg, $n = 3$; DHPN^* : 1300 ± 128 pmol/mg, $n = 3$; $p = 0,0307$, ungepaarter t-Test) erhöhte Konzentration an 8OG in den Zellen gemessen, die für 2 h mit 30 mmol/l an DHPN Endoperoxid bei 37° C im Inkubator inkubiert wurden. Die Zellen, die mit zuvor für 2 h bei 50 °C deaktiviertem DHPNO_2 (DHPN^*) behandelt wurden, zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg an 8OG

(Faktor 17,7) im Vergleich zur Kontrollgruppe (*unbehandelt*: 73 ± 4 pmol/mg, $n = 3$), die mit reinem Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (*KRH*) inkubiert wurde.

Der Anstieg von 8OG in den Effektzellen (*DHPNO₂*) wurde in diesem Experiment im Gegensatz zu den Resultaten aus den Versuchen mit Photosensibilisatoren ausschließlich durch Singulett-Sauerstoff hervorgerufen. Dass die Zellen, die mit deaktiviertem DHPN-Endoperoxid (*DHPN**) inkubiert wurden, ebenfalls einen 8OG-Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Zellen aufwiesen kann durch eine Restaktivität des Endoperoxids bedingt sein oder durch Restmengen an Methyleneblau, das nach der Beladung von DHPN zu *DHPNO₂* während der Synthese in der Lösung verblieben ist.

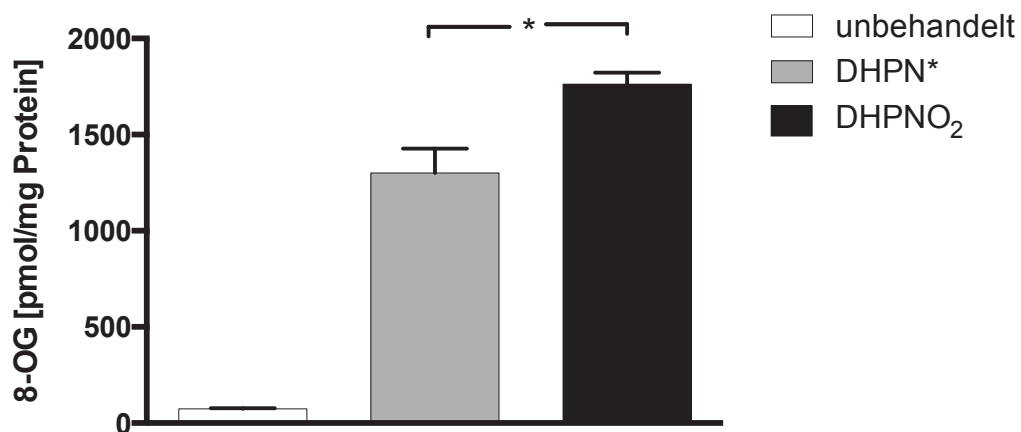


Abb. 38: Intrazelluläre 8OG-Konzentration nach Inkubation mit *DHPNO₂*. Nicht-transfizierte Zellen wurden bereitgestellt. Die thermolytische ¹O₂-Freisetzung fand über 2 h mit 30 mmol/l *DHPNO₂* bzw. *DHPN** bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre statt. Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurde 8OG per LC-MS/MS gemessen und mittels des BCA-Tests (siehe 2.5.6) normiert (Mittel ± SEM; $n = 3$).

3.4 Identifikation von MSO als Singulett-Sauerstoff-Marker

Die massenspektrometrische Detektion von 8-Oxoguanin (8OG) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) war aufgrund geringer Sensitivität nur limitiert möglich. Außerdem reagiert 8OG etwa um den Faktor 100 schneller mit ¹O₂ weiter als das Ausgangsprodukt [73]. Um einen geeigneteren Indikator zu finden, anhand dessen ein möglicher intrazellulärer Singulett-Sauerstoff-Schaden

quantifiziert werden kann, wurden Full-Scans von $^1\text{O}_2$ -exponierten Aminosäuren und NT-Zelllysaten aufgenommen und diese nach dem LC-MS/MS-Difference-Shading-Prinzip (siehe 2.8.1) ausgewertet. Bei dieser Methode werden die Lysate unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen in einem Massenbereich von 50–400 m/z gescannt. Dieser Bereich deckt Molekülgrößen ab, dessen Strukturaufklärungen mit den gegebenen Mitteln in einem realisierbaren Rahmen liegen.

In Abb. 39 wurden Konzentrationsunterschiede der intrazellulären Verbindungen mit Hilfe der von Dirk Gründemann, Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln entwickelten Software *DS Fullview* auf zweidimensionaler Ebene sichtbar gemacht. Bei einer Retentionszeit von 391 sec und einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 166,2 ist ein rotes Signal zu erkennen. Rot bedeutet, dass die unbekannte Verbindung in den Effektzellen, also den NT-Zellen, die für 2 h bei 37 °C mit 10 mmol/l DHPNO₂ inkubiert und zur thermolytischen $^1\text{O}_2$ -Freisetzung angeregt wurden, in einer höheren Konzentration vorlag als in den Kontrollzellen (DHPN*).

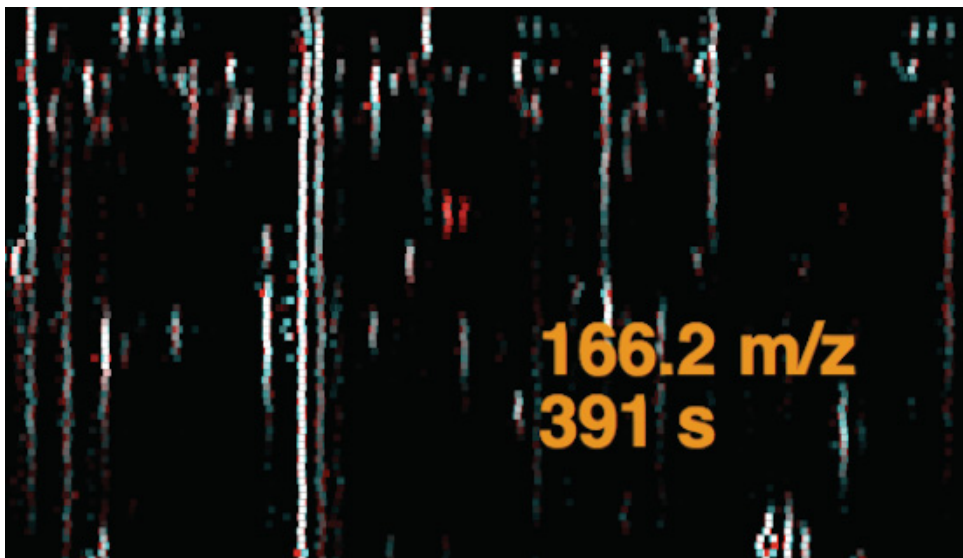


Abb. 39: Ergebnis einer Differenz-Abtönung (Details siehe Abb. 38). Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurden Fullscans im Bereich von 50–400 m/z gemessen, hier: zicHILIC (siehe Tab. 1).

Zur Identifikation der unbekanntes Verbindung mit der Molekülmasse von 165,2 g/mol $[M-H^+]$ wurde ein Produktionen-Scan (siehe 2.8.2) aufgenommen. Dabei wurden mit Kollisionsenergien (CE) von 5 Volt, 15 Volt und 25 Volt Fragmentmuster erstellt, die mit Fragmentmustern bekannter Moleküle, welche in Datenbanken (<http://www.massbank.jp>, <http://metlin.scripps.edu>) hinterlegt sind, verglichen wurden. Das Ergebnis war eine Übereinstimmung mit Methioninsulfoxid (siehe Abb. 43). Ebenfalls wurde das Signal in einem Ansatz von mit 10 mmol/l DHPNO₂ inkubiertem Methionin wiedergefunden und ebenfalls fragmentiert (siehe Abb. 41).

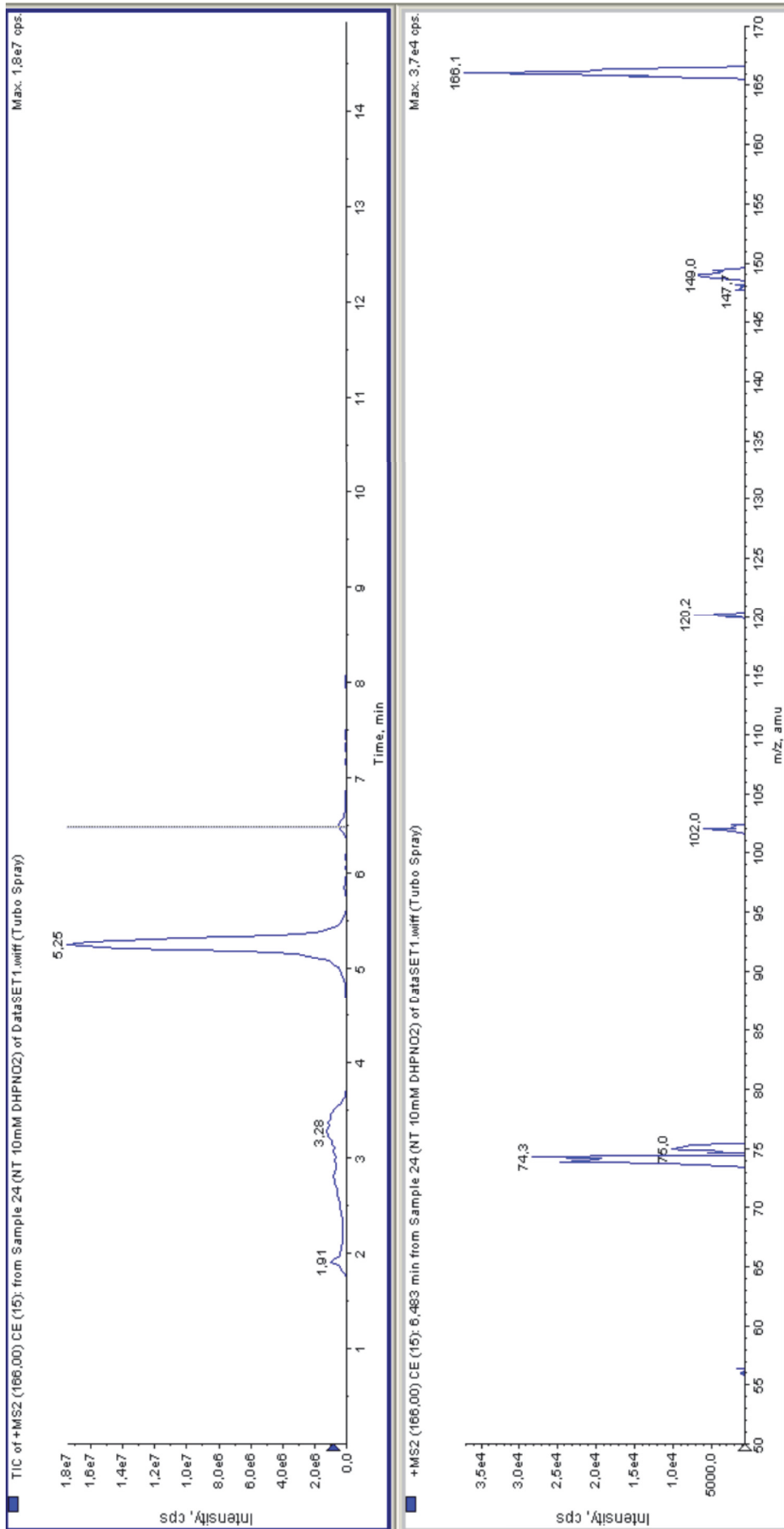


Abb. 40: Produktionsen-Scan im Positiv-Modus, CE = 15 Volt. Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden bereitgestellt. Die thermolytische ¹⁸O₂-Freisetzung fand über 2 h mit 10 mmol/l DHPNO₂ bzw. DHPN* bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre statt. Zellyse mit 1 ml Methanol.

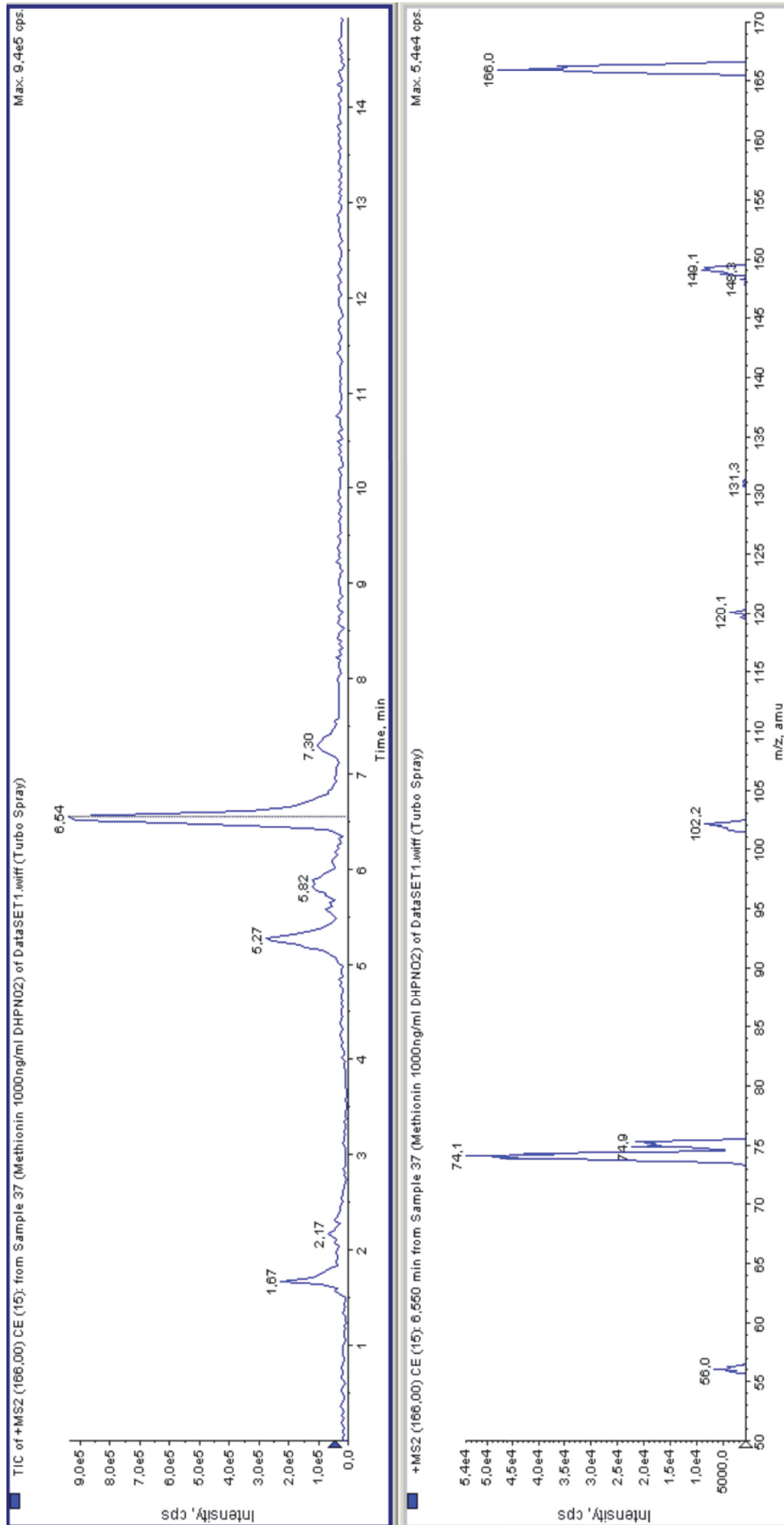


Abb. 41: Produktions-Scan im Positiv-Modus, CE = 15 Volt. 1000 ng/ml Methionin in H₂O wurden bereitgestellt. Die thermolytische ¹⁸O₂-Freisetzung fand über 2 h mit 10 mmol/l DHPN₂ bzw. DHPN* bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre statt.

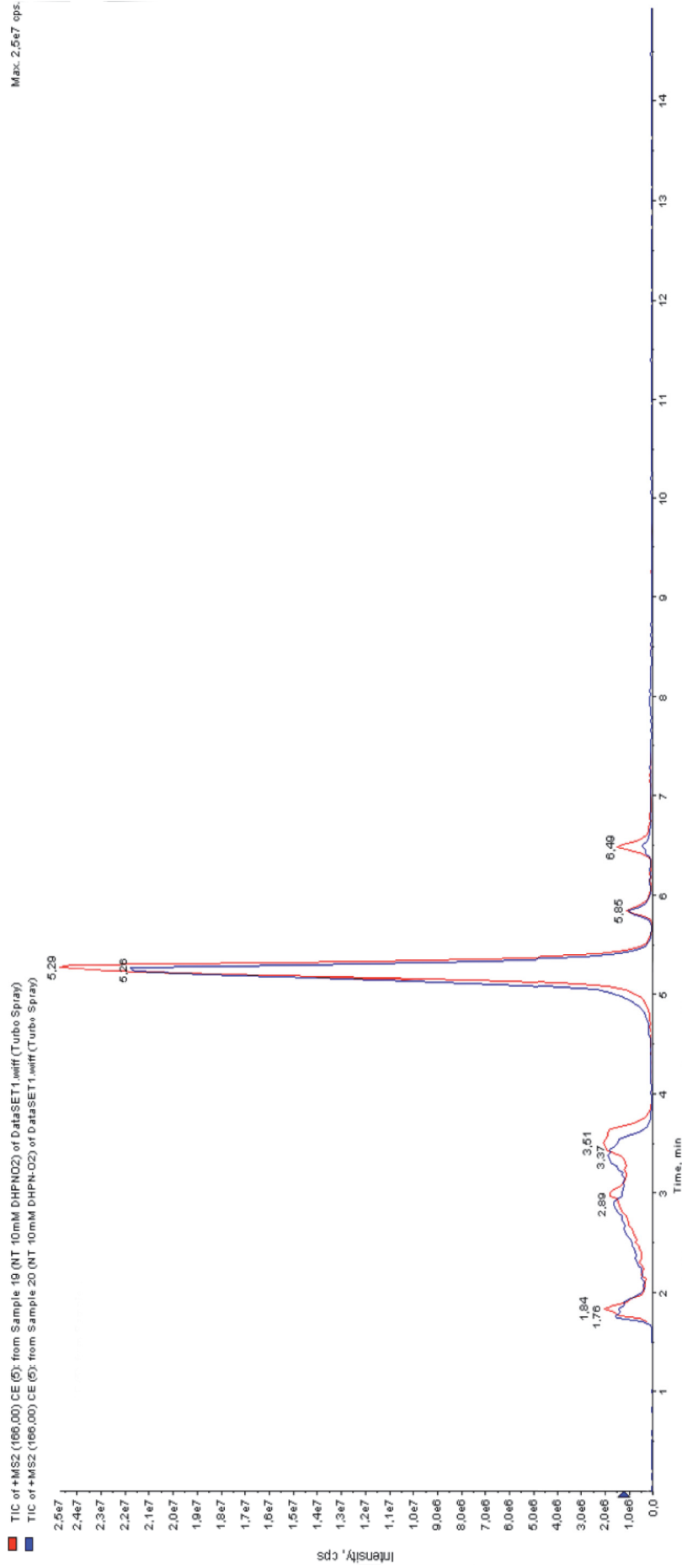


Abb. 42: HPLC-Bedingungen: HILIC-Säule; Elutionsmittel A: 0,1 % Ameisensäure; B: 0,1 % Ameisensäure in ACN

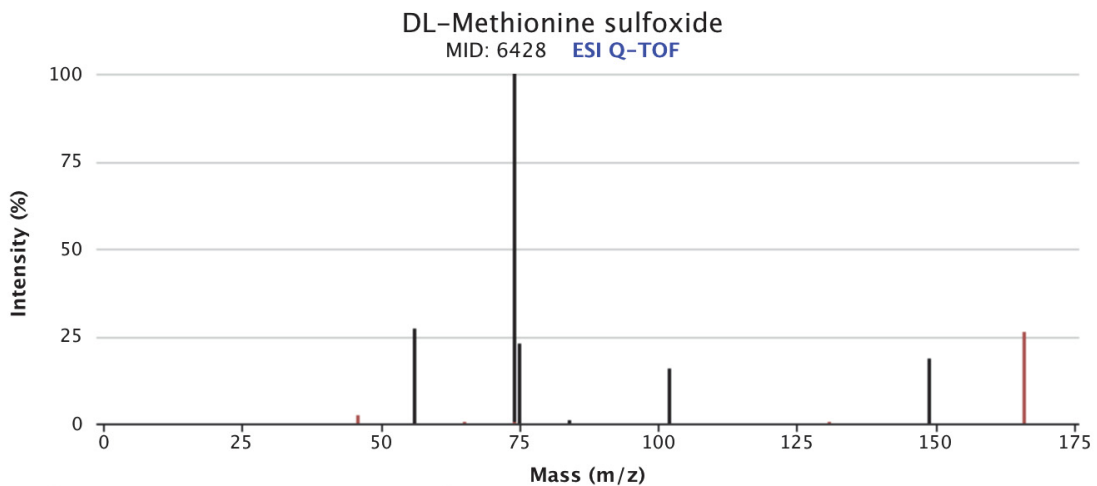


Abb. 43: Vergleichsspektrum von DL-Methioninsulfoxid der Datenbank metlin.scripps.edu (MID 6428) im Positivmodus bei 10 Volt.

Zur eindeutigen Identifikation wurde Methioninsulfoxid bei der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) erworben und zu den Lysaten dazu pipettiert (engl., spiken). Die Peakfläche zeigte einen Zuwachs, was den Anfangsverdacht bestätigte (Daten nicht gezeigt).

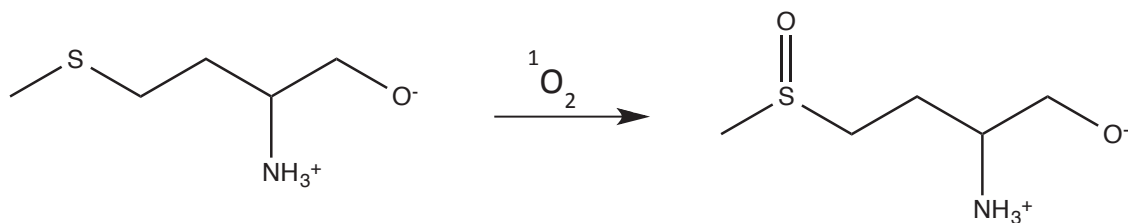


Abb. 44: Oxidation von Methionin (links) zu Methioninsulfoxid (rechts) durch Singulett-Sauerstoff. Die Reaktion ist über ein Enzym reversibel [73].

3.5 Identifikation von Kynurenin als Singulett-Sauerstoff-Marker

Auf die gleiche Weise, wie MSO (siehe 3.4), wurde auch Kynurenin als intrazelluläres Oxidationsprodukt identifiziert. Tryptophan ist ein potenter $^1\text{O}_2$ -Quencher ($k \approx 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), wobei die Reaktion eine Ringöffnung des Indol-Grundgerüsts zur Folge hat (siehe Abb. 45) [73]. In Experimenten, in denen NT-

Zellen über 2 h mit 30 mmol/l DHPNO₂ inkubiert wurden, konnte ein signifikanter Anstieg der Kynurenin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (DHPN*) gemessen werden. Die Ergebnisse ließen sich jedoch nicht verlässlich in jedem Experiment reproduzieren; In anderen Durchführungen kam es zu keinem signifikanten Unterschied der Kynurenin-Konzentration.

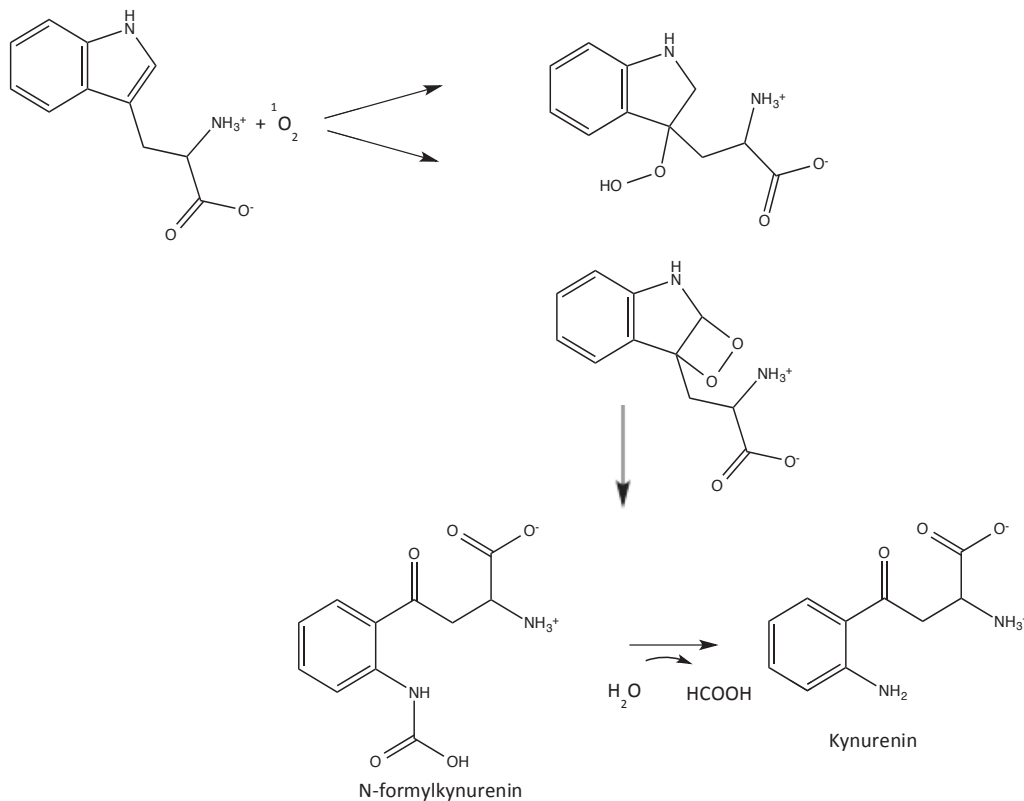


Abb. 45: Die Reaktion von Tryptophan mit Singulett-Sauerstoff führt zur Ringöffnung.

3.6 Intrazelluläre Quantifizierung von MSO nach ¹O₂-Erzeugung durch Photosensibilisatoren

Die Resultate aus Kapitel 3.4 belegen, dass nach Inkubation von NT-Zellen mit DHPNO₂ Methioninsulfoxid (MSO) als Reaktionsprodukt von Singulett-Sauerstoff mit Methionin entsteht. In weiteren Versuchen wurde getestet, ob die Inkubation und Belichtung der NT-Zellen mit den bereits verwendeten Photosensibilisatoren ebenfalls zu einem intrazellulären Konzentrationsanstieg von MSO führt.

In Abb. 46 sind die Inkubationen von nicht-transfizierten HEK-293-Zellen mit Bengal Rosa, TMPyP und PPIX und anschließender Belichtung mit Licht entsprechender Wellenlänge gezeigt. Es konnte ein signifikanter Anstieg des intrazellulären MSO-Gehalts bei für 1 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ inkubierten Zellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen um den Faktor 13,4 (*unbehandelt*: $16 \pm 0,2$ pmol/mg; *Bengal Rosa hv*: 210 ± 18 pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 5$) gemessen werden (siehe Abb. 46(A)).

Bei der Inkubation der Zellen für 4 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ TMPyP und Belichtung kam es zu einem signifikanten 5,4-fachen intrazellulären MSO-Anstieg (*unbehandelt*: $26 \pm 0,8$ pmol/mg; *TMPyP hv*: 141 ± 8 pmol/mg; $n = 3$, $p = 0,0001$, ungepaarter t-Test, siehe Abb. 46(B)).

Die Behandlung der Zellen für 4 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ PPIX führte ebenfalls zu einem signifikanten 80-fachen intrazellulären MSO-Anstieg (*unbehandelt*: $0,68 \pm 0,04$ pmol/mg; *PPIX hv*: $53,57 \pm 9,56$ pmol/mg; $n = 3$, $p = 0,0052$, ungepaarter t-Test, siehe Abb. 46(C)). In allen Versuchsansätzen lag der MSO-Gehalt innerhalb der Kontrollzellen im Vergleich zu den Effektzellen auf einem niedrigen Grundniveau.

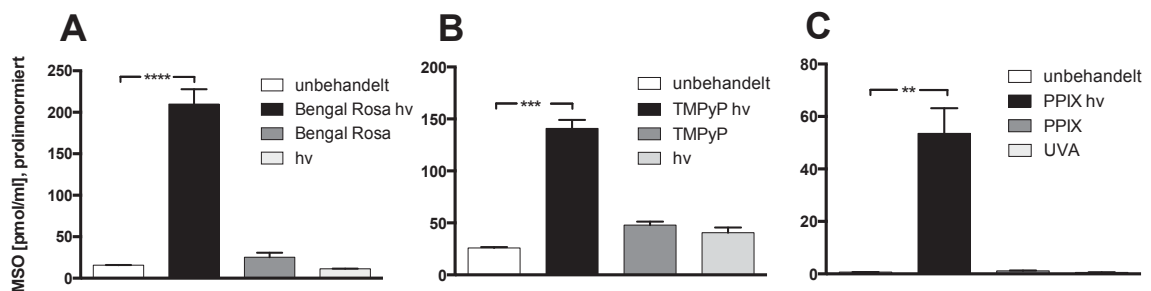


Abb. 46: Intrazelluläre MSO-Konzentration in NT-Zelllysaten nach Inkubation mit A: 100 $\mu\text{mol/l}$ Bengal Rosa (1 h), B: 100 $\mu\text{mol/l}$ TMPyP (4 h), C: 100 $\mu\text{mol/l}$ PPIX (4 h). Die Zellen wurden nach der Inkubation gewaschen und 1 h mit A: sichtbarem Licht bzw. B, C: UVA-Licht bestrahlt (380–750 nm). Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurde MSO per LC-MS/MS gemessen und anhand der ebenfalls massenspektrometrisch bestimmten Prolinwerte normiert.

Das Überleben der Zellen, das über die intrazelluläre Prolinmessung kontrolliert wurde, verhielt sich, bei den mit Bengal Rosa und PPIX behandelten Zellen, im

Vergleich zu den gemessenen MSO-Gehalten absolut konträr. Der gemessene Prolingehalt, als Integration der Peakfläche in den *Bengal-Rosa-hv*-Zellen, war um das 44-fache gegenüber den unbehandelten Zellen reduziert (*unbehandelt*: $2,2 \pm 0,5 \cdot 10^7$ pmol/mg; *Bengal Rosa hv*: $1,6 \pm 1,1 \cdot 10^6$ pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 5$). Der Prolingehalt der Kontrollgruppen *Bengal Rosa* und *hv* war vergleichbar mit dem der unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Im Falle der mit PPIX inkubierten Zellen war der gemessene Prolingehalt als Integration der Peakfläche in den *PPIX-hv*-Zellen um das 43-fache gegenüber den unbehandelten Zellen reduziert (*unbehandelt*: $2,1 \pm 0,2 \cdot 10^7$ pmol/mg; *PPIX hv*: $0,5 \pm 0,3 \cdot 10^7$ pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 3$). Der Prolingehalt der Kontrollgruppen *PPIX* und *UVA* war ebenfalls vergleichbar mit dem der unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten stimmen mit denen aus den Versuchen, bei denen 8OG als Singulett-Sauerstoff-Marker quantifiziert wurde, überein (siehe 3.2.1, 3.2.4), bei denen ebenfalls eine starke Prolinabnahme in den Effektzellen gemessen wurde. Die starke Abnahme der Prolinkonzentration deutet auf eine Schädigung der Photosensibilisatoren hin. Es ist aber auch in Betracht zu ziehen, dass Prolin in diesem System für eine Normierung ungeeignet sein könnte. Der quantifizierte MSO-Anstieg bekräftigt die Resultate der Differenz-Abtönung, wobei, aufgrund der parallelen Typ-I-Reaktion der Photosensibilisatoren davon auszugehen ist, dass der Effekt nicht zu 100 % durch Singulett-Sauerstoff bedingt ist.

3.7 Intrazelluläre Quantifizierung von MSO nach $^1\text{O}_2$ -Erzeugung durch DHPN-Endoperoxid

In Kapitel 3.6 konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation von Nicht-transfizierten Zellen mit Photosensibilisatoren der intrazelluläre MSO-Gehalt angestiegen ist. Wie in Abb. 13 verdeutlicht, können allerdings bei der Belichtung solcher kumulativer Doppelbindungssysteme neben $^1\text{O}_2$ auch andere Radikale entstehen, die mit Methionin zu Methioninsulfoxid reagieren können. Nur mit DHPNO_2 kann eine Eindeutigkeit der Resultate gewährleistet werden, weil bei der thermolytischen $^1\text{O}_2$ -Freisetzung keine Typ-I-ROS entstehen.

Die in Abb. 47 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen die intrazelluläre Konzentration von MSO in der Einheit pmol/ml, normiert auf die intrazellulär gemessene Prolinmenge. Es wurde eine um den Faktor 6 (*DHPN**: 78 ± 2 pmol/mg; *DHPNO*₂: 458 ± 8 pmol/mg; $n = 3$, $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test) erhöhte Konzentration an MSO in den Zellen gemessen, die mit 30 mmol/l an DHPN Endoperoxid für 2 h bei 37° C im Inkubator inkubiert wurden. Die Zellen, die mit zuvor für 2 h bei 50 °C abdissoziiertem *DHPNO*₂ (*DHPN**) behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, die mit reinem Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (*KRH*) inkubiert wurden, einen leichten Anstieg an MSO (*unbehandelt*: 47 ± 2 pmol/mg, $n = 3$). Es gab keinen messbaren Unterschied des intrazellulären Prolingehaltes zwischen Effekt- und Kontrollzellen (*DHPNO*₂, *DHPN**) bzw. unbehandelten Zellen.

Diese Daten zeigen den intrazellulären MSO-Anstieg, der durch exklusive ¹O₂-Freisetzung bedingt ist. Die innerhalb der Kontrollgruppen konsistenten Prolinwerte lassen auf eine nicht zellschädigende Wirkung von *DHPNO*₂ schließen.

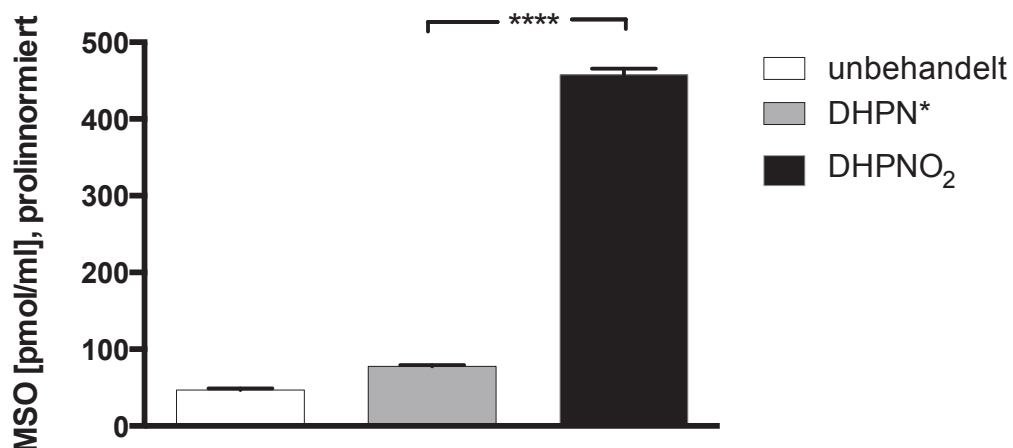


Abb. 47: Intrazellulärer Anstieg der MSO-Konzentration durch *DHPNO*₂. Details siehe Abb. 38 (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

3.8 Quantifizierung der Hemmung der MSO-Produktion durch $^1\text{O}_2$ -Quencher *in vitro*

3.8.1 Puffertest

Um für die Reaktion von Methionin mit DHPNO_2 die Potenz bekannter oder potentieller Singulett-Sauerstoff-Quencher *in vitro* bestimmen zu können, wurden jeweils 0,1 mM L-Methionin mit 10 mM DHPNO_2 bei 37 °C inkubiert und die produzierte MSO-Menge anschließend massenspektrometrisch bestimmt. Diese *in vitro* Versuche sollten unter möglichst physiologischen Bedingungen stattfinden, weshalb zunächst ein geeignetes Puffersystem entwickelt wurde. In Abb. 48 sind die Ergebnisse eines Tests mit HEPES/NaOH, TRIS-HCl und einem Phosphat-Puffer ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) dargestellt. Alle getesteten Puffersysteme wirken in einem Bereich, der den physiologischen pH-Wert von 7,4 abdeckt.

Eine weitere Anforderung an den verwendeten Puffer war, dass er die eingesetzten Quencher bis zu einer Konzentration von 30 mmol/l abpuffern und dabei Massenspektrometer-kompatibel bleiben sollte. Abb. 48 zeigt die Produktion von MSO nach thermolytischer $^1\text{O}_2$ -Freisetzung als Integration der Peakflächen (peak area [units]). Getestet wurden die jeweiligen Puffer in den Konzentrationen von 5 mmol/l und 50 mmol/l. Zusätzlich wurden die Ansätze nach abgelaufener Reaktion um den Faktor 10 verdünnt gemessen, um eine mögliche Ionensuppression am Massenspektrometer aufzudecken. Um den 100 %-Wert zu ermitteln, wurde Methionin mit DHPNO_2 in reinem H_2O inkubiert und das entstandene MSO gemessen (H_2O : $5,7 \pm 0,7 \cdot 10^6$ units). Die Peakfläche von MSO in H_2O war im Vergleich zu der in beispielsweise 5-milimolarem HEPES-Puffer (HEPES 5 mmol/l: $2,6 \pm 0,1 \cdot 10^6$ units, siehe Abb. 48(A) mehr als doppelt so groß. Eine Konzentrationserhöhung des Puffers auf 50 mmol/l führte zu einer Reduktion des MSO-Signals (HEPES 50 mmol/l: $5,0 \pm 0,4 \cdot 10^5$ units) um den Faktor 11 im Vergleich zum gemessenen Wert in H_2O und um den Faktor 5 im Vergleich zum MSO-Wert gemessen in 5-milimolarem HEPES-Puffer. Eine

Verdünnung der Reaktionslösung um den Faktor 10 führte zu einer nicht-proportionalen Abnahme der MSO-Peakfläche um den Faktor 29 (HEPES 5 mmol/l 1:10 $9,0 \pm 0,1 \cdot 10^4$ units). Die Verdünnung des Reaktionsansatzes in 50 milimolarem HEPES-Puffer um den Faktor 10 (HEPES 50 mmol/l 1:10 $7,3 \pm 0,5 \cdot 10^4$ units) zeigte im Vergleich zum unverdünnten Ansatz eine 7-fache Abnahme der Signalstärke und im Vergleich zur 1:10-Verdünnung des 5-milimolaren Ansatzes nur eine marginale Reduktion der Peakfläche. Die Reduktion der MSO-Signalstärke verhielt sich in Gegenwart von TRIS und im Phosphat-Puffer in vergleichbaren Dimensionen, wobei die MSO-Konzentration im Phosphatpuffer die größten Schwankungen zeigte. Der Phosphat-Puffer wies die größte Ionensuppression bei der hohen unverdünnten Konzentration auf und aufgrund der Tatsache, dass Phosphat wegen seiner physikalischen Eigenschaften schlecht in der Ionisationsquelle evaporiert wird und sich in kristalliner Form im Quadrupol des Massenspektrometers absetzen könnte, was im milimolaren Bereich einen Geräteschaden verursachen könnte, wurde HEPES für die weiteren Versuche verwendet. Die Peakflächen der MSO-Werte in den untersuchten Puffersystemen in den jeweiligen getesteten Konzentrationen im Vergleich zu den MSO-Werten in einfacher wässriger Lösung sind in Tab. 6 aufgelistet.

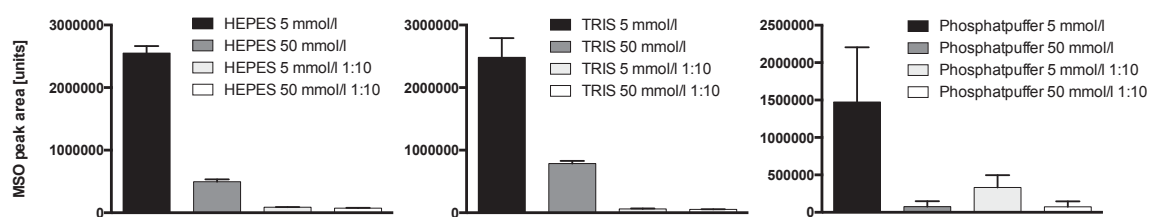


Abb. 48: Puffertest: 100 μ mol/l Methionin wurden in Gegenwart von A: HEPES, B: TRIS und C: Phosphatpuffer in 5 mmol/l und 50 mmol/l Ansätzen bereitgestellt. Die thermolytische $^{18}\text{O}_2$ -Freisetzung fand mit 10 mmol/l DHPNO₂ über 2 h bei 37 °C im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) statt. MSO wurde in den unverdünnten und 1:10 verdünnten Proben per LC-MS/MS gemessen (Mittel \pm SEM; $n = 3$).

	H ₂ O MSO peak area [units]		HEPES MSO peak area [units]	TRIS MSO peak area [units]	Phosphat MSO peak area [units]
unverdünnt	$5,7 \pm 0,7 \cdot 10^6$	5 mmol/l	$2,6 \pm 0,1 \cdot 10^6$	$2,5 \pm 0,3 \cdot 10^6$	$1,5 \pm 0,7 \cdot 10^6$
		50 mmol/l	$5,0 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$7,9 \pm 0,4 \cdot 10^5$	$7 \pm 7 \cdot 10^4$
1:10	$8,2 \pm 1,2 \cdot 10^5$	5 mmol/l 1:10	$9,0 \pm 0,1 \cdot 10^4$	$6,2 \pm 0,6 \cdot 10^4$	$3,3 \pm 1,6 \cdot 10^5$
		50 mmol/l 1:10	$7,3 \pm 0,5 \cdot 10^4$	$5,2 \pm 0,2 \cdot 10^4$	$7,4 \pm 7,2 \cdot 10^4$

Tab. 6: Puffertest: Methioninsulfoxid-Peakflächen [units]

3.8.2 Zeitverlauf der Produktion von MSO

Im Folgenden wurde die MSO-Produktion im *in-vitro*-Ansatz mit 10 mmol/l HEPES/NaOH (pH 7,4) ohne Zugabe von Quenchern bestimmt, um zu testen, ob die Konzentration proportional zur Inkubationszeit in dem Puffermilieu zunimmt. Dazu wurden 0,1 mmol/l Methionin 1 min, 5 min, 10 min und 120 min mit 10 mmol/l DHPNO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Natriumazid, einem potenten physikalischen ¹O₂-Quencher, in einer Endkonzentration des 20-fachen Überschusses an Natriumazid gegenüber dem eingesetzten DHPNO₂ auf Eis abgestoppt. Abb. 49 zeigt die am Massenspektrometer gemessene MSO-Konzentration zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Ergebnisse liefern die Erkenntnis, dass für die thermolytische Freisetzung von ¹O₂ aus DHPNO₂ das gleiche Gesetz wie für den radioaktiven Zerfall gilt ($v(t)$ = Stoffmenge pro Zeiteinheit):

$$v(t) = v_0 \cdot \exp(-\lambda \cdot t)$$

(Gleichung 8)

Die Integration liefert die Summe des gesamten freigesetzten $^1\text{O}_2$ als Funktion der Zeit, wozu die MSO-Produktion proportional ist:

$$n = n_{\text{max}} \cdot (1 - \exp(-\lambda \cdot t))$$

(Gleichung 9)

Die Geschwindigkeitskonstante λ (Lamda) ist der Kehrwert der mittleren Lebensdauer $\tau = 1/\lambda$ von DHPNO_2 , also der Zeit, nach der die Zahl der Moleküle sich um den Faktor $e = 2,71828\dots$ verringert hat. τ (Tau) unterscheidet sich von der Halbwertszeit $t_{1/2}$ nur um den konstanten Faktor $\ln 2$. MSO akkumulierte proportional dazu mit einer Geschwindigkeit von $\lambda = 0,027 \text{ min}^{-1}$ und $t_{1/2} = \ln 2/\lambda = 26 \text{ min}$.

In einem Kontrollexperiment war der MSO-Gehalt nach 2 h ohne Quencher $33 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$, mit D_2O statt H_2O $51 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$, ohne DHPNO_2 $0.17 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{M}$ und mit zuvor inaktiviertem (2 h bei $50 \text{ } ^\circ\text{C}$) DHPNO_2 $1.6 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{M}$. Der Zuwachs der MSO-Konzentration in deuteriertem Wasser, in dem $^1\text{O}_2$ aufgrund von Lösemittel-Isotopeneffekten eine deutlich längere Lebensdauer hat, bestätigt dass MSO das Produkt der Reaktion von Methionin mit $^1\text{O}_2$ ist [74].

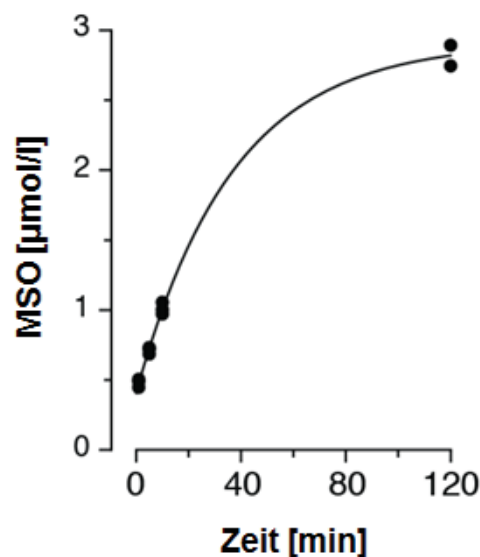


Abb. 49: Zeitverlauf der Produktion von MSO. 0,1 mmol/l Methionin und 10 mM DHPNO_2 in 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) wurden 1 min, 5 min, 10 min oder 120 min bei $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Abstoppen mit Azid (Endkonzentration 200 mM) wurde MSO per LC-MS/MS gemessen ($n = 2-3$ pro Zeitpunkt). Graph: Dirk Gründemann

3.8.3 Zeitabhängigkeit der Quenchwirkung von ET und Azid

Es gibt physikalische und chemische Singulett-Sauerstoff-Quencher (siehe 1.5.1). Natriumazid ist ein potenter physikalischer Quencher, der die Energie des $^1\text{O}_2$ absorbiert, dann relaxiert, indem er die Energie in Form von Wärme abgibt und erneut Energie vom $^1\text{O}_2$ aufnehmen kann. Ergothionein ist aufgrund der strukturellen Eigenschaften vermutlich ein chemischer Singulett-Sauerstoff-Quencher. Bei dieser Form der Singulett-Sauerstoff-Deaktivierung findet eine strukturelle, irreversible Veränderung, z. B. durch eine Oxidationsreaktion des Quenchers statt. Da die chemischen Quencher, im Gegensatz zu den physikalischen Quenchern, die unerschöpflich für die $^1\text{O}_2$ -Deaktivierung im Gemisch zur Verfügung stehen, in einer Reaktion verbraucht werden, kann es zu unterschiedlichen Reaktionskonstanten kommen. In dem in Abb. 50 dargestellten *in-vitro*-Experiment ist die Zeitabhängigkeit der Quenchwirkung von Ergothionein und Azid dargestellt.

0,1 mmol/l Methionin wurden in Gegenwart der jeweiligen Quencher für 1 min, 5 min, 10 min und 120 min und 10 mmol/l DHPNO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Quencher wurden in den Konzentrationen 1 µmol/l, 10 µmol/l, 100 µmol/l, 1000 µmol/l und 10 mmol/l eingesetzt und die Reaktion mit Azid in einer Endkonzentration von 200 mmol/l in der Lösung auf Eis abgestoppt. Die produzierte MSO-Menge wurde massenspektrometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Rohdaten aus ungepaarten Einzelexperimenten angegeben als Integration der Peakflächen [units].

Die Resultate dieses Vergleichs der Hemmwirkung von Ergothionen und Azid auf die MSO-Produktion zeigen, dass sich die Verbindungen als Quencher gegenüber Singulett-Sauerstoff fundamental unterschiedlich verhalten. Die Hemmkurve von Ergothionein verschiebt sich mit zunehmender Inkubationszeit bis zu 120 min nach rechts. Das bedeutet, dass ET bei kurzen Inkubationszeiten von bis zu 1 min ein potenter $^1\text{O}_2$ -Quencher ist und dann verbraucht wird. Azid hingegen zeigt bei kurzen Inkubationszeiten von 1 min keinerlei Quenchwirkung. Erst nach 5 min kann eine Hemmwirkung der MSO-Bildung beobachtet werden,

die mit zunehmender Inkubationszeit zunimmt. Bei einer Inkubationszeit von 120 min zeigen ET und Azid eine vergleichbare schützende Wirkung gegenüber $^1\text{O}_2$.

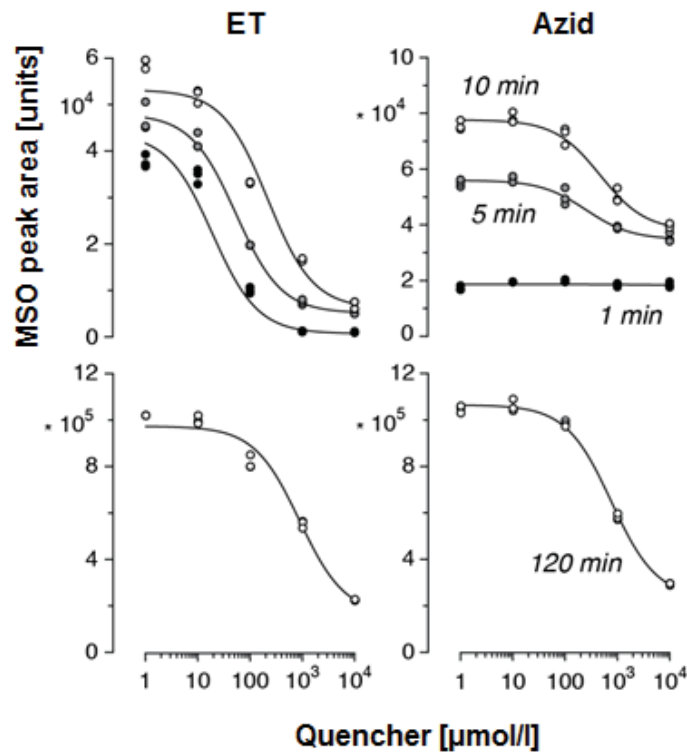


Abb. 50: 0,1 mmol/l Methionin und 10 mM DHPNO₂ in 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) plus Quencher wurden für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen mit Azid wurde MSO per LC-MS/MS gemessen. Rohdaten aus ungepaarten Einzelexperimenten. Graph: Dirk Gründemann

3.8.4 *In-vitro*-ET-Verbrauch durch $^1\text{O}_2$

Die Ergebnisse aus 3.8.3 legen den Verdacht nahe, dass ET im einfachen *in-vitro*-Ansatz ohne Enzyme und Antioxidantien in der Reaktion mit $^1\text{O}_2$ verbraucht wird. Um dies zu prüfen, wurde der ET-Gehalt in Gegenwart von DHPNO₂ über die Zeit gemessen.

Abb. 51 zeigt die Quantifizierung der ET-Konzentration nach Inkubation von 0,1 mmol/l Methionin mit 10 mmol/l DHPNO₂. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass die ET-Konzentration bei niedrigen Ausgangskonzentrationen (0,1 mmol/l) bereits nach 10 min auf die Hälfte abgesunken war. Das heißt, dass nur noch die Hälfte der ET-Ausgangskonzentration nach 10 min unverändert in

der Lösung vorlag. Bei höheren ET-Ausgangskonzentrationen (1 mmol/l, 10 mmol/l) konnte ebenfalls eine Abnahme gemessen werden, allerdings war das Konzentrationsverhältnis zwischen eingesetztem ET und DHPNO₂ nicht mehr so stark auf Seiten des DHPNO₂, was den Effekt abgeschwächt hat. Die Messung der ET-Konzentration in Gegenwart von DHPNO₂ über die Zeit hat ergeben, dass ET in einer einfachen Pufferlösung durch ¹O₂ verbraucht wird.

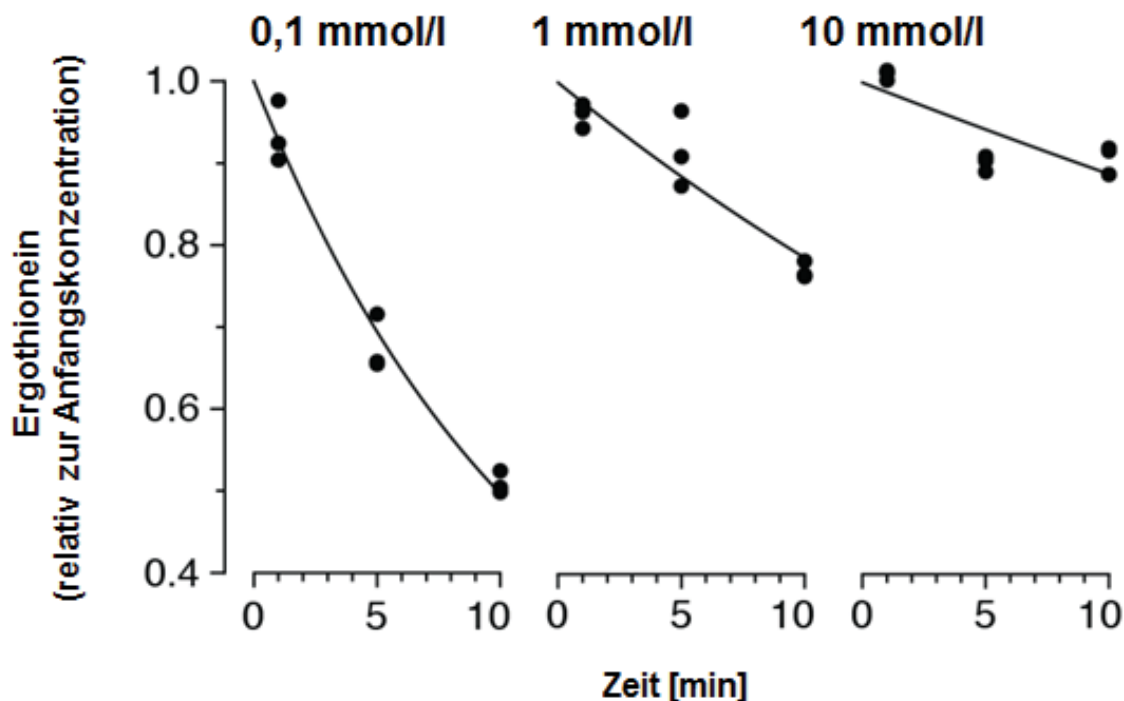


Abb. 51: 0,1 mmol/l Methionin und 10 mM DHPNO₂ in 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4) plus ET wurden 1 min, 5 min, 10 min oder 120 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen mit Azid wurde ET per LC-MS/MS gemessen. Die Graphen zeigen eine angepasste Exponentialfunktion. Graph: Dirk Gründemann

3.8.5 Hemmung der Produktion von Methioninsulfoxid aus Methionin und ¹O₂ durch ET und andere Quencher

In Kapitel 3.8.3 wurde gezeigt, dass ET im einfachen Puffersystem mit der Zeit verbraucht wird. Die Hemmwirkung von ET nimmt somit über die Zeit ab. Der Vergleich der Hemmwirkung von ET mit anderen potentiellen ¹O₂-Quenchern wurde daher in weiteren Experimenten bei einer kürzeren Reaktionsdauer durchgeführt.

In dem hier präsentierten Versuch wurden 0,1 mmol/l Methionin in Gegenwart

der getesteten Quencher mit 10 mmol/l DHPNO₂ für 1 min inkubiert. Abb. 52(A) zeigt die Rohdaten aus einem Einzelexperiment mit ET und GSH. ET in hoher Konzentration hemmte hier 88 % der MSO-Produktion. Der kleine Rest an MSO entsteht offenbar auf anderem Wege, denn das in Abwesenheit von DHPNO₂ gebildete MSO entsprach ca. 80 % des Restes (Daten nicht gezeigt). Abb. 52(B) zeigt den Stern-Volmer-Plot der gepoolten Daten aus Experimenten an 3 verschiedenen Tagen ($n = 4-6$; Mittelwert \pm SEM). S_0 und S stehen für das ohne und mit Quencher produzierte MSO, K_{SV} ist die Stern-Vollmer-Konstante und $[Q]$ die eingesetzte Quencherkonzentration.

$$\frac{S_0}{S} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

(Gleichung 10)

Die Steigung der Geraden ist proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Quencher und ¹O₂ bzw. umgekehrt proportional zum K_i -Wert.

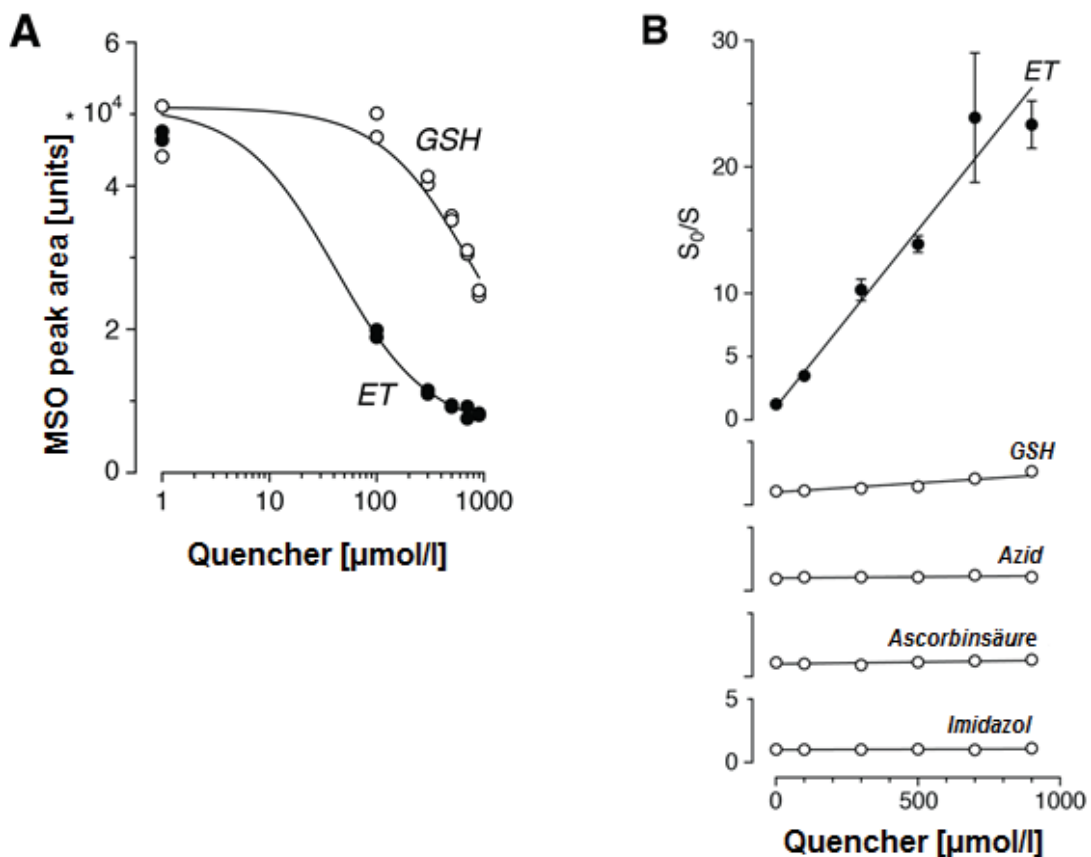


Abb. 52: Hemmung der Produktion von Methioninsulfoxid aus Methionin und ¹O₂ durch ET und andere Quencher. Die Ansätze (Details s. Abb. 49) plus Quencher wurden 1 min bei 37 °C inkubiert. A: Rohdaten aus einem Einzelexperiment. B: Stern-Volmer-Plot der gepoolten Daten aus Experimenten an 3 verschiedenen Tagen ($n = 4-6$; Mittelwert \pm SEM). Graph: Dirk Gründemann

ET war in diesem *in-vitro*-Test (Reaktionsdauer = 1 min) genau 20 mal potenter als GSH. Anders ausgedrückt konnte 1 mmol/l ET das Methionin praktisch vollständig schützen während GSH die Reaktionsgeschwindigkeit nur etwa auf die Hälfte reduzierte. Azid, Ascorbinsäure und Imidazol hatten in dem gleichen Experiment praktisch keine Wirkung (siehe Abb. 52(B)). Histidin wurde bei einer Inkubationszeit von 5 min getestet und zeigte keine Hemmwirkung auf die MSO-Produktion (Daten nicht gezeigt).

3.9 Intrazelluläre Quantifizierung des schützenden Effekts von ET auf $^1\text{O}_2$

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des quenchenden Effekts von Ergothionein gegenüber Singulett-Sauerstoff in der lebenden Zelle. Mit DHPNO₂ wurde ein methodisches System etabliert, dass intrazellulär exklusiv nur $^1\text{O}_2$ freisetzt und MSO konnte als Marker identifiziert werden, um den durch Singulett-Sauerstoff entstandenen Schaden zu quantifizieren. In weiteren Schritten wurde mittels des steuerbaren pEBTetD-Expressionssystems (siehe 2.5.1) gezielt Ergothionein in Effektzellen akkumuliert, um so einen möglichen Effekt auf Singulett-Sauerstoff zeigen zu können.

In Abb. 53(A) ist das durch DHPNO₂ generierten Singulett-Sauerstoff entstandene Methioninsulfoxid dargestellt. In den *ETTh*-exprimierenden Zellen (*ETTh*+) lag die ET-Konzentration nach einstündiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ in KRH bei 37 °C bei 8025 ± 181 pmol/l pro mg Protein wohingegen die nicht-*ETTh*-exprimierenden Zellen (*ETTh*-) nahezu kein ET aufgenommen hatten ($2,2 \pm 0,1$ pmol/l pro mg Protein). Die Anwesenheit von Ergothionein (*ETTh*+) hemmt die $^1\text{O}_2$ -bedingte MSO-Bildung signifikant um den Faktor 3 (*ETTh*-: $22,5 \pm 0,3$ pmol/mg; *ETTh*+: $7,3 \pm 0,2$ pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 4$). Abb. 53(B) zeigt die Kontrolle mit deaktiviertem DHPNO₂ (*DHPN**), was zuvor für 2 h bei 50 °C erhitzt wurde. Die Gesamtmenge an produziertem MSO lag geringer vor, aber dennoch war ein ET-Effekt messbar

(*ETTh*-: $2,5 \pm 0,1$ pmol/mg; *ETTh*+: $0,7 \pm 0,1$ pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 4$).

Die dargestellten Resultate zeigen eine intrazelluläre Hemmwirkung von ET auf die MSO-Produktion. Das bedeutet, dass ET in der lebenden Zelle einen schützenden Effekt gegenüber Singulett-Sauerstoff hat. In beiden Ansätzen konnte keine Abnahme des intrazellulären ET-Gehaltes nach Ablauf des Versuchs gemessen werden (Daten nicht gezeigt), was einen Hinweis auf eine Regeneration von ET in der Zelle, im Gegensatz zur Pufferlösung (siehe 3.8.4) liefert.

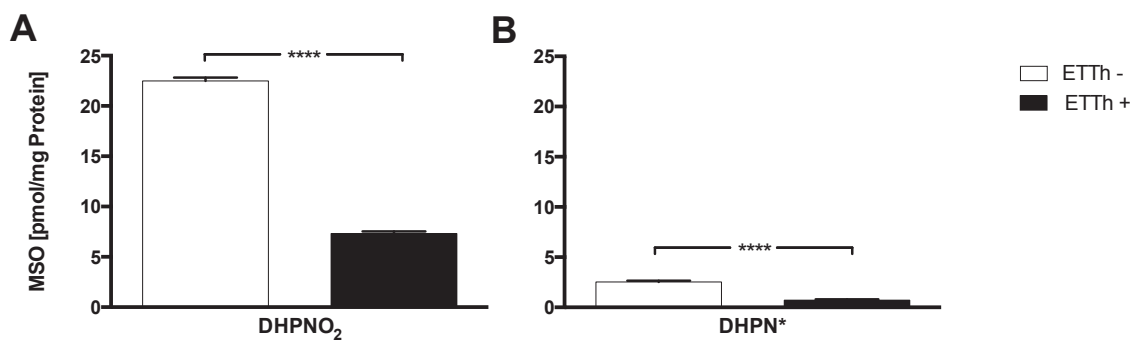


Abb. 53: Intrazelluläre Hemmung der MSO-Produktion durch Ergothionein. Zellen mit und ohne Expression von *ETTh* wurden bereitgestellt und 1 h mit $100 \mu\text{mol/l}$ ET vorbeladen. Durch Waschen mit KRH wurde extrazelluläres ET entfernt. Die thermolytische $^1\text{O}_2$ -Freisetzung fand über 2 h mit 10 mmol/l DHPNO₂ bzw. DHPN* bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre statt. Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurden MSO und ET per LC-MS/MS gemessen und mittels des BCA-Tests (siehe 2.5.6) normiert (Mittel \pm SEM; $n = 4$).

3.10 Quantifizierung der intrazellulären Hemmung der MSO-Produktion durch $^1\text{O}_2$ -Quencher intrazellulär

In Kapitel 3.9 konnte der schützende Effekt von Ergothionein in der lebenden Zelle auf Singulett-Sauerstoff gezeigt werden. Um diesen Effekt mit dem Effekt von bereits bekannten Singulett-Sauerstoff-Quenchen zu vergleichen, wurden im Folgenden nicht-transfizierte HEK-293-Zellen mit Ascorbinsäure, Natriumazid und Imidazol inkubiert und der MSO-Anstieg nach Singulett-Sauerstoff-Erzeugung gemessen. Zusätzlich wurde der intrazelluläre Gehalt dieser

Quencher bestimmt. In dem in Abb. 54 abgebildeten Experiment wurde den Zellen kein GSH zugesetzt, da der physiologische GSH-Gehalt bereits im millimolaren Bereich liegt. Der intrazelluläre Gehalt wurde allerdings trotzdem bestimmt: Da GSH oxidationsempfindlich ist, wurde es nach vorrausgehender Derivatisierung mit Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) über eine sogenannte Null-Punkt-Bestimmung ermittelt. Das bedeutet, dass für jeden Messwert eine separate Kalibriergerade mit $n = 3$ Messpunkten erstellt wird, indem GSH in entsprechenden Konzentrationen der Probe zugegeben wird. Der Nullwert, welcher der Probe entspricht, der keine Referenzsubstanz zugesetzt wurde, wird extrapoliert. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht mit einem $^1\text{O}_2$ -Quencher vorinkubiert wurden und somit die ungehemmte MSO-Produktion zeigten (siehe Abb. 54(A)). Es wurden sowohl die mit aktivem (DHPNO_2), als auch die mit deaktiviertem DHPNO_2 (DHPN^*) behandelten Zellen mit dem Quencher in entsprechender Konzentration inkubiert, wobei für jede Verbindung eine eigene DHPN^* -Kontrolle mitgeführt wurde. Die gemessenen Ergebnisse wurden mittels des BCA-Assays normiert und die intrazellulären MSO-Konzentrationen in pmol/mg pro Protein angegeben. Um die Hemmwirkung der unterschiedlichen Verbindungen zu vergleichen, wurden die Differenzen zwischen der jeweiligen gemessenen MSO-Produktion mit den unbehandelten Kontrollzellen (DHPN^* : $14 \pm 0,2$ pmol/mg; DHPNO_2 : 45 ± 2 pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 4$, siehe Abb. 54(A)) gebildet. Für die Zellen, denen kein zusätzlicher Quencher zugesetzt wurde und bei denen davon ausgegangen wird, dass GSH der dominierende physiologische intrazelluläre Quencher ist betrug die Differenz 4,5 (DHPN^* : 28 ± 3 pmol/mg; DHPNO_2 : 63 ± 4 pmol/mg; $p = 0,0005$, ungepaarter t-Test, $n = 4$, siehe Abb. 54(D)). Im Vergleich dazu zeigte Natriumazid in diesem Experiment eine um den Faktor 2 bessere intrazelluläre Schutzwirkung gegenüber Singulett-Sauerstoff mit einer Differenz von 2,2 (DHPN^* : $9 \pm 0,5$ pmol/mg; DHPNO_2 : 31 ± 1 pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 4$, siehe Abb. 54(E)). Dieses Resultat überrascht nicht, da Azid, ein bekannter potenter in-vitro- $^1\text{O}_2$ -Quencher ist und die lange Inkubationszeit von 120 min zu Gunsten der zunehmenden Hemmpotenz über die Zeit dieses Quenchers ist (siehe Abb. 50) [103]. Imidazol hatte eine Differenz von 2,9 (DHPN^* : $7 \pm 0,1$ pmol/mg; DHPNO_2 : 40 ± 1 pmol/mg; $p < 0,0001$, ungepaarter t-Test, $n = 4$, siehe Abb. 54(C)). Das

bedeutet, dass die Hemmpotenz in diesem dargestellten Experiment von Imidazol schlechter war als von Natriumazid, aber geringfügig besser als in dem Ansatz, in dem GSH allein vorliegt. Für Ascorbinsäure ergab sich eine Differenz von 0,8 ($DHPN^*$: 15 ± 1 pmol/mg; $DHPNO_2$: 11 ± 1 pmol/mg; $p = 0,03$, ungepaarter t-Test, $n = 4$, siehe Abb. 54(B)). Damit zeigte Ascorbinsäure in diesem Ansatz die beste intrazelluläre Hemmwirkung gegenüber Singulett-Sauerstoff. Durch die Inkubation der Zellen über 1 h mit nur 100 $\mu\text{mol/l}$ Ascorbinsäure wurde die durch Singulett-Sauerstoff bedingte MSO-Produktion vollständig gehemmt.

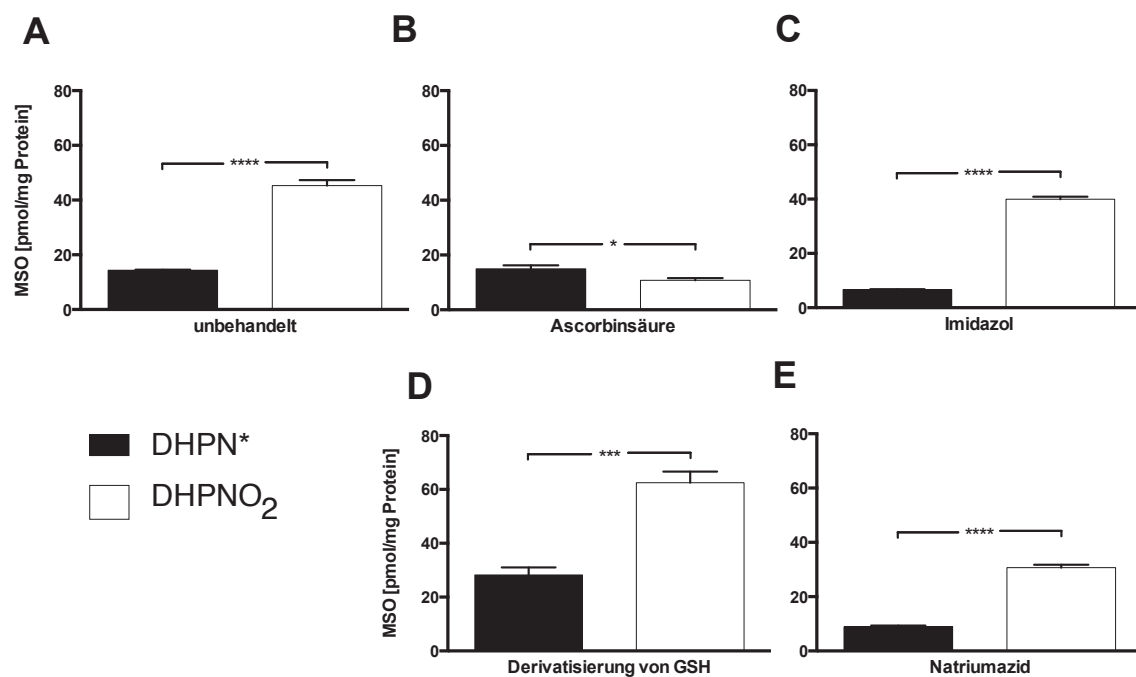


Abb. 54: Intrazelluläre Hemmung der MSO-Produktion durch $^1\text{O}_2$ -Quencher. Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden bereitgestellt und 1 h mit A, D: KRH-Puffer, B: 100 $\mu\text{mol/l}$ Ascorbinsäure (AS), C: 30 mmol/l Imidazol, E: 30 mmol/l Natriumazid (NaN_3) inkubiert. Durch Waschen mit KRH wurden extrazellulär vorliegende Quencher entfernt. Die thermolytische $^1\text{O}_2$ -Freisetzung fand mit 10 mmol/l $DHPNO_2$ bzw. $DHPN^*$ über 2 h bei 37 $^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre statt. Nach der Lyse mit 1 ml Methanol wurden MSO, AS, Imidazol, GSH (nach Derivatisierung) und NaN_3 per LC-MS/MS gemessen und mittels des BCA-Tests (siehe 2.5.6) normiert (Mittel \pm SEM; $n = 4$).

Parallel wurde die intrazelluläre Konzentration der in diesem Experiment dargestellten Quencher überprüft, um sicherzustellen, dass sie die Zellmembran erfolgreich passiert haben, um mit dem durch $DHPNO_2$ thermolytisch freigesetzten $^1\text{O}_2$ in Kontakt treten zu können. Der intrazelluläre Gehalt von

Imidazol in Zellen, die für 1 h mit 30 mmol/l Imidazol beladen wurden betrug $8,8 \pm 5,7 \cdot 10^4$ pmol/mg pro Protein im Vergleich zu 4480 ± 699 pmol/mg pro Protein in Zellen, die für 1 h in reinem KRH-Puffer inkubiert wurden. Ascorbinsäure lag in den für 1 h mit 100 μ mol/l mit Ascorbinsäure inkubierten Zellen in einer Konzentration von 3962 ± 1825 pmol/mg pro Protein vor. In den in reinem KRH-Puffer inkubierten Zellen konnte Ascorbinsäure in einer Konzentration von 13 ± 8 pmol/mg pro Protein gemessen werden. In dem hier vorliegenden Datensatz konnte ein konstantes GSH-Level innerhalb aller Kontrollgruppen ermittelt werden. Die mit DHPNO₂ gestressten Zellen wiesen einen GSH-Gehalt von $0,43 \pm 0,02$ pmol/mg pro Protein auf und die unbehandelten Zellen hatten einen GSH-Gehalt von $0,28 \pm 0,06$ pmol/mg pro Protein. Die erhöhte GSH-Konzentration in DHPNO₂-exponierten Zellen widerspricht der Theorie, dass GSH nach der Reaktion analog zu ET verbraucht wird. Es könnte sich aufgrund der Oxidationsemfindlichkeit von GSH um Messungenauigkeiten handeln oder GSH wurde intrazellulär kompensatorisch hochreguliert. Für Natriumazid war es nicht möglich, eine geeignete massenspektrometische Methode zu entwickeln, so dass davon ausgegangen wird, dass das Molekül aufgrund seiner geringen Größe die Zellmembran über freie Diffusion passiert hat.

4 DISKUSSION

Die Tatsache, dass der spezifische Transporter für Ergothionein (ETT) [20], der, soweit bekannt, in allen Vertebraten vorhanden ist, evolutionär konserviert wurde, spricht für eine überlebensfördernde Eigenschaft. Es gibt einige wenige *in-vitro*-Untersuchungen, die auf antioxidative Funktionen hindeuten, sich aber nur bedingt mit komplexen zellulären Systemen vergleichen lassen. Zudem existieren *in-vivo*-Studien mit einer *ETT*-Knockout-Maus [24, 25], die allerdings bis zum heutigen Zeitpunkt keine signifikanten Erkenntnisse hervorgebracht haben, und mit einem in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten *ETT*-Knockout-Zebrafisch. Das Knockout-Zebrafisch-Modell zeigte keine Unterschiede im Phänotypen zwischen Wildtyp und *ETT*-Knockout-Fisch, lieferte aber auf molekularer Ebene Konzentrationsunterschiede diverser Verbindungen in unterschiedlichen Geweben. Der Hauptbefund war der erhöhte Gehalt von 8-Oxoguanin (8OG) in der Haut des Knockout-Fisches. 8-Oxoguanin und die 8OG-Nukleoside 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (8OdGuo) und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8OdG) sind Marker für oxidative Schäden der DNA bzw. RNA. Da Singulett-Sauerstoff exklusiv die Guaninbasen oxidiert und weil die hohen Gehalte an 8OG in Geweben mit hoher *ETT*-Expression gefunden wurden, wurde in dieser Arbeit die Singulett-Sauerstoff-schützende Wirkung von *ET* untersucht.

Ausgehend von Mutationen im *SLC22A4*-Gen, den damit assoziierten Krankheiten (siehe 1.3) und *ET*-bedingten Veränderungen von Signalkaskaden wurden eine Reihe von möglichen Hypothesen zur physiologischen Funktion von *ET* aufgestellt (siehe Abb. 3). Am besten belegt sind die antioxidativen und cytoprotektiven Eigenschaften von *ET* [12, 104-106]. Übereinstimmend damit deutet das Expressionsmuster von *ETT* (siehe Abb. 2) auf eine hohe *ET*-Akkumulation in Geweben mit hoher Exposition zu oxidativem Stress hin. Dazu zählen z. B. Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen, Augen, Haut und Seminalplasma [20]. Dass *ET* neben den ubiquitären Antioxidantien in z. B.

Hautzellen, die hohem oxidativem Stress, z. B. durch UV-Strahlung ausgesetzt sind, vorkommt, deutet auf eine exklusive Wirkweise der Verbindung hin. Die strukturelle Verwandtschaft zum 8OG, das primär durch Singulett-Sauerstoff-Angriff gebildet wird, spricht für eine analoge Reaktion von ET.

Um den Effekt von Ergothionein auf Singulett-Sauerstoff untersuchen zu können, wurden zunächst Methoden entwickelt, mit denen Singulett-Sauerstoff intrazellulär erzeugt werden konnte. Dabei brachten die unterschiedlichen Prinzipien der $^1\text{O}_2$ -Erzeugung unterschiedliche Vor- und Nachteile mit sich, die es zu berücksichtigen galt. Außerdem stellte sich 8OG aufgrund von geringer Detektierbarkeit und der 100 Mal schnelleren Weiterreaktion mit $^1\text{O}_2$ im Zellsystem als schlechter Quantifizierungsmarker für den entstandenen $^1\text{O}_2$ -Schaden heraus, weshalb nach geeigneteren Markern gesucht wurde.

4.1 Experimentelle Singulett-Sauerstoff-Erzeugung

Bei der Singulett-Sauerstoff-Generation mittels Photosensibilisatoren werden, abhängig von den gegebenen Bedingungen in der Lösung (z. B. dem pH-Wert), parallel auch andere reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), wie Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^- \cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), produziert (siehe Abb. 13). Mit einer Reaktionszeit von 10 ns ist das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) deutlich reaktiver als Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hat eine so lange Lebensdauer, dass es sogar aus der Zelle heraus diffundieren kann [107]. Diese zum Teil höhere Reaktivität und längere intrazelluläre Diffusionsstrecke der gebildeten ROS kann ebenfalls zum Anstieg potentieller Marker von $^1\text{O}_2$ -Reaktionen führen, was die Ergebnisse der durchgeführten Experimente verfälschen kann. Außerdem wird unkalkulierbarer oxidativer Stress im Zellsystem verursacht, der zur Apoptose führen kann. Es ist davon auszugehen, dass Bengal Rosa, wie auch andere Photosensibilisatoren, überwiegend auf Grund der Molekülgröße und hohen Lipophilie passiv in die Zellmembran hineindiffundieren, dort verbleiben und nur wenige Moleküle frei im Zytosol ankommen [108]. Dies würde insofern ein Problem darstellen, als dass

die Lebenserwartung und damit die Diffusionsstrecke von $^1\text{O}_2$ begrenzt sind und es mit dem zytosolisch vorliegenden Ergothionein und anderen potentiellen Scavengern nicht in Kontakt käme. Die Zelle ist der fehlgesteuerten $^1\text{O}_2$ -Freisetzung schutzlos ausgeliefert. Durch die Einlagerung der Verbindung wird die intakte Membran destabilisiert, was dazu führt, dass das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die gemessenen Prolinwerte anhand dessen die Menge überlebender Zellen quantifiziert wurde spiegelte die Belastung durch Photosensibilisator-Inkubation und Belichtung wider.

Bengal Rosa Diacetat ist wegen der zweifachen Acetylierung hydrophiler als das unmodifizierte Bengal Rosa und gelangt mit höherer Wahrscheinlichkeit in das Zellinnere. Nach dem Prodrug-Prinzip ist gewährleistet, dass erst intrazellulär, nach Überführung der inaktiven in die aktive Form durch enzymatische Abspaltung der Acetylgruppen, $^1\text{O}_2$ erzeugt wird. Die Verbindung ist in Lösung farblos, jedoch konnte eine Rosafärbung der lysierten Zellen beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht für eine erfolgreich stattgefundene Decarboxylierung. Sowohl die Prolinmessung als auch die mikroskopische Betrachtung der Zellen zeigten, dass die Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat und anschließender Belichtung nicht zu einem vermehrten Zellsterben im Vergleich zur Kontrolle geführt hat.

Eine Verbindung, die den Farbstoffen in diesen und anderen Punkten weit überlegen ist und deshalb in dieser Arbeit von großer Relevanz war, ist das Endoperoxid von N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid. Mit diesem System wird in der Kälte Singulett-Sauerstoff angelagert, der als Endoperoxid in die Zellen diffundiert und dort gezielt durch Thermolyse freigesetzt wird. Der entscheidende Vorteil dieses Systems ist, dass neben der exklusiven $^1\text{O}_2$ -Freisetzung (Typ-II-Reaktion) keine anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies (Typ-I-Reaktion) freigesetzt werden (siehe Abb. 13). Die Verbindung ist zwar, nachdem der Sauerstoff abdissoziiert ist, chemisch inert, jedoch enthält die Lösung trotz zweifacher Säulenchromatographie Restmengen von Methyleneblau (Methyleneblau diente zur $^1\text{O}_2$ -Erzeugung während der Beladung von DHPN zu DHPNO₂). Aus diesem Grund wurden die Spektren-

Vergleiche der Differenz-Abtönung und die Signifikanztests der Quantifizierungen unterschiedlicher Verbindungen mit zuvor bei 50 °C deaktiviertem DHPNO₂ (DHPN*) durchgeführt. Im Gegensatz zu den Photosensibilisatoren, mit denen abhängig von der Belichtungsdauer unbegrenzt ¹O₂ produziert werden kann, ist die ¹O₂-Produktion mit DHPNO₂ erschöpflich. Dadurch, dass außer ¹O₂ keine anderen reaktiven Sauerstoffspezies erzeugt werden und die Zellen keiner Belichtung unterzogen werden, ist das Verfahren für Zellen im Vergleich zur Photosensibilisatorbehandlung aber erheblich schonender. Quantifiziert wurde das Zellsterben in dieser Arbeit anhand des gemessenen Prolinwertes, der mit der Anzahl überlebender Zellen korreliert, bzw. anhand des Proteinwertes, der mit dem BCA-Assay (siehe 2.5.6) bestimmt wurde. Detailliert ist die Proteinnormierung in Kapitel 2.8.3 beschrieben. Um die Ausbeute an ¹O₂ intrazellulär zu erhöhen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen zuvor für 1 h bei 4 °C mit dem Endoperoxid inkubiert wurden. Die Ergebnisse dieser Prüfung (Daten nicht gezeigt) bestätigen die Beobachtungen von Ravanat et al., die aussagen, dass die Vorinkubation bei 4 °C keinen Effekt hat [109]. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Zellmembran bei tiefen Temperaturen so rigide ist, dass eine freie Diffusion des Endoperoxids nicht mehr möglich ist.

4.2 Quantifizierungsmarker für Singulett-Sauerstoff-Schaden

4.2.1 8-Oxoguanin

8-Oxoguanin (8OG) und die 8OG-Nukleoside 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin und 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin sind Marker für oxidative Schäden der DNA und RNA. In den Gewebelysaten der Knockout-Zebrafische wurden im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Level besonders in den Geweben mit starker Ergothionein-Transporter-Expression gemessen. Die elektrophilen Guaninbasen sind priorisierte Angriffspunkte von Singulett-Sauerstoff, aber ihre Oxidationsprodukte reagieren um den Faktor 100 schneller mit ¹O₂ als die Ausgangsverbindung [91]. In Abb. 55 ist die Abnahme der Konzentration von Guanosin im Vergleich zu 8-Oxoguanosin dargestellt.

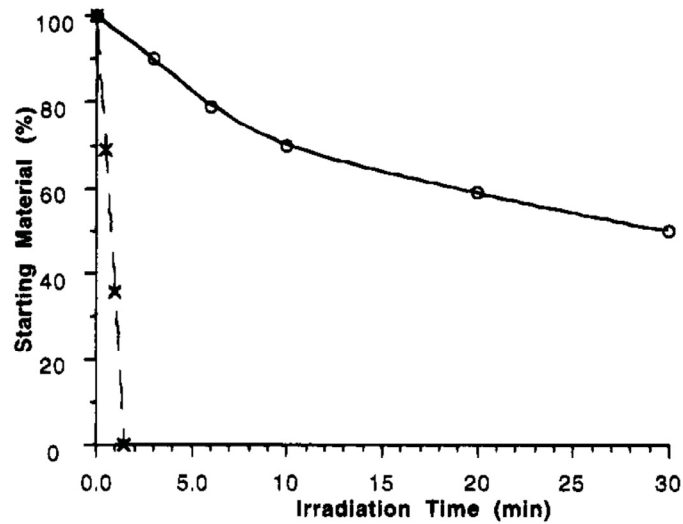


Abb. 55: Abnahme der 1: Guanosin-Derivate (○) und 2: 8-Oxoguanosin-Derivate (×) relativ zur Anfangskonzentration. 1: $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l; 2: $5,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l; TPP als Photosensibilisator $6,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. [91]

Die postulierten stabilen Oxidationsprodukte der Reaktion von ungebundenen Guanin-Derivaten und $^1\text{O}_2$ sind Spiroiminodihydantoin und Oxazolone (Abb. 56). DNA-gebundene Guanin-Derivate reagieren mit $^1\text{O}_2$ über das instabile Dehydroguanidinohydantoin (Gh^{Ox}) zu Oxalursäure (engl.: Oxaluric acid).

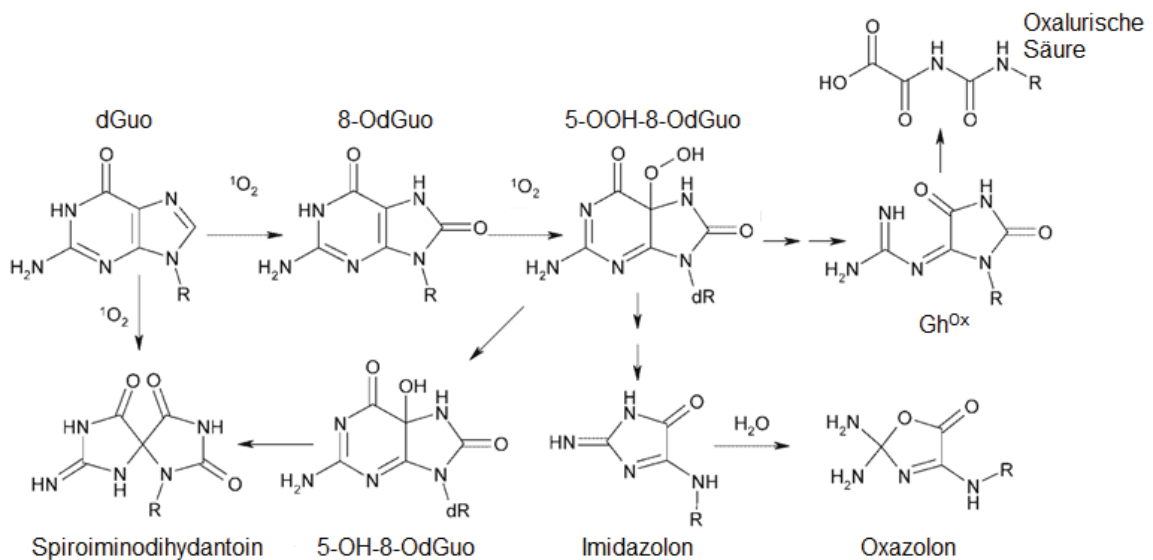


Abb. 56: Hauptoxidationsprodukte nach Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin. Das Haupt-Oxidationsprodukt von DNA-gebundenem 8OdGuo ist Oxalursäure. [12]

Die intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung nach Inkubation der Zellen mit Bengal Rosa und anschließender Belichtung mit sichtbarem Licht konnte die Resultate aus

dem Knockout-Zebrafisch-Modell bestätigen. Diese Resultate geben den Hinweis darauf, dass die ET-Produzenten (Cyanobakterien, Bakterien und Pilze) ET zum Schutz vor Singulett-Sauerstoff, der bei der Photosynthese entsteht und durch UV-Strahlung zum Schutz der DNA synthetisieren [110, 111].

Adversativ zu den signifikant erhöhten 8OG-Gehalten wurde ein verminderter Prolingehalt, der mit der Anzahl überlebender Zellen korreliert, in den mit Bengal Rosa inkubierten und bestrahlten Zellen gemessen. Die Zellen, die mit dem Farbstoff inkubiert, aber im Dunkeln gehalten wurden, zeigten keine verminderten Prolinwerte im Vergleich zur Kontrolle. Nach neuen Erkenntnissen von Signorelli et al. wird Prolin nicht durch $^1\text{O}_2$ oxidiert [142]. Es sollte jedoch trotzdem genau geprüft werden, ob Prolin bei den Methoden, bei denen Photosensibilisatoren zur $^1\text{O}_2$ -Erzeugung zum Einsatz gekommen sind, ein geeigneter Normierungsmarker ist. Die Behandlung mit Bengal Rosa Diacetat hatte keinen Effekt auf die intrazellulären 8OG- und 8OdG-Konzentrationen. Die Guanin-Quantifizierung nach Inkubation mit Bengal Rosa Diacetat und Belichtung bestätigte jedoch, dass $^1\text{O}_2$ und möglicherweise andere ROS erzeugt wurden, die mit Guanin reagiert haben, was zu dessen signifikanter Abnahme geführt hat. In den Kontrollzellen, die mit Bengal Rosa Diacetat inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden, ist ebenfalls eine Guaninabnahme nachgewiesen worden. Diese Abnahme kann dadurch bedingt sein, dass die Zellen während der experimentellen Durchführung (Waschen, Transport) nicht zu 100 % vor Tageslicht geschützt waren (eine Lichtexposition wurde weitestgehend vermieden).

Es ist bekannt, dass Erythrozyten zu 96 % (Trockenmasse) aus Hämoglobin bestehen. Die Tatsache, dass Hämoglobin, sofern es kein Fe^{2+} -Ion gebunden hat [112] einen physiologischen Photosensibilisator darstellt, der bei Kontakt mit Licht entsprechender Wellenlänge Singulett-Sauerstoff freisetzt, könnte den hohen Bedarf an Ergothionein in den Erythrozyten erklären. Zusätzlich wurde für Hämoglobin eine Peroxidase-Aktivität nachgewiesen [113-115]. In Monozyten und Makrophagen erzeugen Peroxidasen reaktive Sauerstoff-Spezies zum Schutz vor Mikroben und Tumorzellen ("respiratory burst") [75, 116, 117]. Auf

diesem Weg entsteht als Nebenprodukt Singulett-Sauerstoff. Dies liefert auch eine mögliche Erklärung für den hohen ET-Bedarf in Immunzellen [31]. Die wichtige Funktion von ET in Erythrozyten sollte genauer untersucht werden, in dem Hämoglobin aus humanen Erythrozyten isoliert und $^1\text{O}_2$ in Gegenwart von ET und anderen Quenchern inkubiert wird. Die gefällten, oxidierten Peptide im Hämoglobin könnten als Marker per LC-MS/MS detektiert werden. Dieses Verfahren wurde bereits bei der Inkubation von Hämoglobin mit H_2O_2 und Nitrit angewendet [118, 119].

Unter den genannten Aspekten sind Porphyrine mit struktureller Verwandtschaft zum Hämoglobin bzw. Hämoglobinvorstufen, wie 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Protoporphyrin IX (PPIX), für Untersuchungen der Reaktivität zwischen $^1\text{O}_2$ und ET besonders interessant. Aber obwohl die $^1\text{O}_2$ -Erzeugung mittels Protoporphyrin IX (PPIX) und Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin-tetratosylat (TMPyP) an anderer Stelle eindeutig belegt ist, konnte keine Konzentrationserhöhung des 8OG- und 8OdG-Gehalts in unseren mit diesen Porphyrinen durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden [77, 120, 121]. Diese Beobachtung kann ebenfalls durch die um den Faktor 100 schnellere Weiterreaktion der Oxidationsprodukte begründet werden.

Im Vergleich zu den mit TMPyP gestressten Zellen war das intrazelluläre Niveau von 8OdG nach Inkubation der Zellen mit PPIX und Belichtung geringer. Dies könnte daran liegen, dass sich TMPyP, wie konfokale Fluoreszenzmikroskopie gezeigt hat [122], im Nukleus lokalisiert und der freigesetzte $^1\text{O}_2$ daher tendenziell die in die DNA eingebauten Guanosenbausteine angreift. PPIX liegt zytosolisch vor und der auf diese Weise entstandene $^1\text{O}_2$ erreicht mit höherer Wahrscheinlichkeit das im Zytosol vorhandene Guanin [77]. Es ist zu beachten, dass die Belichtung mit UVA-Licht (385 nm) über einen Zeitraum von 20 min enormen intrazellulären oxidativen Stress verursacht. In vergleichbaren Experimenten konnten bereits nach 3 min durch UV-Strahlen entstandene ROS nachgewiesen werden [123]. Die belichteten Zellen zeigten eine vergleichbare Proteinabnahme wie die mit den Porphyrinen inkubierten Zellen. Nach der Belichtung lag der Anteil vitaler Zellen nur noch bei 50 %.

Porphyrine sind, wie auch Bengal Rosa, große, lipophile Strukturen, die sich möglicherweise ebenfalls in der Zellmembran einlagern. Um diese Diffusionsbarriere zu umgehen, wurde 5-Aminolävulinsäure (ALA) eingesetzt. ALA ist eine kleine, im ungeladenen Zustand lipophile Verbindung, die mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Zellmembran verbleibt, sondern zu einem gewissen Maß das Zytosol erreicht. HEK-293-Zellen sind mit allen für die PPIX-Synthese erforderlichen Enzymen ausgestattet und somit sollte ausgehend vom derzeitigen Forschungsstand nach einer Inkubationszeit von 4 h ausreichend wirksames PPIX gebildet worden sein [107]. Die Versuchsergebnisse belegen, dass es zu keiner intrazellulären Akkumulation von ALA in den Zellen nach Inkubation gekommen ist. Möglicherweise ist ALA wegen seiner hydrophilen Eigenschaften im protonierten Zustand nicht in die Zellen hineindiffundiert, wodurch die Voraussetzungen für eine PPIX-Synthese und die daraus resultierende Singulett-Sauerstoff Produktion nach Belichtung nicht gegeben sind.

Anscheinend waren die Reaktionsbedingungen in den Gewebelysaten der Knockout-Zebrafische nicht ideal für eine Weiterreaktion von 8OG mit $^1\text{O}_2$. In dieser Arbeit wurden auch Lyseversuche der mit $^1\text{O}_2$ gestressten HEK-293-Zellen mit Ammoniak, NaOH und HClO_4 durchgeführt, um zu prüfen, ob die unterschiedlichen Lysebedingungen bzw. pH-Werte einen Einfluss auf die Quantifizierbarkeit der 8OG-Konzentrationen haben. Das Ergebnis ist, dass die Detektierbarkeit unter den Standardlysebedingungen dieser Arbeit in Methanol, wahrscheinlich aufgrund von Ionensuppressionseffekten der anderen Lysemittel, am besten geeignet ist (Daten nicht gezeigt). Hohe ET-Gehalte im Seminalplasma, nachgewiesen in Schwein und Pferd, dienen vermutlich dem Schutz der DNA in Spermatozyten [124]. Deshalb wurden mit dem GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific Deutschland) DNA-Extraktionsversuche mit anschließender enzymatischer Zerlegung in die einzelnen DNA-Bausteine unternommen (Daten nicht gezeigt). Die Isolation oxidierter Guanosinbausteine stellt eine etablierte Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden dar [109]. In dieser Arbeit konnten keine erhöhten 8-Oxoguanosin-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle mit dieser Methode

nachgewiesen werden. Eine weitere Methode, um DNA-Strangbrüche, z. B. aufgrund von oxidativen Schäden, nachzuweisen, ist der Comet-Assay [125]. Da diese Methode allerdings unspezifisch für 8OG- bzw. 8OG-Nukleoside ist, wurde sie nicht verwendet. Desweiteren wurden, da die postulierten Oxidationsprodukte von 8OG bzw. 8OdG kommerziell nicht erhältlich sind, von 1 µg/ml Guanin und Guanosin massenspektrometrische Analysen nach Inkubation mit 10 mmol/l bzw. 30 mmol/l DHPNO₂ mit einem Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL in der Arbeitsgruppe Schäfer, Department für Chemie, Universität zu Köln, durchgeführt. Es war geplant, die Hauptoxidationsprodukte der Lysate zu identifizieren und zu synthetisieren, um sie dann sicher in den Zelllysaten quantifizieren zu können. Die Analyse mittels Orbitrap-Analysator lieferte keine brauchbaren Ergebnisse.

4.2.2 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF)

In einer Arbeit von Dahl et al. wurde 2,5-Bis-(hydroxymethyl)-furan (BHMF) als unphysiologischer Reaktionspartner für ¹O₂ intrazellulär eingesetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass ET durch Bengal Rosa plus Belichtung freigesetzten ¹O₂ in einer Reaktion erster Ordnung im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 5 besser gequenchet hat und im Vergleich zu Azid doppelt so effektiv war. In der hier vorliegenden Arbeit konnte BHMF nicht als extern zugeführter ¹O₂-Reaktionspartner für die Quantifizierung des oxidativen Schadens verwendet werden. Das Reaktionsprodukt ließ sich aufgrund einer mangelhaften Ionisierbarkeit massenspektrometrisch nicht detektieren und, um eine Abnahme der Ausgangsverbindung zu messen, war der Umsatz zu gering.

4.2.3 Kynurenin

Das Haupt-Reaktionsprodukt von Tryptophan mit Singulett-Sauerstoff ist Kynurenin [1, 126]. In unterschiedlichen Experimenten konnte der Effekt nicht immer valide reproduziert werden. Möglicherweise ist es zum Teil zur Stabilisierung der Intermediate, z. B. N-Formylkynurenin, gekommen, die

massenspektrometrisch nicht erfasst wurden. Ascorbinsäure ist ein potenter, in der Literatur genannter Singulett-Sauerstoff-Quencher. Auch das in dieser Arbeit gezeigte *in-vivo*-Experiment mit Ascorbinsäure bestätigt, dass nach einstündiger Inkubation mit nur 100 $\mu\text{mol/l}$ bereits eine vollständige Quenchung von Singulett-Sauerstoff stattgefunden hat (siehe Abb. 54). Das Nährmedium der Zellen ist mit fötalem Kälberserum versetzt, was schwankende Ascorbinsäurekonzentrationen enthalten kann. Möglicherweise reichen diese abweichenden Konzentrationen bereits aus, um die Kynurenin-Produktion zu hemmen. In weiterführenden Untersuchungen sollte dies eruiert werden. Aufgrund dieser Inkonsistenz der Ergebnisse wurde dieser Marker für weitergehende Untersuchungen der Interaktionen von ET mit $^1\text{O}_2$ nicht berücksichtigt. Zudem zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Kynureninergehalte in ausgewählten Organen (Haut, Auge, Darm, Muskel) beim Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Zebrafischen (nicht veröffentlichte Daten).

4.2.4 Methioninsulfoxid

Methioninsulfoxid (MSO), das Reaktionsprodukt von Methionin und Singulett-Sauerstoff [127], akkumulierte, wie Abb. 49 zeigt, fast mit der Geschwindigkeit ($t_{1/2} = 26$ min), mit der laut Literatur $^1\text{O}_2$ aus DHPNO_2 bei 37°C bereitgestellt wird ($t_{1/2} = 23$ min) [79]. Das bedeutet, dass MSO hier ganz überwiegend aus der Reaktion von Methionin mit $^1\text{O}_2$ entsteht. Es ist belegt, dass $^1\text{O}_2$ in D_2O eine längere Lebensdauer hat [74]. Dass es bei der Inkubation der Reaktionspartner in schwerem Wasser zu einer Steigerung der MSO-Bildung um den Faktor 1,5 gekommen ist, bestätigt ebenfalls die These, dass MSO in den gezeigten Experimenten nahezu zu 100 % durch die Reaktion von Methionin mit $^1\text{O}_2$ entsteht. In Lysaten von Zebrafisch-Homogenaten konnte kein erhöhter MSO-Gehalt bei Wildtyp- oder Knockout-Fischen festgestellt werden. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Lysate zum Zeitpunkt der Messung bereits über mehrere Jahre bei -80°C eingefroren waren und ggf. Alterungsprozesse stattgefunden haben.

4.3 *In-vitro*-Versuche

In den *in-vitro*-Versuchen wurde Methionin mit DHPNO₂ in Gegenwart von ET und anderen potentiellen Singulett-Sauerstoff-Quenchern inkubiert und die MSO-Produktion massenspektrometrisch bestimmt.

In anderen *in-vitro*-Arbeiten zeichnet ET sich als Radikalfänger für Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), Hypochlorige Säure (HOCl) und Peroxynitrit (ONOO⁻) aus [105, 128-130]. Mit H₂O₂ und Superoxid-Anionen (O₂⁻·) reagiert ET träge [131]. Es gibt allerdings eine Arbeit von Gokce et al., in der Ergothionein zur Relaxierung der isolierten Rattenaorta durch Superoxid-Anion-Deaktivierung geführt hat [132]. Verglichen mit Glutathion (GSH), Ascorbat oder Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin-E-Analogen, war ET grundsätzlich *in vitro* nicht wirksamer gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [130]. Die schützende Wirkung von ET *in vitro* erklären die Autoren mit unphysiologischen Konzentrationsverhältnissen und postulieren, dass ET nicht am Thiolabwehrsystem beteiligt sei [133].

In dieser Arbeit wurde für die *in-vitro*-Untersuchungen der Reaktion von ET gegenüber ¹O₂ ein geeignetes Puffersystem entwickelt, um zu gewährleisten, dass, wie unter physiologischen Bedingungen, bei zunehmender Konzentration der u. a. sauer reagierenden Quencher, wie z. B. Ascorbinsäure, ein pH-Wert von 7,4 in der Lösung gegeben war. Es konnte gezeigt werden, dass ET *in vitro* eine schützende Wirkung gegenüber ¹O₂ hat und damit werden die Ergebnisse einer Arbeit von Rougee et al., in der die Singulett-Sauerstoff-deaktivierende Wirkung von ET ($k_s = 2,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) präsentiert wurde, bestätigt. Der Autor hat ET ebenfalls mit GSH verglichen und die deutliche Überlegenheit von ET belegt [134]. Die schlechtere Reaktivität von GSH kann dadurch erklärt werden, dass es keinen Imidazolring und keine konjugierten Doppelbindungen aufweist. ET war in dem in dieser Arbeit gezeigten *in-vitro*-Test (Kapitel 3.8.5) genau 20 Mal potenter als GSH. 1 mmol/l ET konnte das eingesetzte Methionin praktisch vollständig schützen, während GSH die Reaktionsgeschwindigkeit nur etwa auf die Hälfte reduzierte. Azid, Ascorbinsäure und Imidazol hatten in dem gleichen Experiment

praktisch keine Wirkung (siehe Abb. 52(B)). Auch ein Test mit Histidin zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Produktion von MSO, was für die Beteiligung des Schwefelatoms im Ergothionein an der Reaktion spricht. Obayashi et. al haben die Reaktivität von Singulett-Sauerstoff und ET in UVA-Licht-exponierten Fibroblasten untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist ebenfalls übereinstimmend mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, wobei die Autoren eine Superoxid-Radikal- ($O_2^- \cdot$) und Singulett-Sauerstoff-quenchede Wirkung von ET annehmen [135]. Unter physiologischen Bedingungen liegt ET in betreffenden Geweben in einer deutlich geringeren Konzentration vor als GSH, Ascorbat, oder Trolox. Die Autoren haben keinen Vergleich der Quenchwirkung von ET und anderen Quenchern gegenüber Superoxid-Radikalen ($O_2^- \cdot$) angestellt und wie andere Untersuchungen *in vitro* belegen, ist ET ein träger Superoxid-Anion-Quencher bzw. anderen Quenchern gegenüber ROS weit unterlegen [130, 131]. Hartman sagt aus, dass ET kein Singulett-Sauerstoff-Quencher sei. Er stützt seine Aussage allerdings auf zwei unterschiedlich aufgebaute Experimente, die zu absolut widersprüchlichen Ergebnissen führten [102]. Die zu dem negativen Ergebnis führende Methode, mittels derer über einen "seperated surface sensitizer (sss)" 1O_2 erzeugt wurde, ist kritisch zu bewerten, da der Quantifizierungsmarker für den entstandenen Singulett-Sauerstoff-Schaden in Gegenwart von ET und Thiolhistidin, im Gegensatz zu Histidin sogar zugenommen hat. Bei der Methode bei der mittels Bengal Rosa und Belichtung 1O_2 erzeugt wurde, quenchte ET um den Faktor 2 besser im Vergleich zu Azid [102].

In der zitierten Arbeit von Dahl et al. konnte ET Singulett-Sauerstoff im Vergleich zu Azid doppelt so effektiv abfangen [102]. In Kapitel 1.5.1 wurden die unterschiedlichen Prinzipien des Quenchmechanismus vorgestellt. Azid ist ein potenter physikalischer Singulett-Sauerstoff-Quencher [103], aber nach derzeitigem Verständnis fällt ET in die Kategorie der chemischen Quencher. Die in Abb. 51 dargestellten Resultate zum ET-Verbrauch bei niedrigen Konzentrationen bekräftigen diese Theorie. Nach 10 min war nur noch die Hälfte der initialen ET-Menge in der Lösung vorhanden. Aufgrund einer fehlenden Enzymausstattung in der einfachen Pufferlösung ist eine Regeneration von ET

unmöglich, was die Bestimmung der Hemmwirkung bei möglichst kurzen Inkubationszeiten von 1 min erforderlich machte. Bei längeren Inkubationszeiten von bis zu 120 min verschieben sich die Hemmkurven nach rechts (siehe Abb. 50). GSH verhielt sich analog zu ET, aber ein Verbrauch in der Lösung konnte nicht nachgewiesen werden. Entweder wurde das reduzierte GSH nicht vollständig durch Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) derivatisiert und ist durch Oxidation zu GSSG mittels der Quantifizierungsmethode nicht mehr detektierbar gewesen oder GSH ist schon im Verlauf der experimentellen Durchführung zu einem gewissen Anteil zu oxidiertem Glutathion (GSSG) umgesetzt worden. Eine Messung von GSSG zeigte ein konstant niedriges Basislevel an GSSG über die unterschiedlichen Zeiten und zugeführten GSH-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Ascorbinsäure und Imidazol zeigten keine Hemmwirkung auf die MSO-Produktion. Azid war bei einer Inkubationszeit von 1 min noch wirkungslos und eine hemmende Wirkung auf die MSO-Produktion trat erst mit zunehmender Zeit auf. Die Reaktionskonstanten dieser beiden Quencher sind wegen ihres diametralen Reaktionsverhaltens schwierig zu vergleichen. Da Azid wegen seiner Toxizität allerdings nicht im Organismus vorliegt, sondern experimentell nur in geringen Konzentrationen bis 10 mmol/l von Zellen toleriert wird, stellt sich nicht die Frage, ob es ET als physiologischer Quencher Konkurrenz macht [90]. Erstaunlicherweise halten Fibroblasten Azidkonzentrationen von 100 mmol/l über 2 h aus [136].

4.4 *In-vivo*-Versuche

Die Untersuchung des potentiell schützenden Effekts von Ergothionein auf Singulett-Sauerstoff in der lebenden Zelle hat ergeben, dass ET die intrazelluläre MSO-Produktion in dem gezeigten repräsentativen Einzelexperiment signifikant um den Faktor 3 hemmt (siehe Abb. 53). Die ET-Konzentrationen nahmen intrazellulär im Gegensatz zu den *in-vivo*-Experimenten nach $^1\text{O}_2$ -Exposition nicht ab (Daten nicht gezeigt). Dies kann entweder dadurch bedingt sein, dass ET schnell intrazellulär regeneriert wurde, oder eine Abnahme in den hohen Konzentrationsbereichen (≈ 1 mmol/l) nicht quantifizierbar ist. Diese Daten

demonstrieren erstmals, dass ET intrazellulär – also unter *physiologischen* Bedingungen – eine schützende Wirkung gegenüber Singulett-Sauerstoff hat, obwohl GSH (z. B. 7 mmol/l in HeLa-Zellen [137]) und zahlreiche andere potentielle Quencher in höheren Konzentrationen vorliegen. In Erythrozyten beispielsweise liegt ET mit 0,1–1 mmol/l etwa um den Faktor 10 niedriger konzentriert vor als Ascorbat und GSH.

Neben ET zeigte ausschließlich Ascorbinsäure eine hemmende Wirkung auf die MSO-Produktion (siehe Abb. 54). Das Monoanion der Ascorbinsäure ist der effizienteste chemische physiologisch vorliegende Singulett-Sauerstoff-Quencher ($k_s = 3,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [138]. Da bei der Reaktion von Ascorbat mit Singulett-Sauerstoff allerdings pro Äquivalent $^1\text{O}_2$ ein Äquivalent H_2O_2 entsteht, was durch die Bildung von Hydroxylradikalen einen ebenso großen intrazellulären oxidativen Schaden anrichtet wie $^1\text{O}_2$, ist diese Reaktion für den Organismus wertlos [139]. Ey et al. haben ebenfalls mit ETT-transfizierten HEK-293-Zellen gearbeitet. Die Daten zeigen, dass GSH im Vergleich zu ET gegenüber allen anderen ROS in *in-vivo*-Experimenten deutlich überlegen [133]. Der Effekt von ET auf $^1\text{O}_2$ wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, aber die Daten zusammen mit den in dieser Arbeit gezeigten Resultaten können so verstanden werden, dass das in hohen Konzentrationen vorliegende GSH die unspezifisch angreifenden ROS abfängt und ET in niedrigen Konzentration spezifisch für $^1\text{O}_2$ zuständig ist.

5 AUSBLICK

Durch die gezeigten Ergebnisse konnte erstmals die physiologische Bedeutung und Einzigartigkeit von ET eindeutig erklärt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse ebnen den Weg für weitere Studien, um die Pathogenese, der mit ET assoziierten Erkrankungen besser zu verstehen und auf dieser Basis Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. *In-vivo*-Studien mit ET an Morbus-Crohn-Versuchstieren könnten den tatsächlichen Einfluss von ET auf Pathogenese und Krankheitsverlauf zeigen. Außerdem sollten gezielte ET-Substitutions-Studien durchgeführt werden an Patienten, die an einer Erkrankung leiden, die mit einem ET-Mangel assoziiert ist, wie z. B. Katarakt [55]. Die neuen Erkenntnisse zur physiologischen Funktion liefern außerdem Hinweise darauf, dass ET von Nutzen bei der Therapie der Erythropoetischen Protoporphyrurie sein könnte. Bei dieser Hauterkrankung kommt es zu einer Anhäufung des Photosensibilisators Protoporphyrin IX. Ein weiterer physiologischer Zusammenhang könnte, aufgrund der physiologischen Funktion von ET, mit der Photosensibilität bei Lupus erythematoses bestehen, was durch Studien untersucht werden sollte. ET könnte auch als Schutz vor Nebenwirkungen bei der Photodynamischen Tumortherapie eingesetzt werden, was es zu untersuchen gilt.

Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass ET, nachdem es über die Nahrung aufgenommen wurde, sehr lange im Organismus nachgewiesen werden kann [140]. Bei Ratten konnten Halbwertszeiten von bis zu einem Monat gemessen werden [14]. Das spricht für einen Regenerationsmechanismus, der allerdings bis heute nicht geklärt ist. In Gegenwart von Kupfer und H_2O_2 in stark saurem Milieu wurde die Ausbildung eines Disulfids beobachtet, nicht aber unter neutralen Bedingungen [141]. Nach derzeitigem Kenntnisstand geht man nicht von einem analogen Regenerationsmechanismus zum GSH aus. Zunächst sind intrazelluläre Zeitverlaufsmessungen erforderlich, die keinen ET-Verbrauch über die Zeit zeigen. Weiter könnten *in-vitro*-Inkubationsversuche mit $^{18}O_2$ -markiertem $DHPNO_2$ durchgeführt werden, um so den Einbau von $^{18}O_2$ bei tiefen

Temperaturen mittels NMR in instabile Zwischenprodukte zu zeigen. Erste Versuche Reaktionsprodukte von ET mit $^1\text{O}_2$ in wässriger Lösung nachzuweisen, sind zusammen mit der Arbeitsgruppe Schäfer vom Department für Chemie, Universität zu Köln, im Rahmen dieser Arbeit bereits unternommen worden (siehe 2.9.3). Die massenspektrometrische Analyse mit einem Orbitrap Massenanalysator, mit dem exakte Massen bestimmt werden können, führte jedoch zu keinen aussagekräftigen Erkenntnissen.

Desweiteren lieferten die Differenz-Abtönungs-Spektren (siehe 2.8.1) neben Signalen, die als Methioninsulfoxid und Kynurenin identifiziert werden konnten, eine Reihe von weiteren nicht aufgeklärten Signalen. Diese Signale sind repräsentativ für intrazelluläre Reaktionsprodukte, die durch Singulett-Sauerstoff entstanden sind. Es ist bekannt, dass z. B. Aminosäuren, Lipide, Ascorbat und DNA- und RNA-Bausteine durch $^1\text{O}_2$ angegriffen werden (siehe Abb. 8). Eine Auswahl von Aminosäuren wurde in separaten *in-vitro*-Ansätzen inkubiert (siehe 2.9.2) und ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Schäfer wurden Spektren untersucht, in denen Guanin und Guanosin mit DHPNO_2 inkubiert wurden. Um ein besseres Verständnis des intrazellulären Reaktionsverhaltens von Singulett-Sauerstoff in Gegenwart von Ergothionein zu erhalten, sollten weitere dieser unbekanntes Singulett-Sauerstoff-Reaktionsprodukte identifiziert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 761-70.
2. Pfeiffer, C., et al., *Knockout of the ergothioneine transporter ETT in zebrafish results in increased 8-oxoguanine levels*. Free Radic Biol Med, 2015. **83**: p. 178-85.
3. Bello, M.H., et al., *The Neurospora crassa mutant NcDeltaEgt-1 identifies an ergothioneine biosynthetic gene and demonstrates that ergothioneine enhances conidial survival and protects against peroxide toxicity during conidial germination*. Fungal Genet Biol, 2012. **49**(2): p. 160-72.
4. Tanret, C., *Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, l'ergothioneine*. Rend. Acad. Sci, 1909. **149**: p. 222-224.
5. Genghof, D.S., *Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales*. J Bacteriol, 1970. **103**(2): p. 475-8.
6. Pfeiffer, C., et al., *Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine*. Food Chemistry, 2011. **129**(4): p. 1766-1769.
7. Genghof, D.S. and O. Van Damme, *Biosynthesis of ergothioneine from endogenous hercynine in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 1968. **95**(2): p. 340-4.
8. Melville, D.B., S. Eich, and M.L. Ludwig, *The biosynthesis of ergothioneine*. J Biol Chem, 1957. **224**(2): p. 871-7.
9. Melville, D.B., W.H. Horner, and R. Lubschez, *Tissue ergothioneine*. J Biol Chem, 1954. **206**(1): p. 221-8.
10. Genghof, D.S. and O. Vandamme, *Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Mycobacteria*. J Bacteriol, 1964. **87**: p. 852-62.
11. Seebeck, F.P., *In vitro reconstitution of Mycobacterial ergothioneine biosynthesis*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(19): p. 6632-3.
12. Hartman, P.E., *Ergothioneine as Antioxidant*. Methods in Enzymology, 1990. **186**: p. 310-318.
13. Melville, D.B., *Ergothioneine*. Vitam. Horm., 1958. **17**: p. 155-204.
14. Mayumi, T., et al., *Studies on ergothioneine. V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1978. **26**(12): p. 3772-8.
15. Lawson, A., H.V. Morley, and L.I. Woolf, *The determination of ergothioneine; the non-occurrence of ergothioneine in urine*. Biochem J, 1950. **47**(5): p. 513-8.
16. Kawano, H., et al., *Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1982. **30**(5): p. 1760-5.
17. Mortensen, R.A., *The effect of diet on methemoglobin levels of nitrite-injected rats*. Arch Biochem Biophys, 1953. **46**(1): p. 241-3.
18. Spicer, S.S., J.G. Wooley, and V. Kessler, *Ergothioneine depletion in rabbit erythrocytes and its effect on methemoglobin formation and reversion*. Proc Soc Exp Biol Med, 1951. **77**(3): p. 418-20.
19. Barger, G. and A.J. Ewins, *The Identity of Trimethylhistidine (Histidine-Betaine) from Various Sources*. Biochem J, 1913. **7**(2): p. 204-6.

20. Grundemann, D., et al., *Discovery of the ergothioneine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5256-61.
21. Grundemann, D., *The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity--a review*. Prev Med, 2012. **54 Suppl**: p. S71-4.
22. Russ, H., et al., *The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia*. Eur J Neurosci, 1996. **8**(6): p. 1256-64.
23. Schomig, E., et al., *Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney*. FEBS Lett, 1998. **425**(1): p. 79-86.
24. Kato, Y., et al., *Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1*. Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 832-40.
25. Sugiura, T., et al., *Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(10): p. 1665-72.
26. Grigat, S., et al., *Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(2): p. 309-16.
27. Tokuhira, S., et al., *An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2003. **35**(4): p. 341-8.
28. Okumura, N., K. Tsuji, and T. Nakahata, *Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors*. Blood, 1992. **80**(3): p. 642-50.
29. Tamai, I., et al., *Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1*. FEBS Lett, 1997. **419**(1): p. 107-11.
30. Wu, X., et al., *Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1466**(1-2): p. 315-27.
31. Shires, T.K., et al., *Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1997. **117**(1): p. 117-20.
32. Peltekova, V.D., et al., *Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 471-5.
33. Martinez, A., et al., *Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(2): p. 222-6.
34. Leung, E., et al., *Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(2): p. 233-6.
35. Babusukumar U, W.T., McGuire E, Broeckel U, Kugathasan S, *Contribution of OCTN variants within the IBD5 locus to pediatric onset Crohn's disease*. 2006.
36. Fisher, S.A., et al., *Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease*. Hum Mutat, 2006. **27**(8): p. 778-85.
37. Torkvist, L., et al., *Contribution of the IBD5 locus to Crohn's disease in the Swedish population*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(2): p. 200-6.

38. Waller, S., et al., *Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis*. Gut, 2006. **55**(6): p. 809-14.
39. Santiago, J.L., et al., *Evidence for the association of the SLC22A4 and SLC22A5 genes with type 1 diabetes: a case control study*. BMC Med Genet, 2006. **7**: p. 54.
40. Taubert, D., et al., *Increased ergothioneine tissue concentrations in carriers of the Crohn's disease risk-associated 503F variant of the organic cation transporter OCTN1*. Gut, 2009. **58**(2): p. 312-4.
41. Shimizu, T., et al., *Organic cation transporter Octn1-mediated uptake of food-derived antioxidant ergothioneine into infiltrating macrophages during intestinal inflammation in mice*. Drug Metab Pharmacokinet, 2015. **30**(3): p. 231-9.
42. Taubert, D., et al., *Functional role of the 503F variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(10): p. 1505-6.
43. Nakamura, T., et al., *Decreased proliferation and erythroid differentiation of K562 cells by siRNA-induced depression of OCTN1 (SLC22A4) transporter gene*. Pharm Res, 2007. **24**(9): p. 1628-35.
44. Taubert, D., et al., *Association of rheumatoid arthritis with ergothioneine levels in red blood cells: a case control study*. J Rheumatol, 2006. **33**(11): p. 2139-45.
45. Barton, A., et al., *Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 752-8.
46. Martinez, A., et al., *Role of SLC22A4, SLC22A5, and RUNX1 genes in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2006. **33**(5): p. 842-6.
47. Feng, Y., et al., *SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese Han population*. J Dig Dis, 2009. **10**(3): p. 181-7.
48. Li, M., et al., *OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(31): p. 4923-7.
49. Newman, B., et al., *SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(2): p. 425-9.
50. Toh, D.S., et al., *Genetic variations of the SLC22A5 gene in the Chinese and Indian populations of Singapore*. Drug Metab Pharmacokinet, 2010. **25**(1): p. 112-9.
51. Hradsky, O., et al., *Two independent genetic factors responsible for the associations of the IBD5 locus with Crohn's disease in the Czech population*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(7): p. 1523-9.
52. Maeda, T., et al., *Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(3): p. 394-401.
53. Rahman, I., et al., *Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(4): p. 860-4.

54. Laurenza, I., et al., *Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: evidence of an anti-inflammatory action*. *Biofactors*, 2008. **33**(4): p. 237-47.
55. Shukla, Y., O.P. Kulshrestha, and K.P. Khuteta, *Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses*. *Indian J Med Res*, 1981. **73**: p. 472-3.
56. Nishigori, H., et al., *Effect of MPG on glucocorticoid-induced cataract formation in developing chick embryo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984. **25**(9): p. 1051-5.
57. Salt, H.B., *The ergothioneine content of the blood in health and disease*. *Biochem J*, 1931. **25**(5): p. 1712-9.
58. Epanand, R.M., *The role of dietary ergothioneine in the development of diabetes mellitus*. *Med Hypotheses*, 1982. **9**(2): p. 207-13.
59. Fraser, R. and S. Jegard, *Blood ergothioneine levels in diabetes mellitus*. *J Lab Clin Med*, 1950. **35**(6): p. 960-7.
60. Hanlon, D.P., *Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes*. *J Med Chem*, 1971. **14**(11): p. 1084-7.
61. Beatty, C.H., *Levels of ergothioneine in the red blood cell in experimental diabetes*. *J Biol Chem*, 1952. **199**(2): p. 553-61.
62. Pradhan, A.D., *C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus*. *Jama*, 2001. **286**(3): p. 327.
63. Bastard, J.P., et al., *Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(5): p. 2084-9.
64. Guijarro, M.V., et al., *Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats*. *Food Chem Toxicol*, 2002. **40**(12): p. 1751-5.
65. van Kessel, K.P. and J. Verhoef, *A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells*. *Pathobiology*, 1990. **58**(5): p. 249-64.
66. Flors, C. and S. Nonell, *Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins*. *Acc Chem Res*, 2006. **39**(5): p. 293-300.
67. Motohashi, N., et al., *Metal-Complexes of Ergothioneine*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1974. **22**(3): p. 654-657.
68. Ueda, K., *[Effect of environmental chemicals on the genes and the gene expression]*. *Yakugaku Zasshi*, 2009. **129**(12): p. 1501-6.
69. Kanofsky, J.R., *Singlet oxygen production by biological systems*. *Chem Biol Interact*, 1989. **70**(1-2): p. 1-28.
70. DeRosa, M.C. and R.J. Crutchley, *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002. **233**: p. 351-371.
71. Klotz, L.O., K. Briviba, and H. Sies, *Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts*. *FEBS Lett*, 1997. **408**(3): p. 289-91.
72. Cheah, I.K. and B. Halliwell, *Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(5): p. 784-93.
73. Buettner, G.R., *Molecular Targets of Photosensitization*. <http://photobiology.info/Buettner.html> (11.02.2016)
74. Ogilby, P.R., *Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun*. *Chem Soc Rev*, 2010. **39**(8): p. 3181-209.

-
75. Kiryu, C., et al., *Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system*. FEBS Lett, 1999. **443**(2): p. 154-8.
 76. Koevary, S.B., *Selective toxicity of rose bengal to ovarian cancer cells in vitro*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2012. **4**(2): p. 99-107.
 77. Tada-Oikawa, S., et al., *DNA damage and apoptosis induced by photosensitization of 5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via singlet oxygen generation*. Photochem Photobiol, 2009. **85**(6): p. 1391-9.
 78. Adams, S.R., et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(21): p. 6063-76.
 79. Pierlot, C., et al., *Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media*. Methods Enzymol, 2000. **319**: p. 3-20.
 80. Dewilde, A., et al., *Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide*. Biol Chem, 1998. **379**(11): p. 1377-9.
 81. Davies, M.J., *Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen*. Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(1): p. 17-25.
 82. Piette, J. and P.D. Moore, *DNA SYNTHESIS ON ØX174 TEMPLATE DAMAGED BY PROFLAVINE and LIGHT TREATMENT*. Photochemistry and Photobiology, 1982. **35**(5): p. 705-708.
 83. C. F. M. Menck, P.D.M., L. F. Agnez, D. T. Ribeiro and R. C. Oliveira, *Genetic deleterious effects of singlet oxygen*. Quimica Nova, 1993. **16**: p. 328-336.
 84. Castano, A.P., T.N. Demidova, and M.R. Hamblin, *Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2004. **1**(4): p. 279-93.
 85. Mallidi, S., et al., *Photosensitizer fluorescence and singlet oxygen luminescence as dosimetric predictors of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy induced clinical erythema*. J Biomed Opt, 2014. **19**(2): p. 028001.
 86. Cheng, K.C., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 166-72.
 87. Cadet, J., et al., *Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(5): p. 1219-25.
 88. Hawkins, C.L., P.E. Morgan, and M.J. Davies, *Quantification of protein modification by oxidants*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(8): p. 965-88.
 89. Kang, P. and C.S. Foote, *Photosensitized oxidation of ¹³C,¹⁵N-labeled imidazole derivatives*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(32): p. 9629-38.
 90. Tour, O., et al., *Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(12): p. 1505-8.
 91. Sheu, C. and C.S. Foote, *Reactivity toward Singlet Oxygen of a 7,8-Dihydro-8-oxoguanosine ("8-Hydroxyguanosine") Formed by Photooxidation of a Guanosine Derivative*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(24): p. 6439-6442.
 92. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. EMBO J, 1982. **1**(7): p. 841-5.
-

93. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
94. Bach, M., et al., *Fast set-up of doxycycline-inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor*. FEBS J, 2007. **274**(3): p. 783-90.
95. Kohfeldt, E., et al., *Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican*. FEBS Lett, 1997. **414**(3): p. 557-61.
96. Yates, J.L., N. Warren, and B. Sugden, *Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 812-5.
97. Bottiroli, G., et al., *Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate*. Photochem Photobiol, 1997. **66**(3): p. 374-83.
98. Jocham, D., H. Stepp, and R. Waidelich, *Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art*. Eur Urol, 2008. **53**(6): p. 1138-48.
99. Bruins, A.P., *Mechanistic aspects of electrospray ionization*. Journal of Chromatography A, 1998. **794**(1-2): p. 345-357.
100. Theodoridis, G.A., et al., *Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review*. Anal Chim Acta, 2012. **711**: p. 7-16.
101. Beutner, S., et al., *Synthetic singlet oxygen quenchers*. Methods Enzymol, 2000. **319**: p. 226-41.
102. Dahl TA, M.W., Hartman PE, *Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage*. Photochem Photobiol, 1988. **47**: p. 357-362.
103. Li, M.Y., et al., *Quenching of Singlet Molecular Oxygen (1O_2) by Azide Anion in Solvent Mixtures*. Photochemistry and Photobiology, 2007. **74**(6): p. 760-764.
104. Reglinski, J., W.E. Smith, and R.D. Sturrock, *Spin-echo 1H NMR detected response of ergothioneine to oxidative stress in the intact human erythrocyte*. Magn Reson Med, 1988. **6**(2): p. 217-23.
105. Akanmu, D., et al., *The antioxidant action of ergothioneine*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(1): p. 10-6.
106. Aruoma, O.I., J.P. Spencer, and N. Mahmood, *Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine*. Food Chem Toxicol, 1999. **37**(11): p. 1043-53.
107. Robey, R.W., et al., *ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(2): p. 187-94.
108. Bottone, M.G., et al., *Enzyme-assisted photosensitization with rose Bengal acetate induces structural and functional alteration of mitochondria in HeLa cells*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(3): p. 263-71.
109. Ravanat, J.L., et al., *Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40601-4.
110. Blank, C.E. and P. Sanchez-Baracaldo, *Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria--a key to understanding the rise in atmospheric oxygen*. Geobiology, 2010. **8**(1): p. 1-23.
111. Wang, M., Q. Zhao, and W. Liu, *The versatile low-molecular-weight thiols: Beyond cell protection*. Bioessays, 2015. **37**(12): p. 1262-7.

112. Ali, H. and J.E. van Lier, *Metal complexes as photo- and radiosensitizers*. Chem Rev, 1999. **99**(9): p. 2379-450.
113. Nagababu, E. and J.M. Rifkind, *Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation*. Biochemistry, 2000. **39**(40): p. 12503-11.
114. Everse, J. and N. Hsia, *The toxicities of native and modified hemoglobins*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(6): p. 1075-99.
115. Everse, J., M.C. Johnson, and M.A. Marini, *Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives*. Methods Enzymol, 1994. **231**: p. 547-61.
116. Tatsuzawa, H., et al., *Singlet oxygen ((1)Delta(g)O(2)) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(3): p. 647-50.
117. Steinbeck, M.J., A.U. Khan, and M.J. Karnovsky, *Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15649-54.
118. Pimenova, T., et al., *Quantitative mass spectrometry defines an oxidative hotspot in hemoglobin that is specifically protected by haptoglobin*. J Proteome Res, 2010. **9**(8): p. 4061-70.
119. Strader, M.B., et al., *Post-translational transformation of methionine to aspartate is catalyzed by heme iron and driven by peroxide: a novel subunit-specific mechanism in hemoglobin*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22342-57.
120. Breitenbach, T., et al., *Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells*. Photochem Photobiol Sci, 2009. **8**(4): p. 442-52.
121. Hatz, S., J.D. Lambert, and P.R. Ogilby, *Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability*. Photochem Photobiol Sci, 2007. **6**(10): p. 1106-16.
122. John W. Snyder', J.D.C.L.a.P.R.O., *5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21H,23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell*. 2006.
123. van den Broeke, L.T. and G.M.J.B. van Henegouwen, *Thiols as potential UV radiation protectors: An in vitro study*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1993. **17**(3): p. 279-286.
124. Nikodemus, D., et al., *Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma*. J Physiol Pharmacol, 2011. **62**(4): p. 411-9.
125. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(3): p. 249-61.
126. Ronsein, G.E., et al., *Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O₂(¹Delta_g)]: mechanistic studies using ¹⁸O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(6): p. 1271-83.
127. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1703**(2): p. 93-109.

128. Motohashi, N. and I. Mori, *Thiol-induced hydroxyl radical formation and scavenger effect of thiocarbamides on hydroxyl radicals*. J Inorg Biochem, 1986. **26**(3): p. 205-12.
129. Whiteman, M. and B. Halliwell, *Thiols and disulphides can aggravate peroxynitrite-dependent inactivation of alpha1-antiproteinase*. FEBS Lett, 1997. **414**(3): p. 497-500.
130. Franzoni, F., et al., *An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(8): p. 453-7.
131. Kobayashi, D., et al., *Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation*. Exp Hematol, 2004. **32**(12): p. 1156-62.
132. Gokce, G. and M.Z. Arun, *Ergothioneine produces relaxation in isolated rat aorta by inactivating superoxide anion*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(21): p. 3339-45.
133. Ey, J., E. Schomig, and D. Taubert, *Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(16): p. 6466-74.
134. Rougee, M., et al., *Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity*. Photochem Photobiol, 1988. **47**(4): p. 485-9.
135. Obayashi, K., et al., *L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet oxygen and suppresses TNF-alpha and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts*. J Cosmet Sci, 2005. **56**(1): p. 17-27.
136. Tyrrell, R.M. and M. Pidoux, *Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations*. Photochem Photobiol, 1989. **49**(4): p. 407-12.
137. Montero, D., et al., *Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 508-13.
138. Bisby, R.H., et al., *Quenching of Singlet Oxygen by Trolox C, Ascorbate, and Amino Acids: Effects of pH and Temperature*. The Journal of Physical Chemistry A, 1999. **103**(37): p. 7454-7459.
139. Kramarenko, G.G., et al., *Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(6): p. 1634-7.
140. Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou, *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. Food Chem Toxicol, 1999. **37**(9-10): p. 949-62.
141. Cumming, B.M., et al., *The Physiology and Genetics of Oxidative Stress in Mycobacteria*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(3).
142. Signorelli, S., et al., *Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants*. Plant Physiol Biochem, 2013. **64**: p. 80-3.

