

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler
(Direktor: Prof. Dr. E. Maser)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER PEROXID-CLEARANCE VON
C6-ASTROGLIOMAZELLEN UND PRIMÄR KULTIVIERTEN ASTROZYTEN
DER RATTE**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde
eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNE-CATHRIN JESS
aus Rendsburg

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Röhl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2011
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 31.10.2011

gez.: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

Publikationen von Ergebnissen dieser Doktorarbeit	5
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	9
2 Material und Methoden	12
2.1 Chemikalien, biologisches Material und Verbrauchsmaterialien	12
2.2 Kulturmedien und Lösungen	13
2.3 C6-Zellen Zellkultur	15
2.3.1 C6-Zellen	15
2.3.2 Kultivierung	16
2.4 Gliazellen Zellkultur	16
2.4.1 Astrozyten und Mikroglia	16
2.4.2 Herstellung der primären Hirnzellkultur und Kultivierung	16
2.4.2.1 Präparation der primären Hirnzellkultur	16
2.4.2.2 Herstellung der Astrozytenkultur	17
2.4.2.3 Gewinnung von Astrozyten-konditioniertem Medium	18
2.4.2.4 Herstellung der Mikrogliakultur	18
2.4.2.5 Gewinnung von Mikroglia-konditioniertem Medium	18
2.5 Vorbehandlung der Versuchskulturen für die Messung der Peroxidelimination	18
2.5.1 C6-Zellen in DMEM Wachstumsmedium	19
2.5.2 C6-Zellen in Ham's F-10 Wachstumsmedium kultiviert	19
2.5.3 Vorinkubation der C6-Zellen mit Enzymmodulatoren	20
2.5.4 Astrozyten in 56° DMEM Wachstumsmedium kultiviert	21
2.5.5 Astrozyten in Mikroglia-konditionierten Medien kultiviert	21
2.6 Messung der Elimination von Peroxiden	22
2.6.1 Theoretische Grundlagen	22
2.6.2 Vorgehensweise	24
2.6.2.1 Testsubstanzen	24
2.6.2.2 Versuchsdurchführung	25
2.6.2.3 Xylenol Orange Methode	25
2.6.2.4 Bestimmung der Eliminationsgeschwindigkeit	26

2.7	Proteinbestimmung	27
2.8	Darstellung der Ergebnisse und Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	C6-Zellen	30
3.1.1	Elimination von Peroxiden aus dem Kulturmedium	30
3.1.2	Einfluss der Zellkonzentration auf die Eliminationsgeschwindigkeit	31
3.1.3	Konzentrationsabhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit	32
3.1.3.1	H ₂ O ₂	32
3.1.3.2	CHP	34
3.1.4	Einfluss der Kulturbedingungen auf die Peroxidelimination	36
3.1.5	Einfluss von Modulatoren antioxidativer Enzyme	38
3.1.5.1	Mercaptosuccinat (MS)	38
3.1.5.2	3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)	40
3.1.5.3	Buthionin-sulfoximin (BSO)	41
3.1.5.4	Natriumselenit (SE)	43
3.2	Astrozyten	44
3.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit	44
3.2.1.1	H ₂ O ₂	44
3.2.1.2	CHP	46
3.2.2	Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf die H ₂ O ₂ - Elimination	47
4	Diskussion	50
4.1	C6-Astrogliazellen	50
4.1.1	Kinetik der Elimination von H ₂ O ₂ und CHP	50
4.1.2	Einfluss von Modulatoren antioxidativer Enzyme	51
4.1.3	Einfluss der Kulturbedingungen	52
4.2	Astrozyten	53
4.2.1	Kinetik der Elimination von H ₂ O ₂ und CHP	53
4.2.2	Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium	53
5	Zusammenfassung	55
	Literaturverzeichnis	57
	Danksagung	61
	Ehrenwörtliche Erklärung	62
	Lebenslauf	63

Publikationen von Ergebnissen dieser Doktorarbeit

Originalartikel

- **Neurotoxicity Research. 2010 May;17(4):317-31.**

Röhl C, Armbrust E, Herbst E, Jess A, Gülden M, Maser E, Rimbach G, Bösch-Saadatmandi C. (2010).

Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation.

- **Free Radical Biology and Medicine. 2010 Nov 1;49(8):1298-305.**

Gülden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H

Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time.

Tagungsbeitrag

- **The SSCT Young Scientist Award: 1. Preis für die beste Posterpräsentation**

25th Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology (SSCT), 19. – 22.09.2007

Anne Jess, Michael Gülden, Edmund Maser, Hasso Seibert

Clearance of exogenous peroxides by C6 astroglioma cells in vitro

Abbildungsverzeichnis

1.1	Reaktionsmöglichkeiten des Sauerstoffs im aeroben Stoffwechsel	9
1.2	Abbauwege zur Elimination von anorganischen und organischen Peroxiden . .	10
2.1	C6-Zellen in DMEM-Wachstumsmedium kultiviert	19
2.2	C6-Zellen in Ham's F-10 Wachstumsmedium kultiviert	20
2.3	Vorinkubation von C6-Zellen mit Enzymmodulatoren	20
2.4	Astrozyten in 56°-DMEM-Wachstumsmedium kultiviert	21
2.5	Astrozyten in Mikroglia-konditioniertem-Medien kultiviert	22
2.6	Michaelis-Menten Kinetik	23
2.7	Kinetik 0. und 1. Ordnung	24
2.8	Pipettierschema der Xylenol Orange Methode	26
2.9	Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Lowry	28
3.1	Elimination von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen	30
3.2	Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 von der Zellprotein- konzentration	31
3.3	Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von CHP von der Zellprotein- konzentration	32
3.4	Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 von der Anfangskon- zentration	33
3.5	Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der H_2O_2 -Konzentration	34
3.6	Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von CHP von der Anfangskon- zentration	35
3.7	Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der CHP- Konzentration	36
3.8	Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von in Ham's F-10 Medium kultivierten Zellen von der Anfangskonzentration	37
3.9	Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der CHP- Konzentration	38
3.10	Einfluss von Mercaptosuccinat (MS) auf die Elimination von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen	39
3.11	Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination für H_2O_2 bzw. CHP nach Vorbehandlung mit Mercaptosuccinat	39

3.12 Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die Elimination von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen	40
3.13 Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination von H_2O_2 bzw. CHP nach Vorbehandlung mit 3-Amino-1,2,4-triazol	41
3.14 Einfluss von Buthionin-sulfoximin (BSO) auf die Elimination von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen	42
3.15 Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination für H_2O_2 bzw. CHP nach Vorbehandlung mit Buthionin-sulfoximin	42
3.16 Einfluss von Natriumselenit (SE) auf die Elimination von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen	43
3.17 Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination für H_2O_2 bzw. CHP nach Vorbehandlung mit Natriumselenit	44
3.18 Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von Astrozyten von der H_2O_2 -Anfangskonzentration	45
3.19 Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) der Astrozyten von der H_2O_2 -Konzentration	46
3.20 Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von Astrozyten von der CHP-Anfangskonzentration	47
3.21 Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von Astrozyten von der CHP-Konzentration	48
3.22 Einfluss der Kultivierung von Astrozyten in Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM) auf die H_2O_2 -Elimination	49
3.23 Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf die Geschwindigkeit der Elimination (V_S)	49

Abkürzungsverzeichnis

3AT	3-Amino-1,2,4,-triazole
BSA	Rinderserum-Albumin
BSO	DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximine
CHP	Cumolhydroperoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDU	Fluorodesoxyuridin
GR	Glutathion Reduktase
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
Ham's F-10	Ham's Nutrient Mixture F-10
HS	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
MKM	Mikroglia-konditioniertes Medium
MS	Mercaptosuccinat
P	Phenolrot
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline nach Dulbecco
ROH	organischer Alkohol
ROOH	organische Hydroperoxide
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
SE	Natriumselenit
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SOD	Superoxiddismutase

1 Einleitung

Alle Säugetierzellen sind gegenüber oxidativem Stress anfällig. In besonderem Maße betrifft dies jedoch die neuronalen Zellen, da im Gehirn 20 % des gesamten Sauerstoffumsatzes des Körpers stattfindet (Halliwell, 2006) und im aeroben Stoffwechsel stets auch Peroxide und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und somit Oxidantien, generiert werden. Es führen aber auch Entzündungsreaktionen zu oxidativem Stress, wobei das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien im Gehirngewebe zur Seite der Oxidantien und damit zu potentiellem Schaden verschoben wird (Azzi et al., 2004). Dieser manifestiert sich unter anderem in einer Erhöhung der Lipidperoxidation, Proteinoxidation und oxidativer Basenschädigung in DNA und mRNA (Halliwell, 2006). Oxidativer Stress und ROS werden oft mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer und amyotropher Lateralsklerose in Verbindung gebracht (Dringen und Hamprecht, 1997).

Eine wichtige Rolle spielt Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist, nur sehr langsam von alleine zerfällt (Chance et al., 1979) und entlang eines Konzentrationsgradienten durch Membranen diffundiert (Antunes und Cadenas 2000). H_2O_2 entsteht unter anderem aus der mitochondrialen Atmungskette, welche als Nebenprodukt Superoxid-Radikale produziert. Diese werden durch die Superoxiddismutasen (SOD) zu H_2O_2 und O_2 disproportioniert. H_2O_2 kann jedoch in Anwesenheit von redox-aktiven Metallionen wie Cu^{2+} und Fe^{2+} in der Fenton-Reaktion, siehe Abbildung 1.1, zum hochreaktiven Hydroxyl-Radikal reduziert werden (Chevion, 1988; Halliwell, 1992), welches der Hauptfaktor oxidativer Toxizität ist (Makino et al., 1994; Sasaki et al., 1998; Hashida et al., 2002). Versuche, in denen

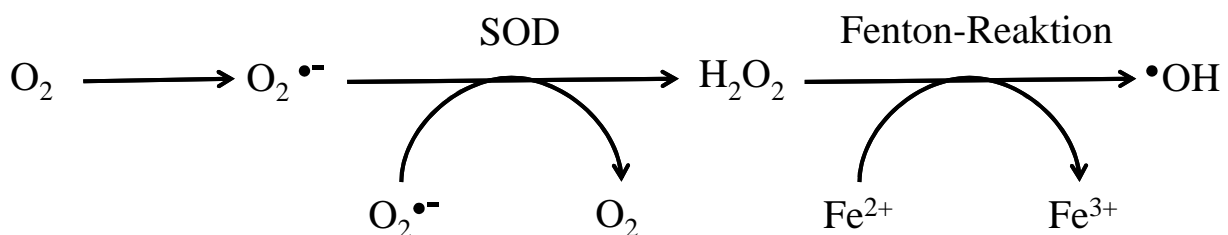


Abbildung 1.1 – Reaktionsmöglichkeiten des Sauerstoffs im aeroben Stoffwechsel. $\text{O}_2^{\bullet-}$: Superoxid-Radikal; $\bullet\text{OH}$: Hydroxyl-Radikal; SOD: Superoxiddismutase.

nach induzierter Ischämie in Rattenhirnen der H_2O_2 Anstieg während der Reperfusion gemessen wurde, zeigten, dass bereits Konzentrationen von 50 bis 100 μM H_2O_2 neurotoxisch sind (Hyslop et al., 1995). Die physiologische intrazelluläre H_2O_2 Konzentration im Gehirngewebe wurde um die 10 μM veranschlagt (Makino et al., 2008).

H_2O_2 wird in Säugerzellen hauptsächlich durch Katalase und Glutathionperoxidase (GPx) eliminiert (Dringen et al., 2005; Makino et al., 2008). Die Katalase, ein Enzym mit einer Häm-Gruppe im aktiven Zentrum, wird über Diffusion kontrolliert. Bei hohen Konzentrationen bis 5 M wird noch keine Sättigung erreicht, und sie ist in neuronalen Zellen vor allem auf Mikroperoxisomen beschränkt (Aebi, 1983). Die Konzentration an Katalase variiert zwischen den einzelnen Gewebetypen zum Teil erheblich. Sie katalysiert den Abbau von 2 Molekülen H_2O_2 zu 2 Molekülen H_2O und O_2 (siehe auch Abbildung 1.2 A). Die Glutathionperoxidase (GPx), eine Familie von vier selenhaltigen Enzymen (Brigelius-Flohé, 1999), ist vor allem im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert. Sie baut H_2O_2 bei sehr niedrigen Konzentrationen ($<10 \mu\text{M}$) ab (Dringen and Hamprecht, 1997). Der durch die GPx katalysierte Abbau von H_2O_2 zu H_2O , Abbildung 1.2 A, ist unter anderem von Glutathion (GSH) abhängig, welches als Elektronendonator in der Reaktion fungiert und zum Glutathiondisulfid (GSSG) wird. Aus GSSG wird in einer durch die Glutathion Reduktase (GR) katalysierten Reaktion GSH, indem das Flavoenzym GR Elektronen von NADPH auf GSSG überträgt. Das Substrat NADPH wird über zahlreiche enzymatische Stoffwechselwege aus NADP reduziert, wie der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase im Pentosephosphatweg, des Weiteren durch das Malatenzym, Isocitratdehydrogenasen und mitochondriale Nicotinamidtranshydrogenasen (Dringen et al., 2005).

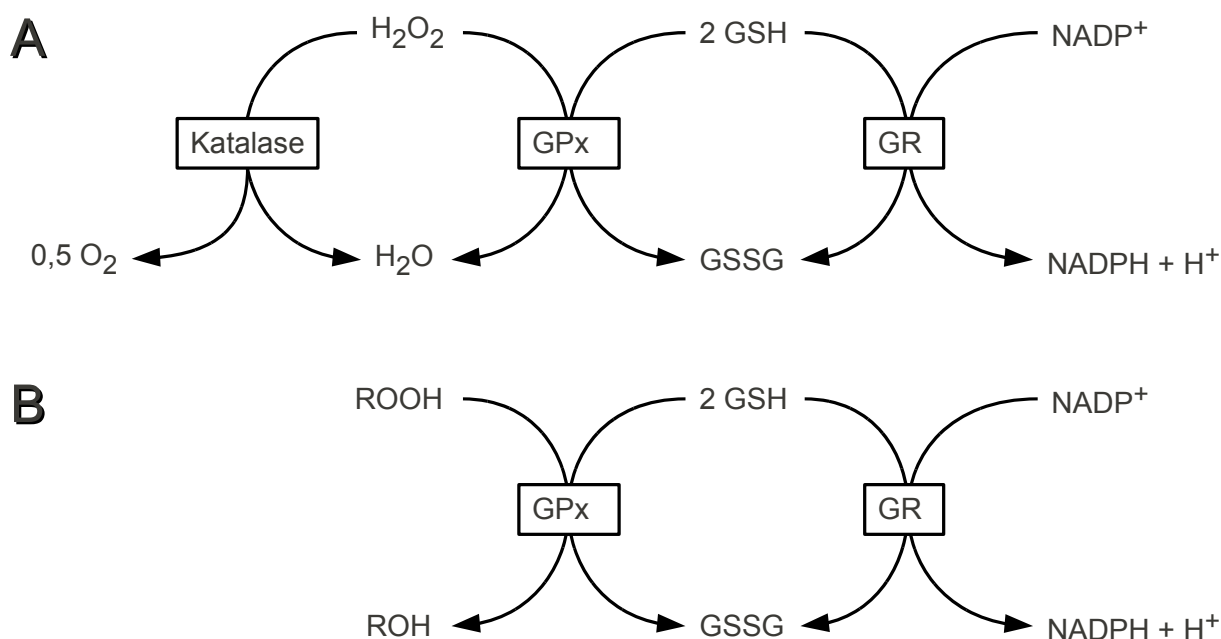


Abbildung 1.2 – Die dargestellten Abbauwege skizzieren den Abbau von anorganischen H_2O_2 (A) und organischen Peroxiden (ROOH) (B) zu denen auch CHP zählt.

Neben H_2O_2 werden in der Zelle auch organische Hydroperoxide gebildet. Sie entstehen z.B. bei der Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Lipidmembranen. Ähnlich wie H_2O_2 können or-

ganische Hydroperoxide in Anwesenheit von Fe^{2+} zu reaktiven Alkoxyradikalen reduziert werden. In Säugerzellen werden organische Hydroperoxide (ROOH) durch die Glutathionperoxidase zu den entsprechenden Alkoholen (ROH) reduziert, siehe Abbildung 1.2 B (Brigelius-Flohé, 1999). Katalase ist nicht in der Lage organische Hydroperoxide zu eliminieren.

Der Hauptbestandteil des Gehirngewebes besteht aus Astrozyten und Neuronen, die über eine Vielzahl von Transmitterstoffen kommunizieren (Röhl, 2000). Astrozyten konnten unter anderem eine protektive Funktion für Neurone gegenüber oxidativem Stress durch H_2O_2 nachgewiesen werden, indem sie z.B. H_2O_2 eliminieren (Desagher et al., 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeit von C6-Astrogliazellen und primär kultivierten Astrozyten der Ratte zu charakterisieren, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das organische Cumolhydroperoxid (CHP) zu eliminieren. Die Zellen wurden hierfür mit H_2O_2 bzw. CHP im Kulturmedium inkubiert und die Abnahme der Peroxidkonzentration im Medium über die Zeit gemessen. In einem ersten Schritt sollte die Kinetik der Elimination beider Peroxide aus dem Medium charakterisiert werden, die Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von der Zelldichte und der Peroxid-Konzentration gemessen werden, um die intrinsische Clearance und die Eliminationskapazität zu bestimmen. Intrinsische Clearance und die Eliminationskapazität charakterisieren die Fähigkeit von Zellen Substanzen zu eliminieren.

Da Hinweise vorliegen, dass die Erhaltungskulturbedingungen die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber Peroxiden beeinflussen können (Brenner et al., 2010), sollte untersucht werden, inwieweit die Fähigkeit von C6-Zellen Peroxide zu eliminieren von den Kulturbedingungen abhängt. Weiterhin sollte die Bedeutung der Katalase und der Glutathionperoxidase für den Abbau von H_2O_2 und CHP durch C6-Zellen durch Verwendung von Modulatoren dieser enzymatischen Systeme, wie z.B. Mercaptosuccinat, 3-Amino-1,2,4-triazol, Buthioninsulfoximin und Natriumselenit, untersucht werden.

Vorhergehende Arbeiten deuten darauf hin, dass die Kultivierung von Astrozyten im konditioniertem Medium von aktivierter Mikroglia (MKM) diese deutlich unempfindlicher gegenüber oxidativem Stress durch H_2O_2 macht (Röhl et al., 2008). Es sollte also die Frage geklärt werden, ob mit einer erhöhten Resistenz gegenüber H_2O_2 , auch die Fähigkeit H_2O_2 zu eliminieren verändert wird. Dazu wurden Primärkulturen von Astrozyten und Mikrogliazellen aus Rattenhirnen angelegt, die Mikroglia durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und die Wirkung des aktivierten Mikrogliazellen-konditionierten Mediums auf die Peroxid-Elimination von Astrozyten untersucht.

Die experimentellen Arbeiten mit C6 Zellen wurden im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt, die Anlage von Astrozyten- und Mikroglia-Kulturen, sowie die experimentellen Arbeiten mit diesen Zellen im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, biologisches Material und Verbrauchsmaterialien

speziell für C6-Astrogliazellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot	PM-13-S, c.c.pro Gmbh
DMEM mit 4,5 g Glucose/l, mit Pyruvat (110 mg)	PM-25-S, c.c.pro Gmbh
DMEM mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, ohne Phenolrot	PM-21-S, c.c.pro Gmbh
Ham's F-10 Nutrient Mixture (Ham's F-10)	Sigma-Aldrich
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom AG
Pferdeserum (HS)	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA (10x)	Gibco
D[+]-Glucose (wasserfrei)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Mercaptosuccinat (MS, 97 %)	Aldrich
3-Amino-1,2,4-triazole (3AT, approx. 95 % TLC)	Sigma
DL-Buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO)	Sigma
Natriumselenit (SE, approx. 98 %)	Sigma

speziell für Astrozyten

DMEM mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot	no. 41965, Sigma
Fötales Rinderserum (FBS)	no. 10270, Gibco
PBS Dulbecco® (Phosphate buffered saline) ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	PAA
Amphotericin B (0,1 % (v/v))	A-9528, Sigma
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)(10,00 U/ml /10 mg/ml	no. 11-010, PAA
Trypsin (type 3)	Sigma
Desoxyribunuclease (DNase; E.C.3.1.21.1)	Boehringer Mannheim

Lipopolysaccharide (LPS, 0,02 µg/ml)	L-8274, Sigma
Fluorodesoxyuridin (FDU, 10 µM)	F-0503, Sigma
Grieß-Reagenz (modifiziert)	G-4410, Sigma
75 cm ² Kulturflaschen	Sarstedt
90 mm Kulturschale	Sarstedt
große Kulturschale	Sarstedt

allgemein

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Aldrich
Cumolhydroperoxid (CHP, 88 %)	Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	Z-10-M,c.c.pro Gmbh
Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco
Fungizone (Amphotericin B, 250 µg/ml)	Gibco
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck
25 cm ² Kulturflaschen	Sarstedt
35 mm Versuchsschalen	Nunc; Sarstedt
96 Well Mikrotiterplatten	Falcon; Sarstedt

2.2 Kulturmedien und Lösungen

Die Basismedien wurden nach Originalformulierung angesetzt. Die pulverförmigen Grundmedien wurden jeweils in 1 l ultra pure H₂O gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Alle Kulturmedien wurden, wenn nicht anders vermerkt, vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Zur Systematisierung wurden bei den folgenden Beschreibungen der verwendeten DMEM und Ham's F-10 Medien das P für Phenolrot, [+] für pyruvathaltig und [-] für pyruvatfrei verwendet. Bei Beschreibungen der MKM-Medien bedeutet [+] eine im Voraus stattgefundene Aktivierung der Mikrogliazellen, [-] steht für nicht aktivierte Mikroglia.

Basismedien

- **DMEM[-] mit P**
DMEM ohne Pyruvat ([-]) mit Phenolrot (P), mit: 3,7 g NaHCO₃, 4,766 g HEPES
- **DMEM[-] ohne P**
DMEM ohne Pyruvat ohne Phenolrot, mit: 3,7 g NaHCO₃, 4,766 g HEPES, 2 % (v/v) Glutaminlösung (200 mM), 4,5 g D(+)-Glukose
- **DMEM[+] mit P**
DMEM mit Pyruvat ([+]) mit Phenolrot, mit: 2,0 g NaHCO₃, 4,768 g HEPES (enthält weniger NaHCO₃ (2 g/l statt 3,7 g/l) als die Originalformulierung, zusätzlich 20 mM HEPES, ist dadurch für die Inkubation unter 5 % CO₂ geeignet)
- **Ham's F-10**
Ham's F-10 mit: 2,0 g NaHCO₃, 0,5 % (v/v) Glutaminlösung (200 mM) (enthält mehr NaHCO₃ (2 g/l statt 1,2 g/l) und Glutamin (2 mM statt 1 mM) als die Originalformulierung)
- **DMEM[-] mit P (Astrozyten- und Mikrogliaulturen)**
DMEM ohne Pyruvat mit Phenolrot, mit 4,5 g D(+)-Glukose, als gebrauchsfertiges Basismedium vorrätig

Nach dem Ansetzen wurden die Medien in 500 ml Duranflaschen steril filtriert. Aus den Basismedien wurden die Wachstumsmedien hergestellt, in denen die Zellen in den 25 cm² Kulturflaschen und den 35 mm Schalen gezüchtet wurden. Allen Medien wurden 0,1 mg/ml Gentamycin und 1,25 µg/ml Fungizone zugesetzt. Die Wachstumsmedien erhielten zudem noch FBS, bzw. FBS und HS.

Wachstumsmedien

- **DMEM[-] mit P**
Basismedium 93,5 % (v/v), FBS 5 % (v/v), Gentamycin 1,0 % (v/v), Fungizone 0,5 % (v/v)
- **DMEM[+] mit P**
Basismedium 93,5 % (v/v), FBS 5 % (v/v), Gentamycin 1,0 % (v/v), Fungizone 0,5 % (v/v)
- **Ham's F-10**
Basismedium 81 % (v/v), FBS 15 % (v/v), HS 2,5 % (v/v), Gentamycin 1,0 % (v/v), Fungizone 0,5 % (v/v)
- **56°-Medium (Astrozytenkultur)**
Basismedium 89 % (v/v), FBS 10 % (v/v), Pen/Strep 1 % (v/v). Das FBS wurde nach dem

Auftauen auf 56 °C erhitzt, 30 min bei max. g und Raumtemperatur zentrifugiert, steril filtriert und dann verwendet.

- **53°-Medium (Mikrogliakultur)**

Basismedium 89 % (v/v), FBS 10 % (v/v), Pen/Strep 1 % (v/v). Das FBS wurde nach dem Auftauen auf 44-53°C erhitzt, 30 min bei max. g und Raumtemperatur zentrifugiert, steril filtriert und dann verwendet.

Versuchsmedium

- **DMEM[-] ohne P**

Basismedium 98,5 % (v/v), Gentamycin 1,0 % (v/v), Fungizone 0,5 % (v/v)

Lösungen

- **PBS-Puffer (phosphate buffered saline) nach Dulbecco® ohne Ca²⁺ und Mg²⁺**

mit: NaCl (Merck) 8000 mg/l, KCl (Merck) 200 mg/l, Na₂HPO₄ (Merck) 1150 mg/l, KH₂PO₄ (Merck) 200 mg/l, in 1 l ultra pure H₂O gelöst und steril filtriert; pH-Wert 7,4

- **Trypsin-EDTA-Lösung**

Die 10fach konzentrierte Trypsin-Lösung wurde in 1 ml Portionen abgefüllt und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Vor Gebrauch wurden die Portionen mit auf 37 °C erwärmten PBS-Puffer ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ im Verhältnis 1:10 verdünnt.

- **Dissoziationslösung**

10 ml DMEM[-] mit P, 24 mg HEPES, 20 mg Trypsin, 2 mg EDTA, steril filtriert

- **Dulbecco® PBS-Puffer ohne Ca²⁺ und Mg²⁺**

- **DNase Stammlösung**

10 mg DNase in 1 ml Aqua dest. steril gelöst, vor Gebrauch mit PBS auf 1 mg/ml verdünnt

2.3 C6-Zellen Zellkultur

2.3.1 C6-Zellen

Die Astrogloma-Zellkulturlinie C6 wurde 1968 aus einem primären Rattenhirntumor, der durch N-Nitrosomethylharnstoff induziert wurde, von Benda et al. (1986) etabliert. Die Zellen wurden 1999 von der American Typ Culture Collection (ATCC: No. CCL-107, Manassas, Virginia, USA) in der 37. Passage bezogen, dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff für den weiteren Gebrauch gelagert. In den Experimenten wurden die C6-Gliomazellen der Passagen 44 bis 60 (P44 - P60) verwendet.

2.3.2 Kultivierung

Die Erhaltungskulturen wurden in 25 cm² Kulturflaschen mit 7 ml Wachstumsmedium (DMEM[-] mit P) bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank (Heraeus) kultiviert, zweimal pro Woche wurde das Wachstumsmedium gewechselt und einmal wöchentlich passagiert. Beim Passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und danach mit 5 ml des 37 °C warmen PBS-Puffer ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ gespült. In die Kulturflaschen wurden zum Ablösen der Zellen 5 ml der ebenfalls 37 °C warmen Trypsin-Lösung gegeben, welche nach 1 min wieder abgesaugt wurde. Die Kulturflaschen kamen für etwa 5 min in den Brutschrank. Nach erfolgreicher Ablösung des Zellrasens wurden 5 ml kaltes Wachstumsmedium zur Inaktivierung des Trypsins in die Flasche gefüllt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension hergestellt, die in einem Falcon-Röhrchen auf Eis gelegt wurde. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Thoma-Kammer in einer Mischung von 100 µl Zellsuspension und 100 µl Trypanblau-Lösung (Merck) ermittelt, tote Zellen konnten aufgrund ihrer Blaufärbung ausgeschlossen werden. Je nach Bedarf wurden 100.000 bis 4.000.000 Zellen in neue 25 cm² Kulturflaschen mit 7 ml Wachstumsmedium ausgesät. Zeitgleich wurden, je nach Versuchsanordnung (siehe Kapitel 2.5), verschiedene Zelldichten in die 35 mm Schalen mit 1,5 ml Wachstumsmedium gesät.

2.4 Gliazellen Zellkultur

2.4.1 Astrozyten und Mikroglia

Die Astrozyten und Mikroglia wurden im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aus den Gehirnen neonataler Wistar-Ratten (aus dem Viktor-Hensen-Tierhaus, 1-3 Tage alt) gewonnen. Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte stets bei 37 °C und 7,8 % CO₂.

2.4.2 Herstellung der primären Hirnzellkultur und Kultivierung

2.4.2.1 Präparation der primären Hirnzellkultur

Die neonatalen Wistar-Ratten (P0 - P2) wurden mit dem Skalpell hinter den Ohren dekapitiert. Mit Schere 1 wurde die Kopfhaut T-förmig von kaudal nach kranial durchtrennt. Mit Schere 2 wurde vom Foramen magnum aus die Kalotte möglichst dicht unter der Oberfläche T-förmig durch- und abgetrennt. Die Gehirne wurden danach von rostral mit dem Spatel herausgeschabt und in einem Becherglas mit PBS gesammelt. Die Gehirne wurden mit dem Sieblöffel in drei 35 mm Schälchen gespült und in die große 90 mm Kulturschale unter dem Binokular auf schwarzer Gummifolie überführt. Die Cortexhälften wurden mit der Pinzette vom Hirnstamm

abgetrennt und Hippocampus, Plexus choroideus, Reste vom Bulbus olfactorius, Blutgefäße und Meningen entfernt. Die Cortexhälften wurden mit dem Sieblöffel in zwei weitere 35 mm Schälchen mit PBS überführt und mechanisch mit dem feinen Skalpell in ca. 1 mm³ große Gewebestückchen zerkleinert. Anschließend erfolgte zum Absetzen die Verteilung mit einer Plastikpipette in die entsprechenden Reagenzgläser und der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Es wurden jeweils 3 ml der Dissoziationslösung und 25 µl DNase-Lösung (1 mg/ml) zur enzymatischen Dissoziation in die Reagenzgläser gegeben und geschüttelt, für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und einmal nach 15 min geschüttelt. Der Überstand wurde mit einer neuen Pasteurpipette abgesaugt. 2 ml DMEM-Basismedium mit Phenolrot (DMEM[-] mit P) mit FBS und 50 µl DNase-Lösung wurden hinzugegeben und die Zellen zuerst mit grober und dann mit feiner Pasteurpipette ca. sechsmal mechanisch dissoziiert.

2.4.2.2 Herstellung der Astrozytenkultur

Für die Astrozytenkultur wurden nur die Zellen der Hemisphären in 25 cm² Kulturflaschen mit je 8 ml 56°-Medium mit 8 µl Amphotericin B, welches die Mikroglia proliferation hemmen soll, ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage mit jeweils 8 µl Amphotericin B (übers Wochenende allerdings ohne Amphotericin B). Am 8.-9. Tag wurden dann die Kulturflaschendeckel mit Parafilm umwickelt und die Kulturflaschen mit weißem Klebeband auf dem Schüttler parallel zu den Metallbügeln befestigt und die Zellen über Nacht auf dem Boden stark geschüttelt (200 rpm, Diameter von 5 cm), um vor allem die Oligodendrozyten abzuschütteln, die sich dann besonders leicht von der Oberfläche des Zellmonolayers durch einen Medienwechsel entfernen lassen (Standardverfahren nach McCarthy und DeVellis (McCarthy and de Vellis, 1980)). Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt, Amphotericin B und Fluorodesoxyuridin (FDU, 10 µM) hinzugegeben. Das FDU sollte schnellproliferierende Zellen wie Fibroblasten in den Kulturen reduzieren. Nach einem Tag wurde der Medienwechsel ohne Amphotericin B, aber mit 10 µM FDU wiederholt. Die erste Subkultivierung der aufgereinigten Astrozytenversuchskultur erfolgte drei Tage später: zur Präplattierung wurden die Zellen in 75 cm² Kulturflaschen mit 12 ml Medium überführt und für 10 min in den Brutschrank gestellt. Da sich Mikroglia schneller am Boden absetzten als andere Zellen, konnten die Astrozyten in den Überständen dann abgenommen werden und mit je 30.000 Zellen/cm² in 35 mm Versuchschälchen überführt werden. Der Medienwechsel erfolgte 14 Tage lang jeden 2. bis 3. Tag mit je 2 ml 56°-Medium pro Schälchen. Die mit dieser Methode erhaltenen Astrozytenkulturen enthalten einen Anteil von < 0,5 % Mikroglia, da die Reinheit der Astroglia kulturen entscheidend ist, da schon relativ kleine Mengen von Mikroglia Einfluss auf die Astrozyten haben (Röhl et al., 2008).

2.4.2.3 Gewinnung von Astrozyten-konditioniertem Medium

Zur Herstellung von Astrozyten-konditioniertem Medium wurden die Astrozyten in 75 cm² Kulturflaschen mit je 20-40 ml 56°-Medium ausgesät. Das Medium auf konvluenten Astrozyten konnte nach 24 h für die Mikroglia-Primärkultur verwendet werden. Der Medienwechsel erfolgte dreimal pro Woche (310 µl/cm²).

2.4.2.4 Herstellung der Mikrogliakultur

Für die Mikrogliakultur wurden die Zellen der Hemisphären und des rostralen Mesencephalons in 75 cm² Kulturflaschen mit 10 ml 53°-Medium ohne Amphotericin B ausgesät. 10 Tage lang erfolgte die Kultivierung mit Medienwechsel alle 2-3 Tage. Über die nächsten 3-4 Wochen wurden die aufschwimmenden Mikrogliazellen wöchentlich abgeschüttelt und gepoolt, 5 min bei Raumtemperatur und 700 g abzentrifugiert, 100.000 Zellen/cm² in 75 cm² Kulturflaschen replattiert und in Astrozyten-konditioniertem Medium (310 µl/cm²) für 3 Tage kultiviert, um die Mikrogliazellen in möglichst ruhendem Zustand zu erhalten.

2.4.2.5 Gewinnung von Mikroglia-konditioniertem Medium

Die Mikrogliaulturen wurden nach drei Tagen in Kultur mit 25 ml 53°-Medium pro 75 cm² Flasche mit und ohne LPS (0,02 µg/ml) für 24 h inkubiert. Danach wurde das von den LPS-behandelten Mikrogliazellen-konditionierte Medium (MKM[+]) und das Medium der nicht behandelten Mikrogliazellen (MKM[-]) gesammelt. LPS ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und wird als klassischer Stimulator von Mikroglia verwendet. Als Nachweis für die Aktivierung der Mikrogliazellen wurde Stickstoffmonoxid (NO) herangezogen. Die NO-Konzentration wurde in Form des Reaktionsproduktes Nitrit mit dem Griess-Reagenz photometrisch bestimmt. Nur LPS konditionierte Medien von aktivierten Mikrogliazellen, die mindestens 5 µmol/l NO produzierten, wurden für die weiteren Versuche verwendet. Aus jeweils sechs unabhängigen Präparationen gewonnenes MKM[+] wurde gepoolt. Die Mikroglia-konditionierten Medien (MKM[+] und MKM[-]) wurden steril filtriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.5 Vorbehandlung der Versuchskulturen für die Messung der Peroxidelimination

Die C6-Astrogliazellen und die primären Astrozyten wurden für die Messungen ab ihrer Aussaat in den 35 mm Versuchsschälchen unterschiedlich weiter behandelt. Wie sich im Laufe der ersten Messungen zeigte, spielten die Bedingungen, unter denen die Zellen kultiviert

wurden, eine große Rolle. So wurden neben dem DMEM[-] mit P Wachstumsmedium, welches in der Zellkultur der Toxikologie standardmäßig verwandt wird, auf das in früheren Messreihen benutzte Ham's F-10 Wachstumsmedium, zurückgegriffen. Auch wurde den Zellen zur Enzymaktivierung oder -deaktivierung verschiedene Modulatoren ins Medium gegeben. Die Astrozyten wurden nicht nur in 56°-Medium, sondern auch in Mikroglia-konditionierten Medien gezüchtet, um zu untersuchen ob die Eliminationsfähigkeit von Peroxiden durch aktivierte Mikroglia beeinflusst wird. Die Vorgehensweise der verschiedenen Kultivierungsmethoden der Versuchskulturen in den 35 mm Schälchen wird in den folgenden Abschnitten (2.5.1 bis 2.5.5.) beschrieben.

2.5.1 C6-Zellen in DMEM Wachstumsmedium

Die Erhaltungskultur wurde in DMEM[-] mit P Wachstumsmedium kultiviert (Normalbedingung). Die C6-Zellen wurden mindestens zwei Tage vor dem Messtag in 35 mm Schälchen mit der gewünschten Zelldichte, zwischen 50.000 und 800.000 Zellen pro Schale, gesät. Die Zellen wurden dann in 1,5 ml Wachstumsmedium (DMEM[-] mit P) kultiviert. Die Peroxid-Exposition und Messung erfolgte nach mindestens 48 h (siehe Abbildung 2.1).

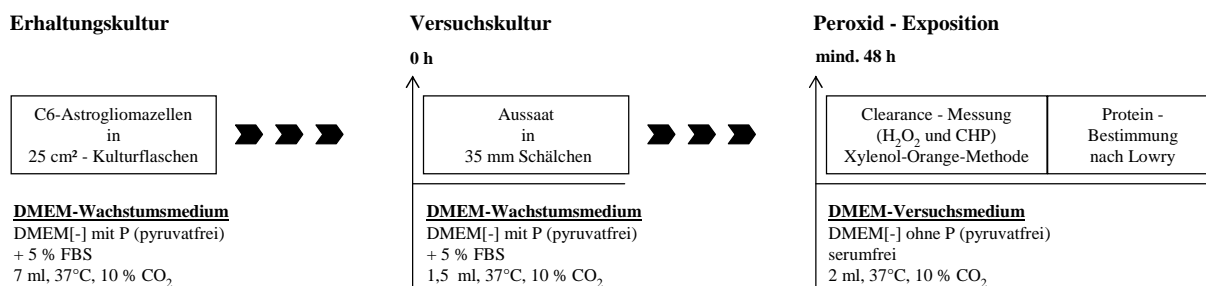


Abbildung 2.1 – Schema des Versuchsaufbaus bei Kultivierung der C6-Zellen in DMEM Wachstumsmedium. Die Vorbehandlung bis zur Versuchsdurchführung und die verwendeten Kulturmedien der C6-Zellen sind hier schematisch kurz zusammengefasst dargestellt.

2.5.2 C6-Zellen in Ham's F-10 Wachstumsmedium kultiviert

Die Kultivierung der C6-Zellen erfolgte eine Woche im Ham's F-10 Wachstumsmedium bei 5 % CO₂. Die Zellen wurden mindestens zwei Tage vor Versuchsbeginn in die 35 mm Schälchen gesät und in 1,5 ml des DMEM Wachstumsmedium (DMEM[+] mit P) bei 5 % CO₂ kultiviert. Die Peroxid-Exposition und Messung erfolgte nach mindestens 48 h (siehe Abbildung 2.2).

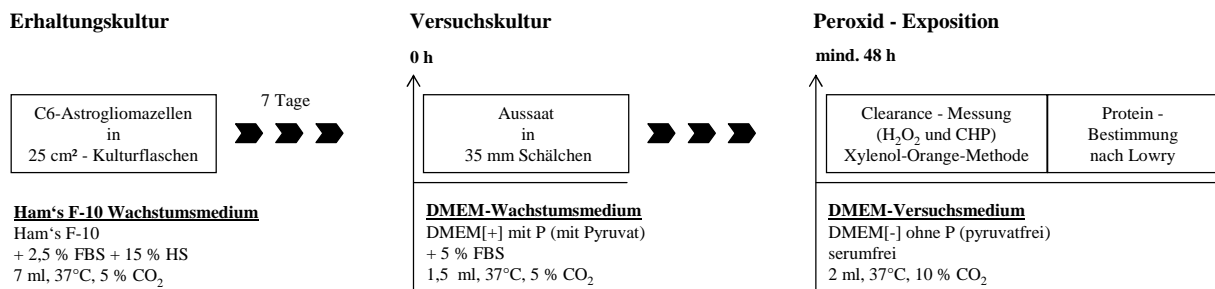


Abbildung 2.2 – Schema des Versuchsaufbaus bei Kultivierung der C6-Zellen in Ham's F-10 Wachstumsmedium. Die Vorbehandlung bis zur Versuchsdurchführung und die verwendeten Kulturmedien der C6-Zellen sind hier schematisch kurz zusammengefasst dargestellt.

2.5.3 Vorinkubation der C6-Zellen mit Enzymmodulatoren

Bei den Vorinkubationsversuchen wurden die C6-Zellen zu 400.000 Zellen pro 35 mm Schälchen mit DMEM Wachstumsmedium (DMEM[-] mit P) kultiviert, welches zu einem jeweils spezifischen Zeitpunkt vor der Messung mit der jeweiligen Testsubstanz versetzt wurde. Die Messungen erfolgten dann jeweils gegen eine Kontrollgruppe, deren Zellen unter normalen Bedingungen, wie in Kapitel 2.5.1 dargestellt, kultiviert wurden. Die Peroxid-Exposition und Messung erfolgte stets 72 h nach Aussaat in die Versuchsschale (siehe Abbildung 2.3).

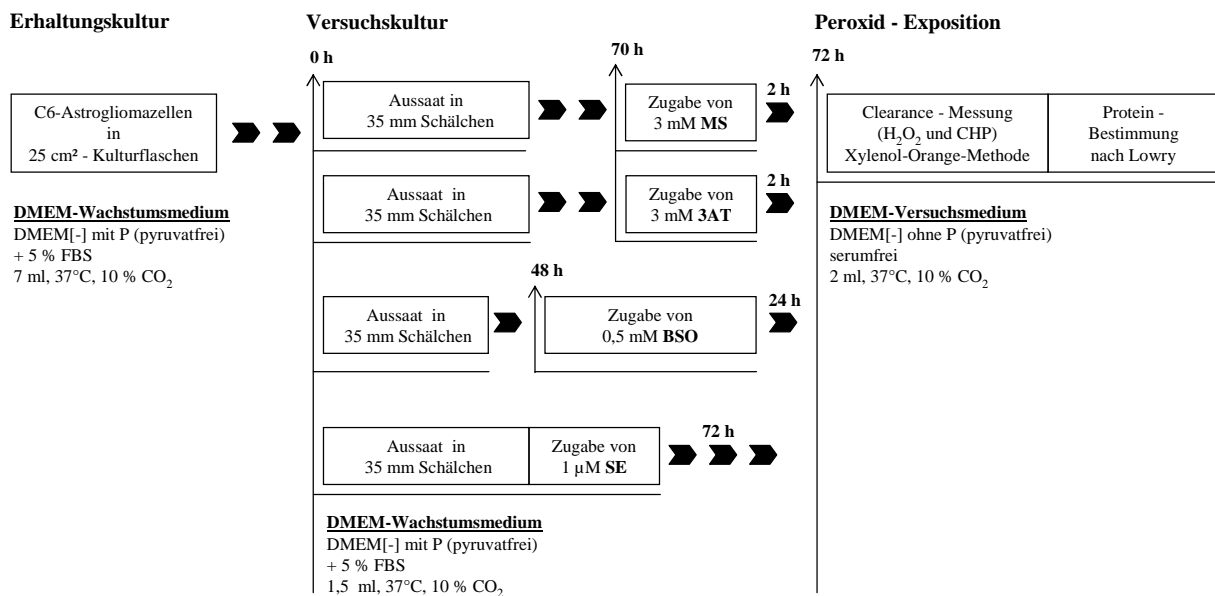


Abbildung 2.3 – Schema des Versuchsaufbaus bei Vorinkubationen mit Enzymmodulatoren der C6-Zellen in DMEM Wachstumsmedium. Die Vorbehandlungen der Versuchsschälchen mit den vier Testchemikalien bis zur Versuchsdurchführung und die verwendeten Kulturmedien der C6-Zellen sind hier schematisch kurz zusammengefasst dargestellt.

2.5.4 Astrozyten in 56° DMEM Wachstumsmedium kultiviert

Die Astrozyten wurden nach der Präplattierung mit je 30.000 Zellen/cm² in die 35 mm Versuchsschälchen überführt und 14 Tage kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte jeden 2. bis 3. Tag mit je 2 ml 56°-Medium pro Schälchen. Die Peroxid-Exposition und Messung erfolgte danach innerhalb der nächsten 3 bis 4 Tage (siehe Abbildung 2.4).

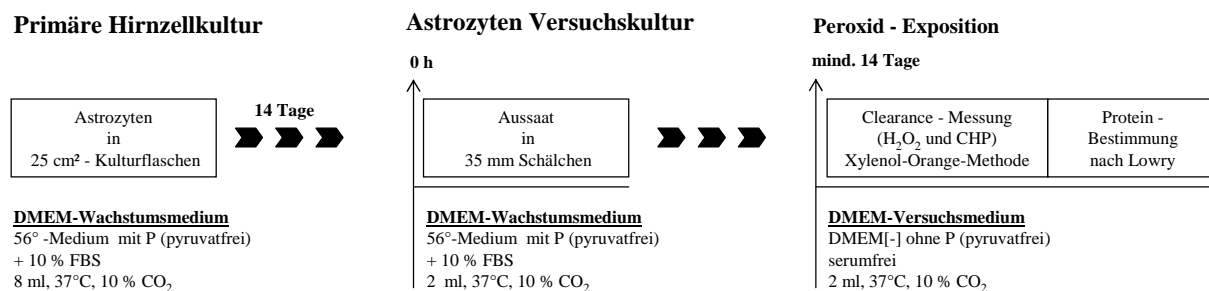


Abbildung 2.4 – Schema des Versuchsaufbaus bei Kultivierung der Astrozyten in 56°-DMEM Wachstumsmedium. Die Vorbehandlung bis zur Versuchsdurchführung und die verwendeten Kulturmedien der Astrozyten sind hier schematisch kurz zusammengefasst dargestellt.

2.5.5 Astrozyten in Mikroglia-konditionierten Medien kultiviert

Die Astrozyten wurden nach der Präplattierung mit je 30.000 Zellen/cm² in den 35 mm Schälchen in 2 ml 56°-Medium pro Schälchen 11 Tage kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte jeden 2. bis 3. Tag. Vom 11. bis 14. Tag erfolgte die Kultivierung der zu diesem Zeitpunkt konfluenten Astrozytenkultur in je 2 ml der folgenden Medien:

- **56°-Medium:** 56°-Medium
- **56°-Medium + LPS:** 56°-Medium mit LPS (0,02 µg/ml)
- **(MKM[-]):** Medium von nicht-stimulierter Mikroglia
- **(MKM[-] + LPS):** Medium von nicht-stimulierter Mikroglia mit LPS (0,02 µg/ml)
- **(MKM[+]):** Medium von LPS-aktivierter Mikroglia

Die Gewinnung der Mikroglia-konditionierten Medien (MKM) ist in Kapitel 2.4.2.5 beschrieben worden. Die Exposition mit Peroxiden und Messungen erfolgten somit nach 72 h Kultivierung in diesen Medien (siehe Abbildung 2.5).

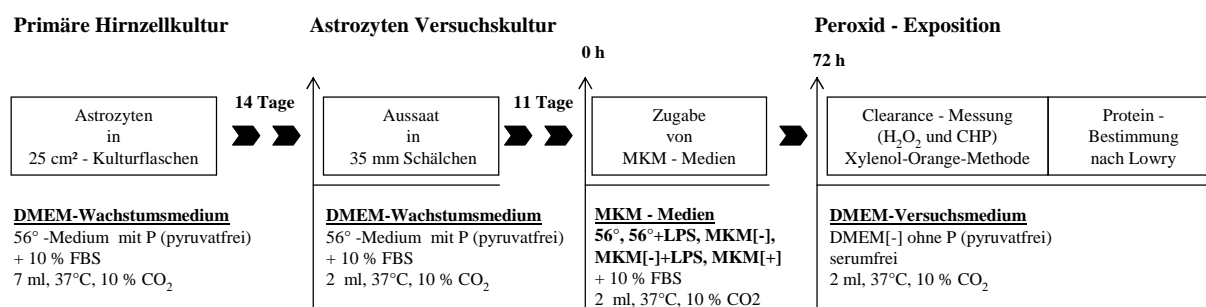


Abbildung 2.5 – Schema des Versuchsaufbaus bei Kultivierung der Astrozyten in Mikroglia-konditionierten Medien. Die Vorbehandlung, bis zur Versuchsdurchführung, und Kulturmedien der Astrozyten sind hier schematisch kurz zusammengefasst dargestellt

2.6 Messung der Elimination von Peroxiden

2.6.1 Theoretische Grundlagen

Michaelis-Menten Kinetik Im einfachsten Fall kann die Elimination einer Substanz durch Zellen in gleicher Weise wie die katalytische Umsetzung eines Substrats durch ein Enzym beschrieben werden, mit der sogenannten Michaelis-Menten Kinetik (Abbildung 2.6). Diese beschreibt die Abhängigkeit (siehe Gleichung 1) der Eliminationsgeschwindigkeit (V) von der Substratkonzentration (C):

$$V = \frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C} \quad (1)$$

wobei V_{max} für die maximale Eliminationsgeschwindigkeit steht, die eine Funktion der Enzym- bzw. in diesem Fall der Zellkonzentration ist, und K_m die Substratkonzentration bezeichnet, bei der die halbmaximale Eliminationsgeschwindigkeit erreicht wird. Das charakteristische einer Michaelis-Menten Kinetik ist, dass die Elimination hoher Substratkonzentrationen ($C \gg K_m$), nach einer Kinetik 0. Ordnung verläuft (Gleichung 2):

$$V = V_{max} \quad (2)$$

Die Elimination niedriger Substratkonzentrationen ($C \ll K_m$) aber nach einer Kinetik 1. Ordnung (Gleichung 3) verläuft:

$$V = \frac{V_{max}}{K_m} \cdot C \quad (3)$$

Die Fähigkeit von Zellen Substanzen zu eliminieren kann durch zwei Kenngrößen charakterisiert werden, die Eliminationskapazität und die intrinsische Clearance.

Die Eliminationskapazität [nmol Substanz/mg Zellprotein x min] entspricht der maximal möglichen Eliminationsrate V_{max} . Als intrinsische Clearance [ml/mg Zellprotein x min] wird konventionsgemäß der Proportionalitätsfaktor V_{max}/K_m zwischen Eliminationsgeschwindigkeit und Substratkonzentration im linearen Bereich der Michaelis-Menten Kinetik bezeichnet.

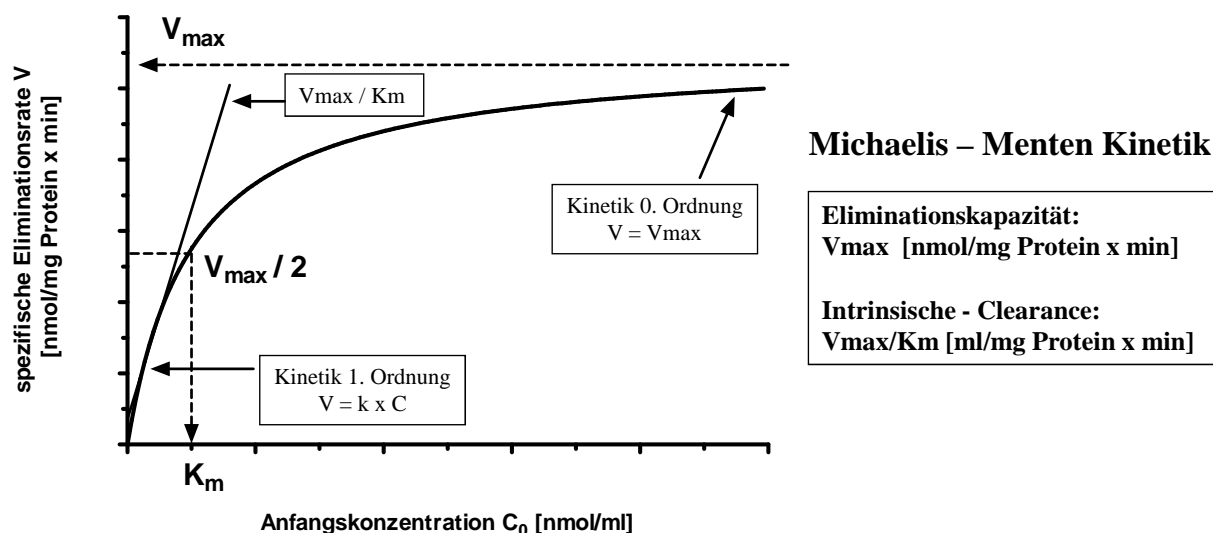


Abbildung 2.6 – Michaelis-Menten Kinetik: Graphische Darstellung einer Eliminationskurve, die der Michaelis-Menten Kinetik folgt. Die Eliminationsgeschwindigkeit nähert sich der maximal erreichbaren Eliminationsgeschwindigkeit V_{\max} .

V = Geschwindigkeit; C = Konzentration; k = Geschwindigkeitskonstante; K_m = Michaelis-Menten Konstante.

Kinetik 0.Ordnung Bei einer Kinetik 0.Ordnung ist die Eliminationsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration und konstant. Die Substratkonzentration (C) verringert sich mit einer gleichbleibenden Geschwindigkeit (V) (siehe Abbildung 2.7 A):

$$C = C_0 - Vt \quad (4)$$

In Gleichung 4 steht C_0 für die Anfangskonzentration der eliminierten Substanz und t für die Zeit.

Kinetik 1.Ordnung Bei einer Kinetik 1.Ordnung ist die Eliminationsgeschwindigkeit (V) proportional der Substratkonzentration (C):

$$V = k \cdot C \quad (5)$$

Wobei in Gleichung 5 k die 1.Ordnungs-Geschwindigkeitskonstante ist.

Die Verminderung der Substratkonzentration zeigt einen exponentiellen Zeitverlauf (siehe Abbildung 2.7 B):

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (6)$$

Die Eliminations-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) errechnet sich über folgende Gleichung (7):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (7)$$

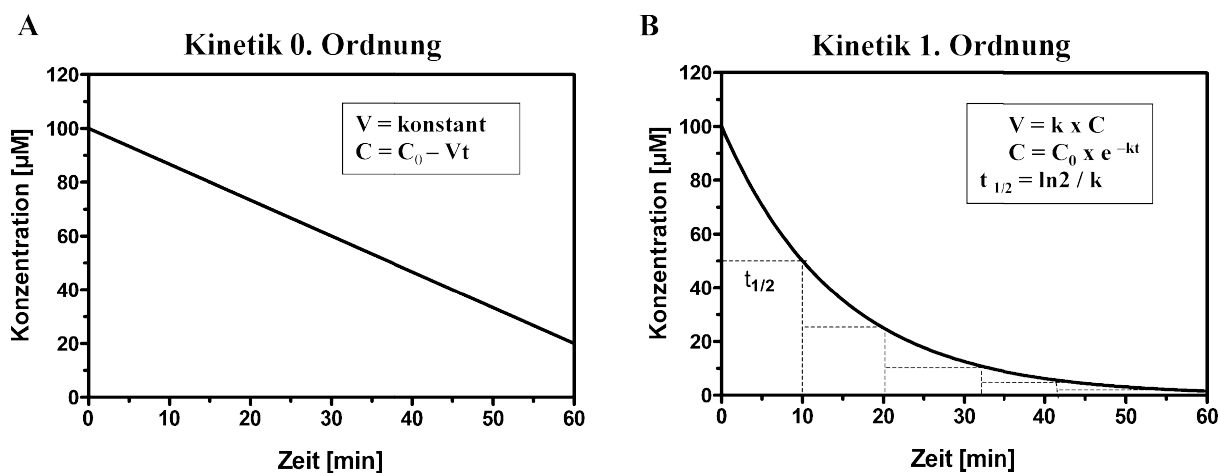


Abbildung 2.7 – Kinetik 0. Ordnung (A) und 1. Ordnung (B): Graphische Darstellung der Eliminationskurve der Kinetik 0. und 1. Ordnung. V = Geschwindigkeit; C = Konzentration; C_0 = Anfangskonzentration; t = Zeit; k = Geschwindigkeitskonstante; $t_{1/2}$ = Halbwertszeit

2.6.2 Vorgehensweise

2.6.2.1 Testsubstanzen

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Cumolhydroperoxid (CHP) wurden im Kühlschrank gelagert. Die Herstellung der Peroxidlösungen und der Verdünnungsreihen erfolgte am jeweiligen Versuchstag. Das jeweilige Peroxid wurde in dem serumfreien Versuchsmedium ohne Phenolrot (DMEM[-] ohne P), welches 24 h im Brutschrank zur pH-Wert Einstellung und zur Erwärmung auf 37 °C aufbewahrt wurde, gelöst und steril filtriert. Für die Eliminationsversuche mit H_2O_2 wurde die Originallösung (30 Gew. %, 8,818 M) mit dem Versuchsmedium in zwei Schritten auf eine 10 mM Stammlösung verdünnt. Aus dieser wurden alle weiter benötigten Konzentrationen, von 10 bis 5.000 µM, für die Eliminationsversuche hergestellt. Aus der CHP Originallösung wurde ebenfalls eine 10 mM Stammlösung hergestellt, aus welcher alle benötigten Konzentrationen für die Eliminationsversuche mit CHP, von 10 bis 500 µM, hergestellt wurden. Zeitgleich wurden die Peroxid-Standard Lösungen (Standard 1 bis 6: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µM) für die Xylenol Orange Methode angesetzt. Aus diesen wurde während der Messung im Mikrotiterplattenphotometer (BIO-Tek EL_x800_{uv}, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) die Standard-Eichgerade errechnet.

2.6.2.2 Versuchsdurchführung

Für alle zu testenden Zellen in den 35 mm Schälchen, ob C6-Zellen oder Astrozyten, ob in DMEM oder Ham's F-10 kultiviert, wurde stets ab Versuchsbeginn dieselbe Vorgehensweise angewandt. Die Vorbehandlungen und Vorbereitungen unterschieden sich, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, zum Teil jedoch erheblich. Parallel zu den Schälchen für die Eliminationsmessungen wurden stets 2 bis 3 Schälchen für die Proteinbestimmung unter denselben Kultivierungsbedingungen aufgezogen. Vor Versuchsbeginn wurde das phenolrothaltige Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 2 ml Versuchsmedium (DMEM[-] ohne P, serumfrei) gewaschen. Zum Zeitpunkt Null der Messung wurden stets 2 ml der zu messenden Peroxidkonzentration im Versuchsmedium auf die Zellen gegeben. Die Versuchskulturen wurden über den gesamten Messzeitraum im Brutschrank gelagert, außer zu den Zeitpunkten der Probenentnahme. Die 2 bis 3 Schälchen, für die, an einem späteren Messtag erfolgende Proteinbestimmung, wurden je zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gespült, ohne Flüssigkeit mit Parafilm umwickelt, und bei -20°C eingefroren. Die Probenentnahme von dreimal je $10\ \mu\text{l}$ Medium erfolgte nach gutem Durchmischen des Mediums an 3 verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Schälchen in 2,5 bis 20 Minuten-Abständen über einen Messzeitraum von 20 bis 120 min.

2.6.2.3 Xylenol Orange Methode

Die Xylenol Orange Methode, von Jiang et al. (1990) entwickelt und von Dringen et al. (1998) für Mikrotiterplatten modifiziert, ist eine photometrische Messung für die quantitative Bestimmung von H_2O_2 , CHP und anderen Peroxiden. In saurem Milieu besitzen Peroxide die Fähigkeit Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu oxidieren, welches mit Xylenol Orange zu einem farbigen Komplex reagiert (Absorptionsmaximum bei 540-580 nm). D-Sorbit katalysiert die Reaktion. Die Extinktion des farbigen Komplexes wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei 570 nm gemessen. Diese Methode hat sich als eine zuverlässige Möglichkeit erwiesen, die Kapazität des Peroxidabbaus von primär kultivierten neuronalen Zellen zu messen und ist auch auf andere Zelllinien anwendbar (Dringen and Hamprecht, 1997). Die Methode ist außerdem auf alle Fe^{2+} oxidierenden Systeme anwendbar. In diesem Versuch ist es jedoch höchst unwahrscheinlich, dass etwa intrazelluläre Komponenten die Messung beeinflussen, da das extrazelluläre Volumen 1000fach höher ist. Für die Versuchsdurchführung wurde pyruvatfreies Versuchsmedium verwendet, da Pyruvat mit Peroxiden reagiert (Andrae et al., 1985; Giandomenico et al., 1997). Auch ist das Versuchsmedium ohne FBS, da in diesem Albumin enthalten ist, welches ebenfalls mit Peroxiden reagieren kann. Folgende Lösungen wurden für die Versuchsdurchführung verwendet:

- **Schwefelsäure H_2SO_4** (Merck, 95-97 %)
Die 18 M H_2SO_4 wurde mit ultra pure H_2O versetzt und auf 25 mM verdünnt.
- **Reaktionslösung**
19,61 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt) mit 3,64634 mg D-Sorbit (Merck,

Darmstadt) und 15,212 mg Xylenol Orange (Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Chemikalien wurden unter Rühren in 100 ml 25 mM H₂SO₄ gelöst und in eine 250 ml Duranflasche gefüllt, welche mit Aluminiumfolie umwickelt wurde, um die lichtempfindliche Reaktionslösung zu schützen.

Zu Beginn der Messung wurde jedes Well der Mikrotiterplatte mit je 140 µl der 25 mM H₂SO₄ befüllt und die Blankwerte (Blk) und Peroxidstandard (St01 - St06) mit je 10 µl nach vorgegebenem Schema, in Abbildung 2.8 dargestellt, in die Wells pipettiert. Anschließend wurden die Messproben, dreimal je 10 µl, in bestimmten Zeitabständen aus den 35 mm Schälchen entnommen und in die vorgegebenen Wells (P01 - P16) pipettiert. Anschließend erhielt jedes Well 150 µl der Reaktionslösung und die Mikrotiterplatte wurde 45 min auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Die Extinktion des farbigen Komplexes wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei 570 nm gemessen und nach Bestimmung der Standard-Eichgeraden die Peroxidkonzentration in [µmol/l] berechnet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	St03	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	St03	Blk	A
B	Blk	St03	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	St03	Blk	B
C	Blk	St04	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	St04	Blk	C
D	Blk	St04									St04	Blk	D
E	St01	St05									St05	St01	E
F	St01	St05	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	St05	St01	F
G	St02	St06	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	St06	St02	G
H	St02	St06	P02	P04	P06	P08	P10	P12	P14	P16	St06	St02	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.8 – Pipettierschema der Xylenol Orange Methode. Dargestellt ist eine 96-Well Mikrotiterplatte mit der Anordnung der Messproben bei der Messung der Peroxidkonzentrationen mit der Xylenol Orange Methode. Blankwerte: Blk; Peroxidstandards: St01 – St06 (100; 50; 25; 12; 5; 6,25; 3,125 µM); Peroxid-Messproben: P01 - P16.

2.6.2.4 Bestimmung der Eliminationsgeschwindigkeit

Die in den Medienproben gemessenen Peroxidkonzentrationen wurden gegen die Zeit der Probenahme nach Zugabe der Peroxid versetzten Medien aufgetragen. Zur Ermittlung der Eliminationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$ (Anfangsgeschwindigkeit, V_0) wurden sie Messdaten der ersten 20 min mit Hilfe von GraphPadPrism 4 mit einer einfach exponentiellen Funktion (Gleichung 8) angepasst:

$$Y = Top \cdot e^{-kx} \quad (8)$$

Die Anfangsgeschwindigkeit wurde dann aus der angepassten Anfangskonzentration (T_{0p} , [$\mu\text{mol/l}$]) und der Geschwindigkeitskonstanten (k , [$1/\text{min}$]) errechnet (Gleichung 9):

$$V_0 = k \cdot T_{0p} \quad [M/\text{min}] \quad (9)$$

Die ermittelte Anfangsgeschwindigkeit (V_0) wurde auf die während der Exposition mit Peroxiden vorliegende Zellproteinkonzentration [$\text{mg Zellprotein /ml Kulturmedium}$] bezogen, um die von der Zellkonzentration unabhängige spezifische Eliminationsgeschwindigkeit V_S zu bestimmen:

$$V_S = \frac{\text{Anfangsgeschwindigkeit } V_0}{\text{Zellproteinkonzentration}} \quad [nmol/mg\text{Protein} \times \text{min}] \quad (10)$$

2.7 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) verwendet Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, Darmstadt), eine Lösung aus Natriumwolframat und –molybdat, Phosphor- und Salzsäure. In der Biuret-Reaktion entstehen zunächst im alkalischen Milieu in Anwesenheit von Kupfersulfat und Peptiden bzw. Proteinen Komplexe zwischen Cu^{2+} und Peptidbindung die so genannten Biuret-Komplexe. Proteine, d.h. im wesentlichen Tyrosin, Tryptophan und im geringen Ausmaß Cystin, Cystein und Histidin, reduzieren Wolframat und Molybdat zu verschiedenen reduzierten Formen mit charakteristischer blauer Farbe. Diese Reduktion wird durch den Biuret-Komplex erleichtert. Die Extinktion des farbigen Komplexes kann bei 630 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen werden. Als Proteinstandard wurde Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet. Für die Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen verwendet:

- **PBS-Puffer**
ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (siehe Abschnitt 2.2.2)
- **Biuretlösung**
48 Teile 4 % Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt) mit 1 Teil 2 % K-Na-Tartrat (Merck, Darmstadt) und 1 Teil 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt), die Bestandteile wurden in der aufgeführten Reihenfolge zusammengemischt, da es sonst zu Lösungsproblemen kommt.
- **Folinlösung**
1 Teil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz mit 1 Teil ultra pure H_2O versetzen
- **0,5 N NaOH**
1 Teil 1 N NaOH (20 mg NaOH ad 1 l H_2O) (Merck, Darmstadt) und 1 Teil ultra pure H_2O
- **Proteinstandards**
Die Stammlösung wurde aus 20 mg BSA in 5 ml ultra pure H_2O und 5 ml 1 N NaOH hergestellt. Die Stammlösung wurde mit 0,5 N NaOH auf folgende Konzentrationen

für die Standards verdünnt, Standard 1 bis 6 (St01 - St06): 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg BSA/ml. Die Proteinstandards wurden bereits vorrätig in 400 µl Portionen in Eppendorfhütchen bei -20 °C eingefroren.

Die Proteinbestimmung wurde unter unsterilen Bedingungen durchgeführt, die Biuret-Lösung wurde an dem jeweiligen Messtag stets frisch hergestellt. Für die Proteinmessung wurden die Zellen in den 35 mm Schälchen mit je 1 ml auf 37 °C vorgewärmte 0,5 N NaOH-Lösung 45 min lang auf dem Shaker-Inkubator (Inkubator 1000, Heidolph Instruments, Schwabach) aufgeschlossen. Die Proteinlösung wurde anschließend mit einer Pipette aufgesogen und in Eppendorfhütchen umgefüllt, bei Bedarf musste die Proteinlösung im Verhältnis 1:1 mit 0,5 N NaOH weiter verdünnt werden, da der Messbereich durch die Standard-Eichung vorgegeben war. Nun wurden jeweils 60 µl der Blankwerte (0,5 N NaOH), der gut durchmischten Standards und der Proteinproben, nach vorgegebenem Pipettierschema (siehe Abbildung 2.9) in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde je 150 µl der frisch angesetzten Biuret-Lösung dazugegeben und 10 min bei 37 °C auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Anschließend wurde je 60 µl Folinlösung in die Wells gegeben und durch sechsmaliges auf- und abpipettieren alles gut durchmischt. Nach weiteren 20 min bei 37 °C auf dem Shaker-Inkubator wurde die Messung bei 630 nm im Mikroplattenphotometer durchgeführt. Luftblasen in den Wells wurden, wenn vorhanden, vor der Messung weggeflammt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	St03	P01	P05	P09	P13	P17	P21	P25	P29	St03	Blk	A
B	Blk	St03	P01	P05	P09	P13	P17	P21	P25	P29	St03	Blk	B
C	Blk	St04	P02	P06	P10	P14	P18	P22	P26	P30	St04	Blk	C
D	Blk	St04	P02	P06	P10	P14	P18	P22	P26	P30	St04	Blk	D
E	St01	St05	P03	P07	P11	P15	P19	P23	P27	P31	St05	St01	E
F	St01	St05	P03	P07	P11	P15	P19	P23	P27	P31	St05	St01	F
G	St02	St06	P04	P08	P12	P16	P20	P24	P28	P32	St06	St02	G
H	St02	St06	P04	P08	P12	P16	P20	P24	P28	P32	St06	St02	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 2.9 – Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Lowry. Dargestellt ist eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit der Anordnung der Messproben bei der Proteinbestimmung nach Lowry. Blankwerte: Blk (0,5 N NaOH); Proteinstandards St01 – St06: 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg BSA/ml; Proteinproben: P01 – P32.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden mit Hilfe der aus den Standards ermittelten Eichgerade in Proteinkonzentrationen [mg/ml] umgerechnet. Aus diesen wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des ursprünglichen Gesamtvolumens der Proteinlösungen in

die Proteinmengen pro 35 mm Schälchen [mg/Schale] bestimmt. Die Proteinmenge pro Schale wurde auf das Volumen des Kulturmediums während der Exposition mit Peroxiden bezogen, um die Zellproteinkonzentration [mg/ml Medium] zu bestimmen. Die Zellproteinkonzentration wurde als Maß für die Zellkonzentration verwendet.

2.8 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Die Messergebnisse wurden mit GraphPadPrism4 graphisch dargestellt und mittels linearer bzw. nichtlinearer Regression angepasst. Um die Gleichheit von Mittelwerten zu prüfen, wurden der T-Test (zwei Gruppen) oder ANOVA (mehr als zwei Gruppen) durchgeführt und auf ein Signifikanzniveau von 5 % geprüft ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 C6-Zellen

Erhaltungs- und Versuchskulturen wurden unter Normalbedingungen mit DMEM[-] mit P Medium unter 10 % CO₂ kultiviert, soweit nicht anders im Text beschrieben wurde.

3.1.1 Elimination von Peroxiden aus dem Kulturmedium

Zu Beginn der Arbeit sollte untersucht werden, ob die C6-Zellen in der Lage sind Peroxide aus ihrem Medium zu entfernen. Es wurden hierfür in 35 mm Schälchen mit Zellen und einem Kontrollschälchen ohne Zellen nach Zugabe von 100 µM H₂O₂ bzw. CHP, die Peroxidkonzentration im Medium über den Zeitraum von einer Stunde gemessen. Abbildung 3.1 zeigt, dass

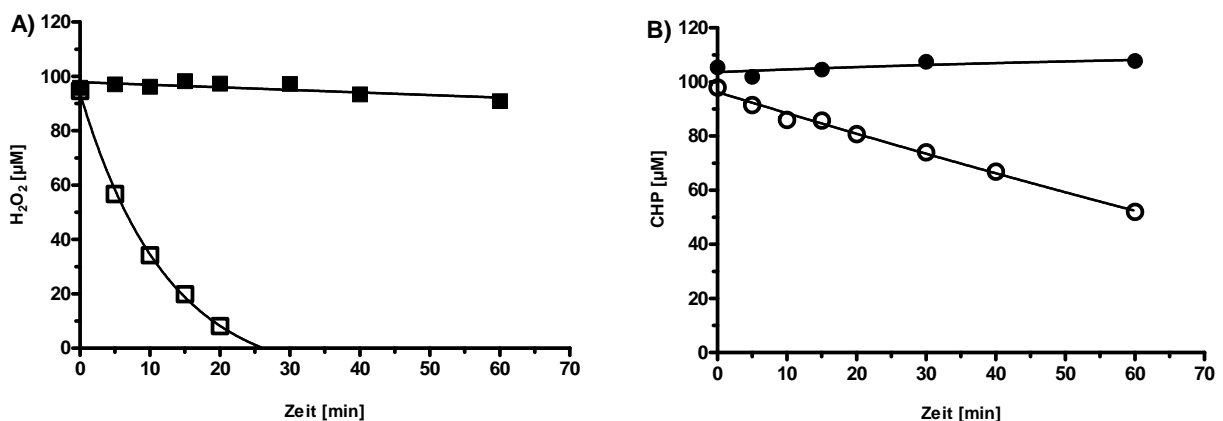


Abbildung 3.1 – Elimination von H₂O₂ und CHP durch C6-Zellen: Zeitverlauf der Konzentration von H₂O₂ (A) und CHP (B) im Kulturmedium von C6-Zellkulturen (□/○) und im zellfreien Kulturmedium (■/●). Je 100 µM H₂O₂ bzw. CHP wurden zum Zeitpunkt t=0 in die Kulturmedien gegeben. Dargestellt sind die Messergebnisse eines Versuches (n=1).

die Peroxidkonzentration im Kulturmedium in Anwesenheit von C6-Zellen rasch abnimmt, in Abwesenheit von Zellen aber zumindest für 1 h nahezu konstant bleibt. Das heißt, dass nur die Zellen für die Verminderung der Peroxidkonzentration verantwortlich sein können. Aus diesen Versuchen folgt, dass C6-Zellen in der Lage sind sowohl H₂O₂ als auch CHP aus dem Kulturmedium zu eliminieren. Vergleicht man den Zeitverlauf der Konzentrationsabnahme von H₂O₂ und CHP ist erkennbar, dass C6-Zellen H₂O₂ deutlich schneller eliminieren als CHP. Während 100 µM H₂O₂ nach etwa 25 min vollständig aus dem Medium verschwunden waren, waren nach 1 h von der gleichen Konzentration an CHP erst etwa 50 % eliminiert.

3.1.2 Einfluss der Zellkonzentration auf die Eliminationsgeschwindigkeit

Da an dieser Stelle klar ist, dass die C6-Zellen Peroxide eliminieren, stellt sich als nächstes die Frage von welchen Faktoren deren Eliminationsgeschwindigkeit abhängig ist. In der folgenden Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit von der Zellkonzentration untersucht, da Daten aus Messreihen mit primären neuronalen Zellkulturen (Dringen et al., 1999; Hirrlinger et al., 2002) darauf verweisen, dass diese einen Einfluss auf die Peroxid-Clearance hat. Hierfür wurden durch Einsaat unterschiedlicher Anzahlen von Zellen pro 35 mm Kulturschale Zellkulturen unterschiedlicher Zelldichte angelegt. Nach mindestens zwei Tagen Wachstum wurde in all diesen parallel angelegten Zellkulturen die Elimination von 100 μM H_2O_2 bzw. CHP gemessen. Die während der Exposition vorhandenen Zellkonzentrationen wurden durch die Konzentration an Zellprotein quantifiziert. Die Zellproteinkonzentration wurde aus der Zellproteinmenge [mg/Schale] und dem Medienvolumen während der Peroxidexposition [ml/Schale] berechnet.

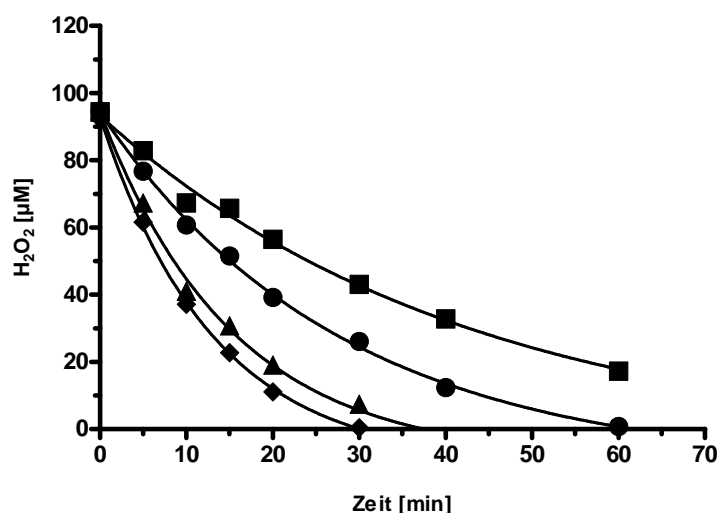


Abbildung 3.2 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 von der Zellkonzentration: Die Messreihe wurde mit einer Anfangskonzentration von je 100 μM H_2O_2 durchgeführt. Die Zellproteinkonzentrationen der 4 dargestellten Versuche waren: (■) 0,063 mg/ml, (●) 0,110 mg/ml, (▲) 0,222 mg/ml, (◆) 0,327 mg/ml. Jede Kurve zeigt den Konzentrationsabfall in einem Versuchsschälchen ($n = 1$).

Diese Versuche (Abbildungen 3.2 und 3.3) zeigen somit, dass die Eliminationsgeschwindigkeit mit steigender Zellkonzentration zunimmt. Es besteht somit eine direkte Abhängigkeit zwischen Eliminationsgeschwindigkeit und Zellkonzentration.

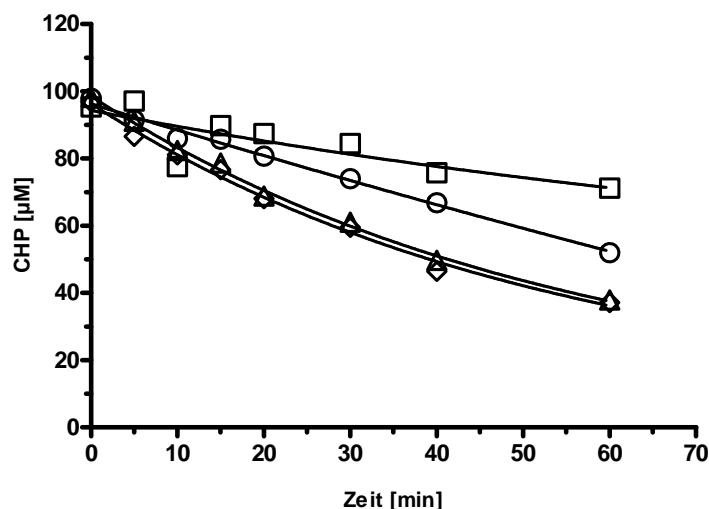


Abbildung 3.3 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von CHP von der Zellkonzentration: Die Messreihe wurde mit einer Anfangskonzentration von je 100 µM CHP durchgeführt. Die Zellproteinkonzentrationen der 4 dargestellten Versuche waren: (□) 0,027 mg/ml, (○) 0,065 mg/ml, (△) 0,159 mg/ml, (◇) 0,262 mg/ml. Jede Kurve zeigt den Konzentrationsabfall in einem Versuchsschälchen (n = 1).

3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit

In der nächsten Versuchsreihe sollte nun die Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von der Peroxidkonzentration untersucht werden. In dieser Versuchsreihe wurden die eingesetzten Anfangskonzentrationen der Peroxide variiert.

3.1.3.1 H₂O₂

Für H₂O₂ wurden Anfangskonzentrationen von 50 bis 5.000 µM angewandt (siehe Abbildung 3.4). In der Graphik sieht man, dass sich die Kurven bei höheren Konzentrationen einem Plateau annähern, das heißt, dass ab einer bestimmten Zeit die Peroxide nicht weiter abgebaut werden. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass die zytotoxische Wirkung der Peroxide die Elimination beeinträchtigt. Die halbmaximale zytotoxische Konzentration von H₂O₂ (EC₅₀-Wert) beider in diesen Versuchen vorhandenen Zellkonzentrationen (0,27 mg Zellprotein/ml) liegt bei etwa 100 µM (Kammann, 2009). Um die Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von der Peroxidkonzentration zu bestimmen, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt. Dazu wurden die ersten 20 min der Eliminationskurven mit einer einfach exponentiellen Funktion angepasst und aus den ermittelten Größen für die Anfangskonzentrationen (C₀) und die 1.Ordnungs-Geschwindigkeitskonstante (k), die Anfangsgeschwindigkeit (V₀) berechnet (siehe 2.6.2.4). Da durch die vorangegangenen Messungen bereits die Abhängigkeit der Peroxid-Clearance von der Zellproteinkonzentration bewiesen wurde, wurde diese Anfangsgeschwindigkeit (V₀, [µM/min]) auf die jeweilige Zellproteinkonzentration bezogen und die spe-

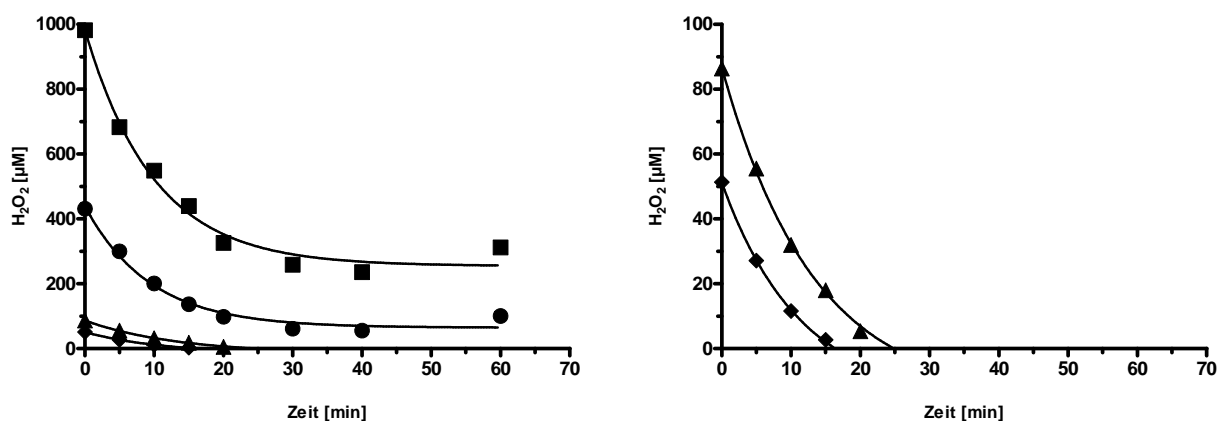


Abbildung 3.4 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von H₂O₂ von der Anfangskonzentration: Die eingesetzten Anfangskonzentrationen von H₂O₂ waren: 1000 µM (■), 500 µM (●), 100 µM (▲), 50 µM (◆). Die Zellproteinkonzentration von 0,27 mg/ml war in dieser Versuchsreihe in allen Schälchen identisch. Die Abbildungen zeigen die Messergebnisse mit 4 Versuchsschalen, wobei jede der Kurven je einen Versuch darstellt (n = 1). Die beiden kleinsten Konzentrationen sind noch einmal in der rechten Abbildung vergrößert dargestellt.

zifische Eliminationsgeschwindigkeit (V_S , [$\mu\text{mol}/(\text{mgZellprotein} \times \text{min})$]) ermittelt. Aus allen durchgeführten Messreihen wurden daraufhin die spezifischen Eliminationsgeschwindigkeiten (V_S) errechnet und in einem Diagramm auf die jeweilige Peroxid-Konzentration bezogen (siehe Abbildungen 3.5). Der Graph zeigt über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von H₂O₂, 50 - 5.000 µM, eine lineare Abhängigkeit der H₂O₂-Eliminationsgeschwindigkeit von der H₂O₂-Konzentration. Es wird bei einer Konzentrationen von 5.000 µM noch keine Sättigung erreicht. Das heißt, die Eliminationskapazität von C6 Zellen für H₂O₂ lässt sich aus diesen Messungen nicht ableiten. Sie liegt weit höher als 1500 [$\text{nmol H}_2\text{O}_2/(\text{mg Zellprotein} \times \text{min})$]. Aus dem linearen Verhältnis zwischen Eliminationsgeschwindigkeit und H₂O₂-Konzentration lässt sich jedoch die intrinsische Clearance von 0,3 [$\text{ml}/(\text{mgProtein} \times \text{min})$] ermitteln.

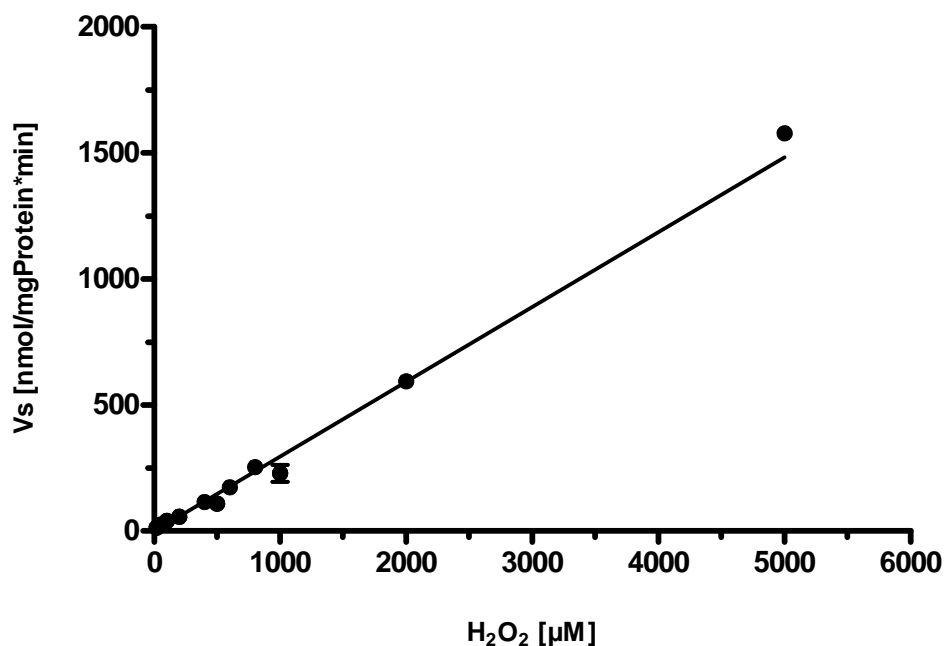


Abbildung 3.5 – Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der H_2O_2 -Konzentration: Angegeben sind Mittelwerte aus $n = 3 - 43$ unabhängigen Versuchen \pm SEM, außer für $2.000 \mu M H_2O_2$ $n = 2$ und für $5.000 \mu M$, $800 \mu M$, $600 \mu M$ und $400 \mu M H_2O_2$ $n = 1$. Die Daten wurden mittels linearer Regression angepasst ($Y = a + bx$): $a = -1,88 \pm 4,71$; $b = 0,297 \pm 0,006$; $r^2 = 0,9671$.

3.1.3.2 CHP

Für CHP wurden Anfangskonzentrationen von 20 bis 500 μM verwandt (siehe Abbildung 3.6). In dieser Versuchsreihe zeigten sich jetzt erstmalig deutliche Unterschiede zwischen H_2O_2 und CHP. Während H_2O_2 mit zunehmender Konzentration schneller eliminiert wurde (siehe Abbildung 3.4), verlief die Elimination von CHP bei allen untersuchten Konzentrationen nahezu gleich schnell, wie in Abbildung 3.6 am nahezu parallelen Verlauf der Eliminationskurven von 50 - 500 μM CHP zu erkennen ist. Aus allen durchgeführten Messreihen wurden daraufhin die spezifischen Eliminationsgeschwindigkeiten (V_S) errechnet und in einem Diagramm gegen die jeweilige CHP-Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 3.7).

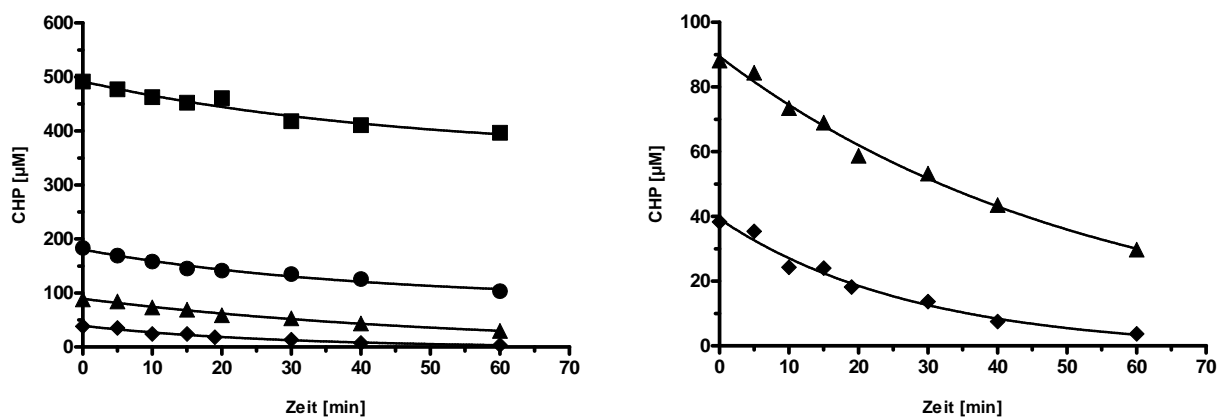


Abbildung 3.6 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von CHP von der Anfangskonzentration: Die eingesetzten Anfangskonzentrationen von CHP waren: 500 µM (■), 200 µM (●), 100 µM (▲), 50 µM (◆). Die Zellproteinkonzentration von 0,19 mg/ml war in dieser Versuchsreihe in allen 4 Schälchen identisch. Jede der Kurven stellt je einen Versuch dar (n = 1). Die beiden kleinsten Konzentrationen sind noch einmal in der rechten Abbildung vergrößert dargestellt.

In dieser Abbildung ist zu sehen, dass ab 100 µM CHP die Eliminationsgeschwindigkeit konstant und unabhängig von der CHP-Konzentration ist. Offensichtlich ist der Abbauweg für CHP, anders als der für H₂O₂, schon bei geringeren CHP-Konzentrationen (< 100 µM) gesättigt. Eine Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit der Michaelis-Menten Funktion ergab folgende Werte:

$$V_{\max} = 16,41 \pm 1,96 \text{ [nmol/(mgProtein} \times \text{min)]}$$

$$K_m = 19,2 \pm 14,6 \text{ [}\mu\text{M]}$$

Das entspricht einer Eliminationskapazität von C6-Zellen für CHP von 16,41 [nmol/(mgProtein x min)] und einer intrinsischen Clearance (V_{\max} / K_m) von 0,86 [ml/(mgProtein x min)]. Wie der sehr geringe Determinationskoeffizient ($r^2 = 0,07983$) zeigt, ist der angepasste K_m -Wert, und damit auch die berechnete intrinsische Clearance, sehr unsicher.

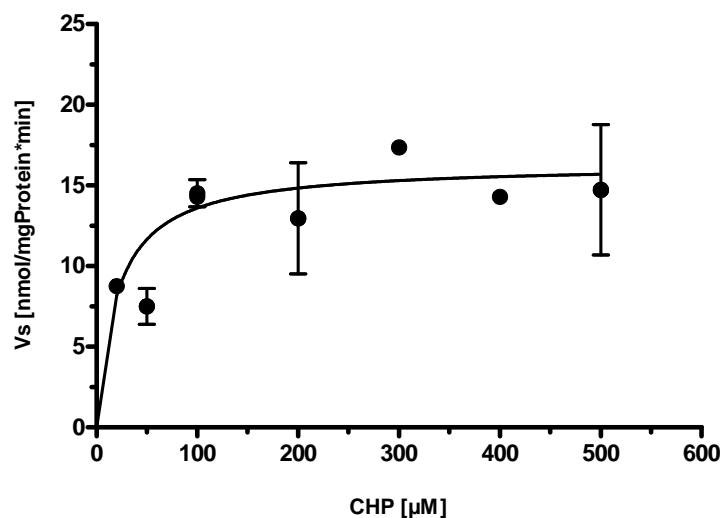


Abbildung 3.7 – Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der CHP-Konzentration: Dargestellt sind Mittelwerte aus $n = 3$ -32 unabhängigen Versuchen \pm SEM, wenn $n \geq 3$, außer für 300 μM , 20 μM CHP $n = 2$ und für 400 μM CHP $n = 1$. Die Daten wurden mit der Michaelis-Menten Gleichung angepasst, siehe Gleichung 1: $V_{\text{max}} = 16,41 \pm 1,96$ [nmol/mgProtein x min]; $K_m = 19,2 \pm 14,6$ μM ; $r^2 = 0,07983$.

3.1.4 Einfluss der Kulturbedingungen auf die Peroxidelimination

Das hier verwendete Medium bestand aus pyruvatfreiem DMEM-Wachstumsmedium (DMEM[-] mit P) mit 5 % FBS. C6-Zellen, die in diesem Wachstumsmedium kultiviert worden waren, erwiesen sich als deutlich empfindlicher gegenüber Peroxiden wie H_2O_2 und CHP als C6-Zellen die in Ham's F-10 Medium mit 15 % FBS und 2,5 % HS kultiviert worden waren. Die C6-Zellen aus dem serumreichen Ham's F-10 Medium hatten einen deutlich höheren Glutathiongehalt und zeigten eine deutlich höhere Glutathionperoxidaseaktivität als die C6-Zellen aus dem serumarmen DMEM-Medium (Brenner et al., 2010). Es sollte deshalb untersucht werden, ob diese Erhaltungskulturbedingungen die Peroxideliminationsfähigkeit der C6-Zellen beeinflusst. Um den Einfluss der Kultivierungsbedingungen von C6-Zellen genauer zu untersuchen wurden einige Zellen eine Woche lang in serumreichen Ham's F-10 Medium bei 5 % CO_2 gezüchtet. Unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen, wie der in DMEM-Wachstumsmedium kultivierten, wurden diese Ham's F-10 Zellen dann ebenfalls verschiedenen CHP Konzentrationen ausgesetzt. Da für den direkten Vergleich nur die ersten 20 min für die Bestimmung der Anfangskonzentration interessierten, wurde der Messzeitraum entsprechend angepasst und verkürzt. Zum Vergleich der unterschiedlichen Kulturbedingungen wurden die Ham's F-10 Zellen mit CHP-Konzentrationen von 10 bis 500 μM vergiftet und die Ergebnisse in Abbildung 3.8 dargestellt. Auch hier zeigte sich wieder, dass die C6-Zellen CHP aus dem Versuchsmedium eliminieren können und dass die Eliminationsgeschwindigkeit ab CHP-Konzentrationen > 100 μM konzentrationsunabhängig ist. Auch für diese Versuche wurden V_S -Werte ermittelt und in einem Diagramm (siehe Abbildung 3.9) über der CHP-

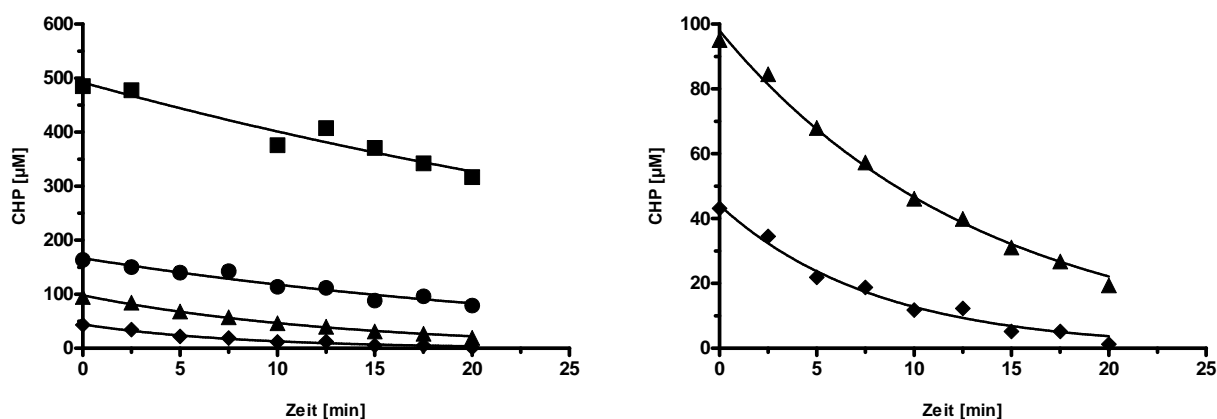


Abbildung 3.8 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von in Ham's F-10 Medium kultivierten Zellen von der Anfangskonzentration: Die eingesetzten Anfangskonzentrationen von CHP waren: 500 μM (■), 200 μM (●), 100 μM (▲), 50 μM (◆). Die Zellproteinkonzentration von 0,31 mg/ml war in dieser Versuchsreihe in allen 4 Schälchen identisch. Jede der Kurven stellt je einen Versuch dar ($n = 1$). Die beiden kleinsten Konzentrationen sind noch einmal in der rechten Abbildung vergrößert abgebildet.

Konzentration dargestellt. Die Abbaugeschwindigkeit scheint hier ebenfalls bei etwa 100 μM CHP ein Maximum zu erreichen und ist somit ebenfalls limitiert. Eine Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten mit der Michaelis-Menten Funktion ergab folgende Werte:

$$V_{\max} = 23,34 \pm 2,88 \text{ [nmol/(mgProtein} \times \text{min)]}$$

$$K_m = 11,7 \pm 9,9 \text{ [}\mu\text{M]}$$

Das Maximum beschreibt die Eliminationskapazität der Ham's F-10 Zellen für CHP von 23,34 [nmol/(mgProtein \times min)]. Die intrinsischen Clearance (V_{\max} / K_m) beträgt 2 [ml/(mgProtein \times min)] bei einem Determinationskoeffizient von $r^2 = 0,1839$. Die Eliminationskapazität von C6-Zellen für CHP ist demnach größer wenn sie in serumreichen Ham's F-10 Medium kultiviert werden, anstelle von serumarmem DMEM Medium. Inwieweit auch die intrinsische Clearance der C6-Zellen betroffen ist, lässt sich aus diesen Messungen nicht genauer ableiten, da die geringen Determinationskoeffizienten zeigen, dass die Anpassung mit einer Michaelis-Menten Kurve einen gewissen Spielraum offen lässt.

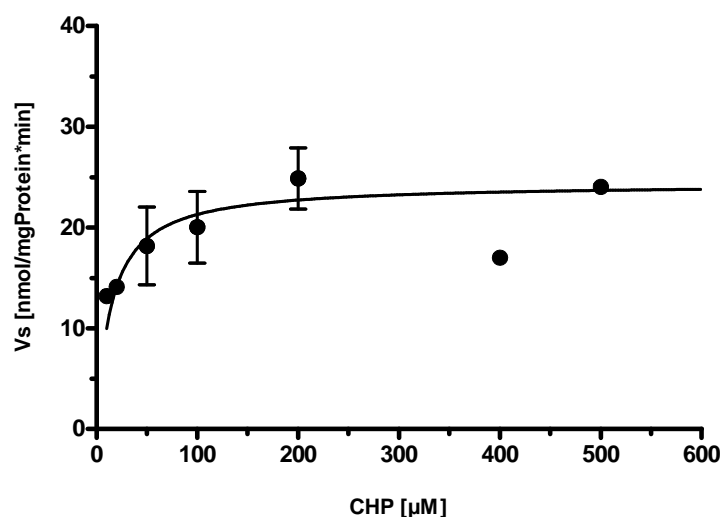


Abbildung 3.9 – Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der CHP-Konzentration: Dargestellt sind Mittelwerte aus $n = 3-4$ unabhängigen Versuchen \pm SEM, wenn $n \geq 3$, außer für $500 \mu\text{M}$ CHP $n=2$ und für $800 \mu\text{M}$, $400 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ CHP mit $n=1$. Die Daten wurden mit der Michaelis-Menten Gleichung angepasst (siehe Gleichung 1): $V_{\max} = 23,34 \pm 2,88$ [nmol/mgProtein x min]; $K_m = 11,7 \pm 9,9 \mu\text{M}$; $r^2 = 0,1839$.

3.1.5 Einfluss von Modulatoren antioxidativer Enzyme

Die Frage war, ob und in welchem Umfang Katalase und Glutathionperoxidase (GPx) an der Elimination von H_2O_2 und CHP durch die C6-Zellen beteiligt sind. Deshalb wurden die Zellen mit Modulatoren dieser Enzymsysteme vorbehandelt (siehe Kap. 2.5.3) und der Einfluss dieser Vorbehandlung auf die Geschwindigkeit, mit welcher die Zellen $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 bzw. CHP eliminieren können, untersucht. In den folgenden Messreihen wurden vier verschiedene Substanzen getestet, von denen jeweils bekannt ist in welches der beiden Enzymsysteme sie eingreifen: Mercaptobernsteinsäure (MS), 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT), Buthionin-sulfoximin (BSO) und Natriumselenit (SE).

3.1.5.1 Mercaptosuccinat (MS)

Mercaptosuccinat hemmt die Glutathionperoxidase (GPx). Durch Vorinkubation mit MS konnte die GPx-Aktivität in primär kultivierten Rattenastrozyten vermindert werden (Dringen und Hamprecht, 1997). C6-Zellen wurden 2 h lang mit 3 mM Mercaptosuccinat vorinkubiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass die Eliminationskurven der unbehandelten und MS-behandelten Kulturen sowohl für H_2O_2 als auch für CHP übereinander liegen. Die aus diesem und zwei weiteren Versuchen ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten der unbehandelten und der MS-behandelten C6-Zellen (statistischer Test, $p > 0,05$). Das deutet nicht zwingend darauf hin, dass die GPx für die Elimination von H_2O_2 und CHP keine Rolle spielt, da MS in den verwendeten Konzentrationen und Versuchsbedingungen keinen messbaren Einfluss auf die GPx ausgeübt haben könnte.

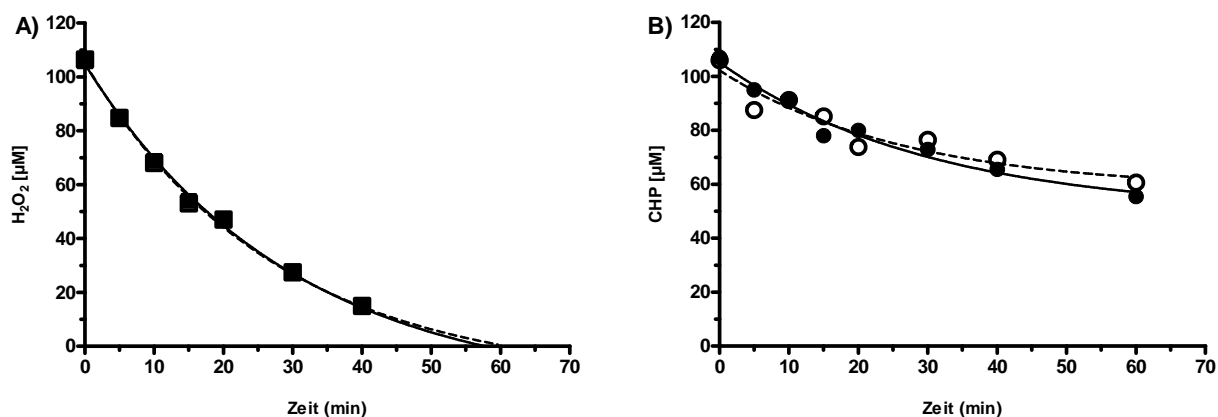


Abbildung 3.10 – Einfluss von Mercaptosuccinat (MS) auf die Elimination von H_2O_2 (A) und CHP (B) durch C6-Zellen: Unbehandelte Kontrolle (■/●), mit MS vorbehandelte C6-Zellen (□/○, gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 2 am selben Tag durchgeführten Versuchen mit C6-Zellen derselben Passage. Zellproteinkonzentrationen: Kontrolle: 0,11 mg/ml; MS: 0,12 mg/ml.

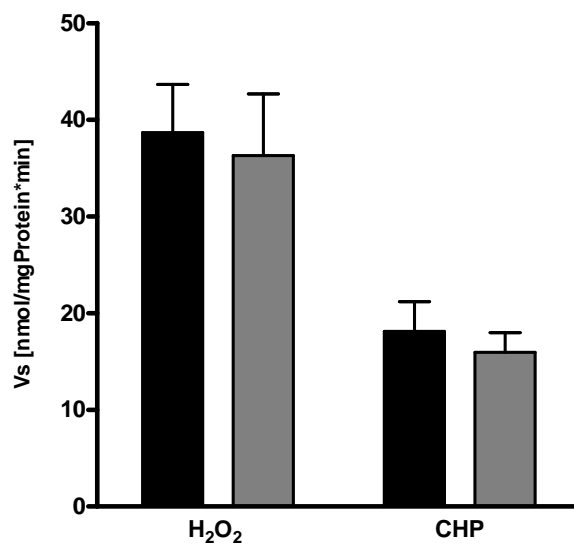


Abbildung 3.11 – Spezifische Geschwindigkeit (V_s) der Elimination von H_2O_2 bzw. CHP durch C6-Zellen ohne (Kontrolle (■)) bzw. nach Vorbehandlung mit Mercaptosuccinat (■): Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen unterschiedlicher Passagen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten der Kontrollen und der mit MS vorbehandelten Zellen (statistischer Test, $p > 0,05$).

3.1.5.2 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)

3-Amino-1,2,4-triazol hemmt die Katalase. Durch Vorinkubation mit 3AT wurde die Katalaseaktivität in primär kultivierten Ratten-Astrozyten stark vermindert (Dringen und Hamprecht 1997, Makino et al. 1994, Liddell et al. 2004). C6-Zellen wurden 2 h lang mit 10 mM 3-Amino-1,2,4-triazol vorinkubiert. Die Kurven für die H_2O_2 Elimination (siehe Abbildung 3.12) zeigen,

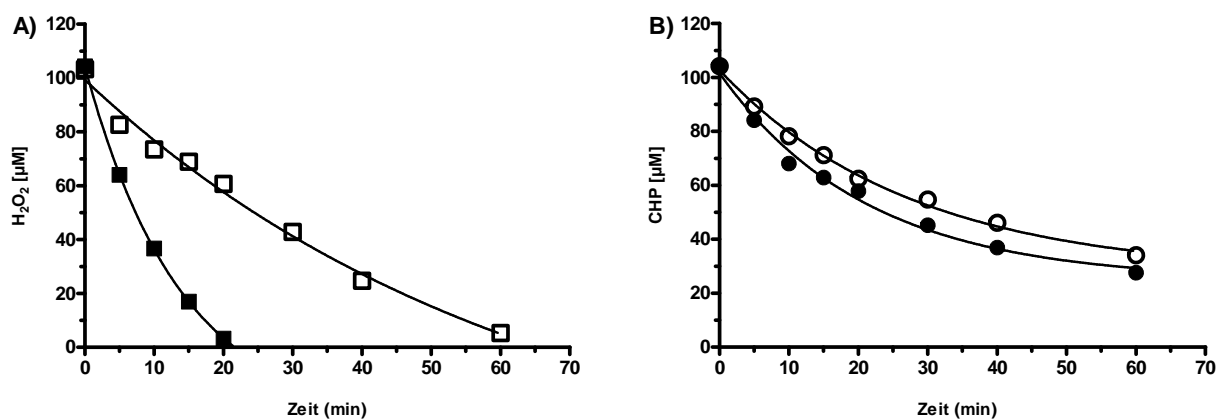


Abbildung 3.12 – Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die Elimination von H_2O_2 (A) und CHP (B) durch C6-Zellen: Unbehandelte Kontrolle (■/●), mit 3AT vorbehandelte C6-Zellen (□/○). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 2 am selben Tag durchgeführten Versuchen mit C6-Zellen derselben Passage. Zellproteinkonzentrationen: Kontrolle: 0,18 mg/ml; 3AT: 0,25 mg/ml.

dass 3AT einen hemmenden Effekt auf den H_2O_2 -Abbau ausübt. Die Kurve der 3AT-Gruppe verläuft deutlich flacher und oberhalb der Kontrollkurve, es wird somit langsamer und weniger H_2O_2 abgebaut. Der Einfluss von 3AT auf die CHP-Elimination ist relativ gering (siehe Abbildung 3.12) aber dennoch vorhanden, der CHP-Abbau ist somit ebenfalls reduziert. Das Balkendiagramm in Abbildung 3.13 verdeutlicht den signifikanten Unterschied (statistischer Test, * $p < 0,05$) zwischen den mit 3AT vorbehandelten C6-Zellen und den Kontrollreihen. Hier ist der deutlich größere Effekt auf die H_2O_2 Elimination gut erkennbar. 3AT, welches die Katalase hemmt, senkt also die Eliminationsgeschwindigkeiten für H_2O_2 deutlich ab. Aber auch für CHP ist hier ein den Abbau hemmender Effekt zu beobachten, was bedeutet, dass die Katalase auch für die CHP-Elimination mit verantwortlich sein muss.

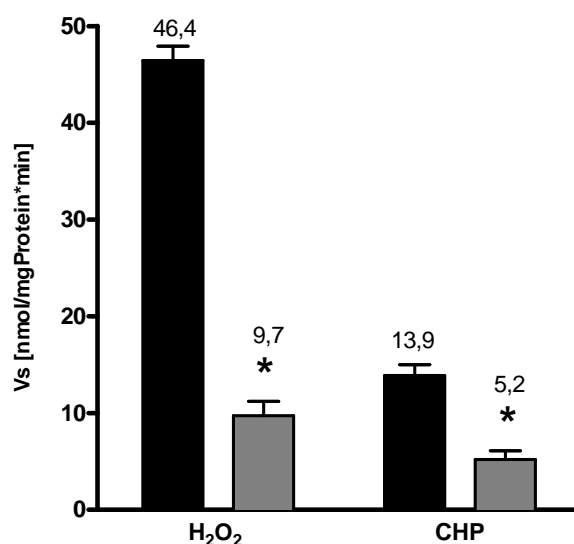


Abbildung 3.13 – Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination von H_2O_2 bzw. CHP durch C6-Zellen ohne (Kontrolle (■)) bzw. nach Vorbehandlung mit 3-Amino-1,2,4-triazol (■): Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen unterschiedlicher Passagen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten der Kontrollen und der mit 3AT vorbehandelten Zellen (statistischer Test, * $p < 0,05$).

3.1.5.3 Buthionin-sulfoximin (BSO)

Buthionin-sulfoximin verhindert die GSH-Synthese durch Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase. Durch Vorinkubation mit BSO konnte der zelluläre GSH-Gehalt von primär kultivierten Rattenastrozyten deutlich gesenkt werden und damit die Glutathionperoxidase-Aktivität (Brenner 2009, Liddell 2004, Dringen und Hamprecht, 1997). Die C6-Zellen wurden 24 h lang mit 0,5 mM Buthionin-sulfoximin vorinkubiert. In Abbildung 3.14 ist der Effekt von BSO auf die Zellen recht ähnlich. In beiden Diagrammen sind die BSO-Kurven oberhalb von den Kontrollgruppen gelegen und flacher im Verlauf, was bedeutet, dass der Abbau beider Peroxide durch die Behandlung mit BSO verlangsamt werden konnte. In dem Balkendiagramm in Abbildung 3.15 ist der signifikante Effekt (statistischer Test, * $p < 0,05$) den BSO auf V_S ausübt noch einmal dargestellt. Die Verminderung des zellulären GSH-Spiegels durch BSO betrifft offensichtlich den Abbau von H_2O_2 und den von CHP in ungefähr gleichem Ausmaß.

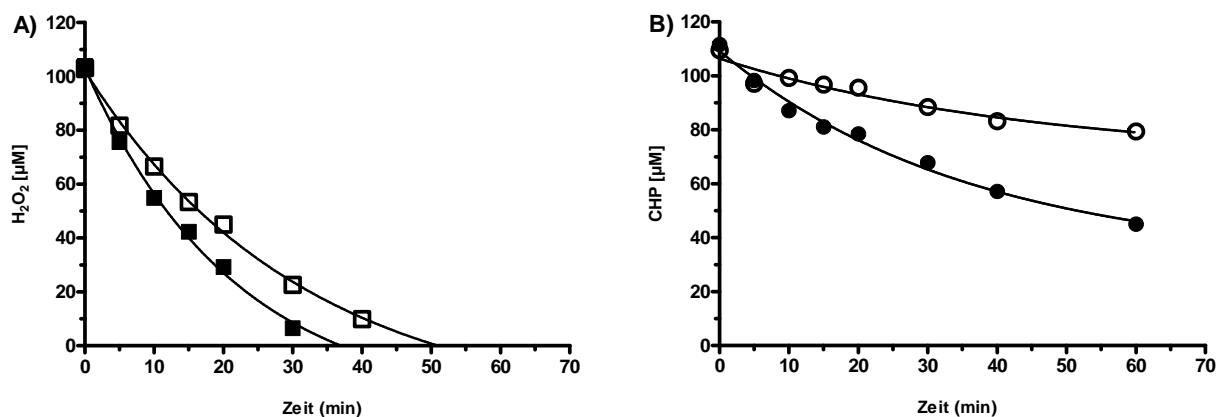


Abbildung 3.14 – Einfluss von Buthionin-sulfoximin (BSO) auf die Elimination von H₂O₂ (A) und CHP (B) durch C6-Zellen: Unbehandelte Kontrolle (■/●), mit BSO vorbehandelte C6-Zellen (□/○). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 2 am selben Tag durchgeführten Versuchen mit Zellen derselben Passage. Zellproteinkonzentrationen: Kontrolle: 0,18 mg/ml; BSO: 0,15 mg/ml.

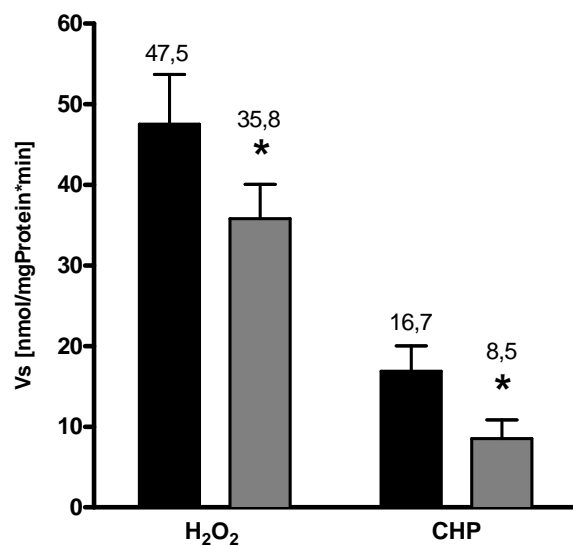


Abbildung 3.15 – Spezifische Geschwindigkeit (V_s) der Elimination von H₂O₂ bzw. CHP durch C6-Zellen ohne (Kontrolle (■)) bzw. nach Vorbehandlung mit Buthionin-sulfoximin (■): Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit C6-Zellkulturen unterschiedlicher Passagen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten der Kontrollen und der mit BSO vorbehandelten Zellen (statistischer Test, * $p < 0,05$).

3.1.5.4 Natriumselenit (SE)

Durch Vorinkubation mit Natriumselenit (SE) im Medium wurde die Glutathionperoxidase-Aktivität in HepG2 Zellen (Helmy et al., 2000) und verschiedenen anderen Zelllinien erhöht (Leist et al., 1996; Brenner, 2009). Die C6-Zellen wurden 72 h lang mit 1 μM Natriumselenit vorinkubiert. Auch SE hat einen Einfluss auf die Peroxid-Elimination. In beiden Graphen

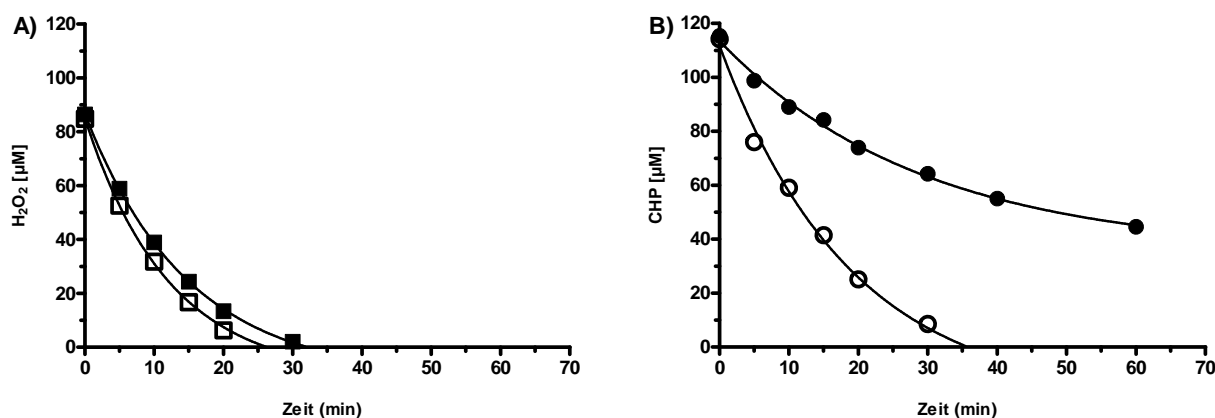


Abbildung 3.16 – Einfluss von Natriumselenit (SE) auf die Elimination von H_2O_2 (A) und CHP (B) durch C6-Zellen: Unbehandelte Kontrolle (■/●), mit SE vorbehandelte C6-Zellen (□/○). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 2 am selben Tag durchgeführten Versuchen mit C6-Zellen derselben Passage. Zellproteinkonzentrationen: Kontrolle: 0,19 mg/ml; SE: 0,19 mg/ml.

in Abbildung 3.16 liegt die SE-Kurve, im Gegensatz zu den beiden vorher betrachteten Substanzen 3AT und BSO, unter den Kontrollkurven und ist im Falle von CHP auch sehr viel steiler im Verlauf. SE erhöht also die Abbaugeschwindigkeiten, vor allem von CHP. Der direkte Vergleich von V_S aller Messwerte für SE im Balkendiagramm in Abbildung 3.17 zeigt einen signifikanten Unterschied (statistischer Test, $*p < 0,05$). SE, welches die GPx aktiviert, erhöht die Abbaugeschwindigkeiten von H_2O_2 und CHP, wobei ein größerer Effekt beim CHP-Abbau bewirkt werden konnte. Daraus folgt, dass die GPx nicht nur in den CHP-Stoffwechsel, sondern auch in den von H_2O_2 involviert ist.

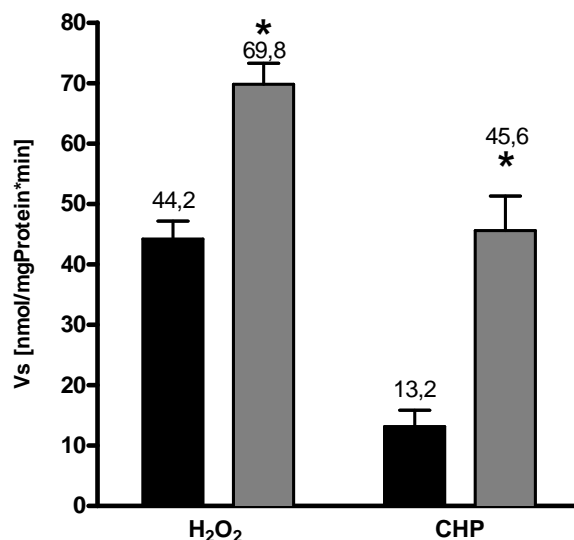


Abbildung 3.17 – Spezifische Geschwindigkeit (V_S) der Elimination von H_2O_2 bzw. CHP durch C6-Zellen ohne (Kontrolle (■)) bzw. nach Vorbehandlung mit Natriumselenit (■): Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit C6-Zellkulturen unterschiedlicher Passagen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten der Kontrollen und der mit SE vorbehandelten Zellen (statistischer Test, * $p < 0,05$).

3.2 Astrozyten

In den Messreihen mit der primären Astrozyten Kultur war es nun von Interesse zu sehen inwiefern sich Astrozyten von den C6-Zellen, die als Astrozytenmodelle verwendet werden, in ihrem Verhalten unterscheiden.

3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit

Anfangs wurde zunächst überprüft, ob auch die Astrozyten zum Abbau von Peroxiden befähigt sind und wie sie sich gegenüber verschiedenen Peroxid-Anfangskonzentrationen von 50 bis 2.000 μ M, verhalten.

3.2.1.1 H_2O_2

Die ersten Messreihen mit Astrozyten ergaben, dass diese H_2O_2 ebenfalls aus ihrem Medium eliminieren und dieses auch bis zu sehr hohen Konzentrationen taten. Auch bei Ihnen stieg mit Höhe der Anfangskonzentration die Eliminationsgeschwindigkeit an. In Abbildung 3.18 wurden die Eliminationskurven unterschiedlicher eingesetzter H_2O_2 Anfangskonzentrationen dargestellt. Nach schon beschriebenem Verfahren wurde auch hier wieder über eine einfache exponentielle Anpassung der ersten 20 min die Anfangsgeschwindigkeiten und daraus, auf die Zellproteinkonzentration bezogen, V_S berechnet. Diese Werte konnten in einem Diagramm (sie-

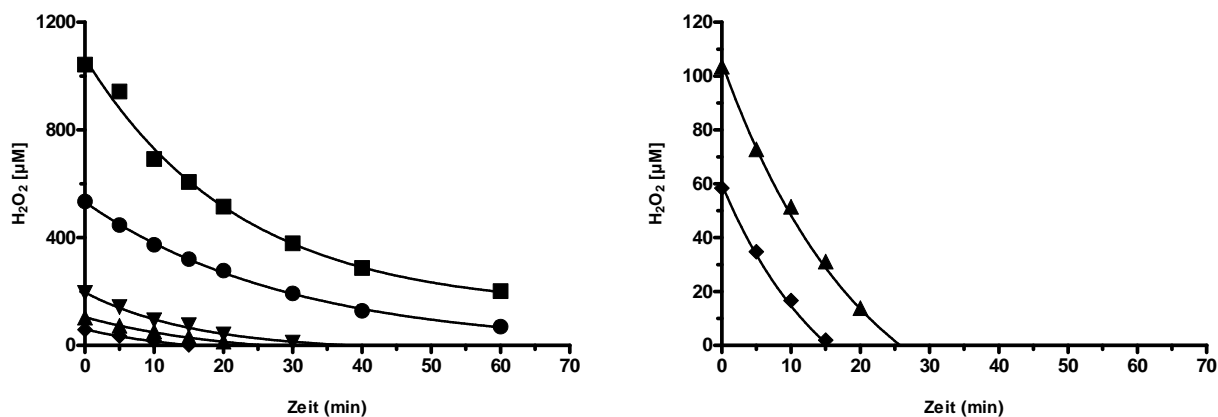


Abbildung 3.18 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 von der Anfangskonzentration: Die eingesetzten Anfangskonzentrationen von H_2O_2 waren: $1000 \mu\text{M}$ (■), $500 \mu\text{M}$ (●), $200 \mu\text{M}$ (▼), $100 \mu\text{M}$ (▲), $50 \mu\text{M}$ (◆). Die Zellproteinkonzentration von $0,19 \text{ mg/ml}$ war in dieser Versuchsschale in allen Schälchen identisch. Die Abbildungen zeigen die Messergebnisse mit 5 Versuchsschalen, wobei jede der Kurven je einen Versuch darstellt ($n = 1$). Die beiden kleinsten Konzentrationen sind noch einmal in der rechten Abbildung vergrößert dargestellt.

he Abbildung 3.19) in Bezug zur Konzentration gesetzt werden. Es zeigt sich auch hier, genau wie bei den C6-Zellen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen der H_2O_2 -Elimination und der Peroxidkonzentration besteht. Die Steigung dieser Geraden entspricht der intrinsischen Clearance der Astrozyten für H_2O_2 :

$$\text{intrinsische Clearance: } 0,19 \text{ [ml/(mgProtein} \times \text{min)]}.$$

Es wird bei Konzentrationen von bis zu $2.000 \mu\text{M}$ noch keine Sättigung erreicht. Im direkten Vergleich sind die C6-Zellen (intrinsische Clearance: $0,3 \text{ [ml/(mgProtein} \times \text{min)]}$) mit einer fast zweifach höheren intrinsischen Clearance fitter und schneller im H_2O_2 -Abbau als die Astrozyten. Identisch in beiden Zellreihen ist, dass im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung erreicht wurde und eine lineare Abhängigkeit zwischen Eliminationsgeschwindigkeit und H_2O_2 -Konzentration vorliegt.

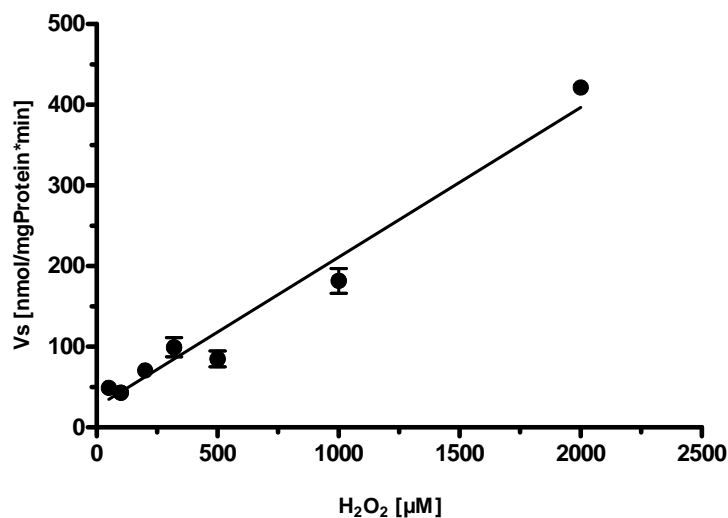


Abbildung 3.19 – Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_S) von der H_2O_2 -Konzentration: Angegeben sind Mittelwerte aus $n = 3 - 8$ unabhängigen Versuchen \pm SEM, wenn $n \geq 3$, außer für $2.000 \mu M$ und $200 \mu M H_2O_2$ $n = 2$ und für $50 \mu M H_2O_2$ $n = 1$. Die Daten wurden mittels linearer Regression angepasst, ($Y = a + bx$): $a = 25,61 \pm 9,42$; $b = 0,19 \pm 0,013$; $r^2 = 0,9106$.

3.2.1.2 CHP

Die Messungen mit CHP bei den Astrozyten erwiesen sich als problematisch, da die Messergebnisse weit streuen und zudem höhere Konzentrationen keine konstanten Ergebnisse lieferten. Dennoch zeigte sich auch hier, dass auch die Astrozyten in der Lage sind CHP aus dem Medium zu eliminieren. Die eingesetzten Konzentrationen, 50 bis 500 μM , waren deutlich niedriger als die von H_2O_2 . In Abbildung 3.20 sind die Eliminationskurven von drei verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Aus allen Versuchen wurde nun auch für CHP die spezifischen Anfangsgeschwindigkeiten, V_S , berechnet und in Abbildung 3.21 über die Konzentration aufgetragen. Das Diagramm zeigt, dass die Messwerte z.T. sehr stark streuen. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten von 50 - 500 μM CHP. Das deutet darauf hin, dass der Abbauweg für CHP in Astrozyten bei CHP-Konzentrationen von $> 50 \mu M$ bereits gesättigt ist. Eine maximale Eliminationsgeschwindigkeit, die Eliminationskapazität, von 42 [nmol/(mgProtein x min)] lässt sich als Mittelwert aller gemessenen Eliminationsgeschwindigkeiten für CHP im Spektrum von 50 - 500 μM berechnen. Die Eliminationskapazität von Astrozyten für CHP scheint damit höher zu sein als die von C6-Zellen. D.h. Astrozyten scheinen CHP schneller eliminieren zu können als C6-Zellen. Es wurden zwar Versuche mit 10 μM und 20 μM CHP durchgeführt, deren Ergebnisse waren jedoch mit einer zu hohen Streuung und Unstetigkeit behaftet, so dass keine Erkenntnisse aus ihnen gewonnen werden konnten.

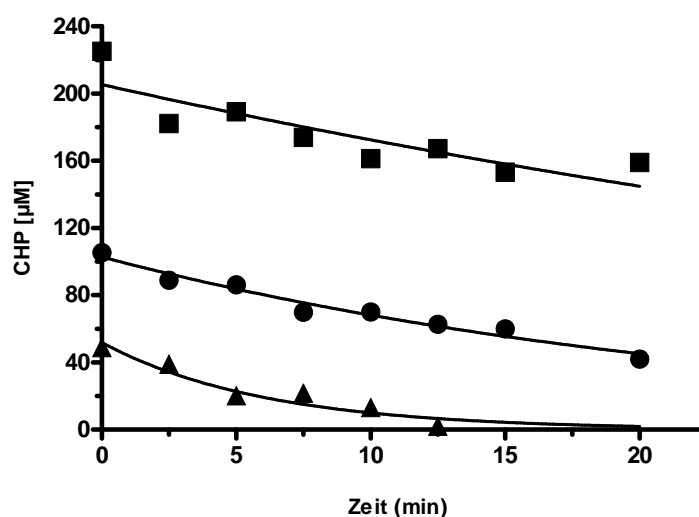


Abbildung 3.20 – Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von CHP von der Anfangskonzentration: Die eingesetzten Anfangskonzentrationen von CHP waren: 200 µM (■), 100 µM (●), 50 µM (▲). Die Zellproteinkonzentration von 0,14 mg/ml war in dieser Versuchsreihe in allen Schälchen identisch. Jede der Kurven stellt je einen Versuch dar (n = 1). Die Messungen wurden nur über einen Zeitraum von 20 min an demselben Tag durchgeführt.

3.2.2 Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf die H₂O₂-Elimination

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM) (siehe auch Abschnitt 2.4.2.5) auf die Fähigkeit der Astrozyten H₂O₂ zu eliminieren untersucht werden. Mikrogliazellen wurden durch das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. In dem von aktivierter Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM[+]) wurden im Anschluss die Astrozyten kultiviert. Zum Vergleich wurden parallel Astrozyten in Mikroglia-konditioniertem Medium kultiviert, welches von nicht stimulierten Mikroglia-kulturen gewonnen wurde, einmal mit Zusatz von LPS (MKM[-]+LPS) und einmal ohne (MKM[-]). Für die Kontrolle wurde eine Messung mit Astrozyten-Wachstumsmedium, 56°-Medium (56°), und eine mit 56°-Medium mit LPS (56°+LPS) durchgeführt, um den Einfluss des LPS allein auf Astrozyten beurteilen zu können. In allen fünf Gruppen erfolgte die Clearance Messung drei Tage nach Kultivierungsbeginn in den jeweiligen Medien. Die Elimination von 320 µM H₂O₂ wurde über den Zeitraum von 1 h gemessen (siehe auch Kapitel 2.5.5). Nach der ersten Versuchsreihe wurde deutlich, dass sich die einzelnen Versuchsgruppen in der Abbaugeschwindigkeit nicht wirklich unterscheiden. In Abbildung 3.22 sind nur drei der fünf Eliminationskurven dargestellt, um die Anschaulichkeit zu verbessern, da die beiden fehlenden Versuche (56°+LPS und MKM[-]+LPS) sich im Verlauf nicht signifikant von den anderen unterscheiden. Mit dieser Art der Darstellung lässt sich also verdeutlichen, dass es zwischen den einzelnen Versuchsgruppen anscheinend keinen Unterschied gibt, da alle H₂O₂ abbauen, die Abbaugeschwindigkeit aber nicht von den verschiedenen

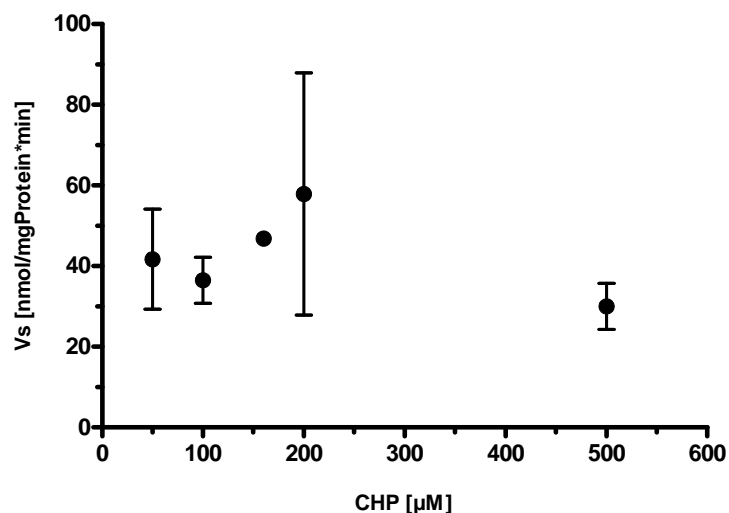


Abbildung 3.21 – Abhängigkeit der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit (V_s) von der CHP-Konzentration: Dargestellt sind Mittelwerte aus $n = 3 - 9$ unabhängigen Versuchen \pm SEM, wenn $n \geq 3$, außer für $160 \mu\text{M}$ CHP $n = 1$. Die statistische Analyse (ANOVA) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten ($p > 0,05$). Mittelwerte \pm SEM: $50 \mu\text{M}$ $41,71 \pm 12,42$; $100 \mu\text{M}$ $36,48 \pm 5,69$; $200 \mu\text{M}$ $57,87 \pm 30,03$; $500 \mu\text{M}$ $30,02 \pm 5,73$.

Medien beeinflusst wird, da die Steigungen der Kurven alle nahezu gleich sind.

Aus allen durchgeführten Messungen wurden nun auch hier wieder über die Anfangsgeschwindigkeit V_s errechnet. Die Mittelwerte von V_s aus allen vorliegenden Versuchsreihen (Abbildung 3.23) ergaben, dass es zwischen den Gruppen definitiv keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf ihre H_2O_2 -Elimination gibt. Auch dieser Vergleich der spezifischen Eliminationsgeschwindigkeit lieferte demnach keinen Hinweis darauf, dass die Kultivierung mit MKM die Astrozyten in ihrer Fähigkeit, das Peroxid abzubauen, verändert.

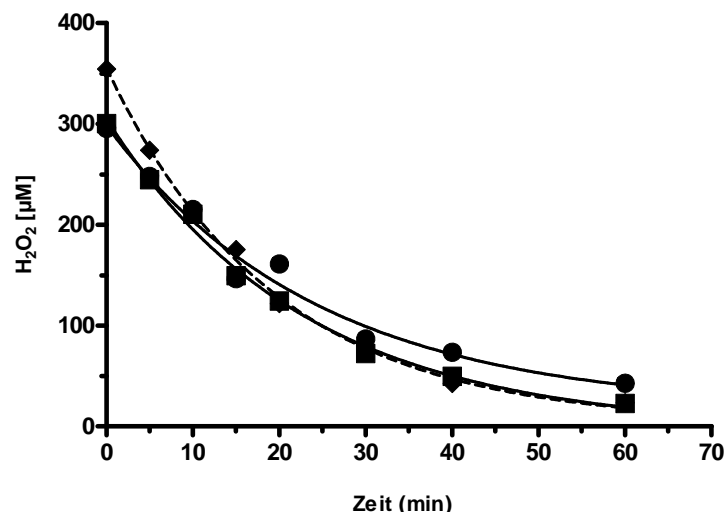


Abbildung 3.22 – Elimination von H_2O_2 durch primär kultivierte Astrozyten in Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM) kultiviert: Dargestellt sind die Eliminationsraten von 3 unterschiedlichen Versuchskulturen: Astrozyten-Wachstumsmedium: 56° (■); konditioniertes Medium von nicht aktivierter Mikroglia: MKM[-] (●); konditioniertes Medium von mit LPS aktivierter Mikroglia: MKM[+] (◆, gestrichelte Linie). Die Messreihe wurde mit einer Anfangskonzentration von je $320 \mu\text{M}$ H_2O_2 durchgeführt. Die Zellproteinkonzentration von $0,13 \text{ mg/ml}$ ist jeweils identisch. Jede Kurve zeigt den Konzentrationsabfall in einem Versuchsschälchen ($n = 1$).

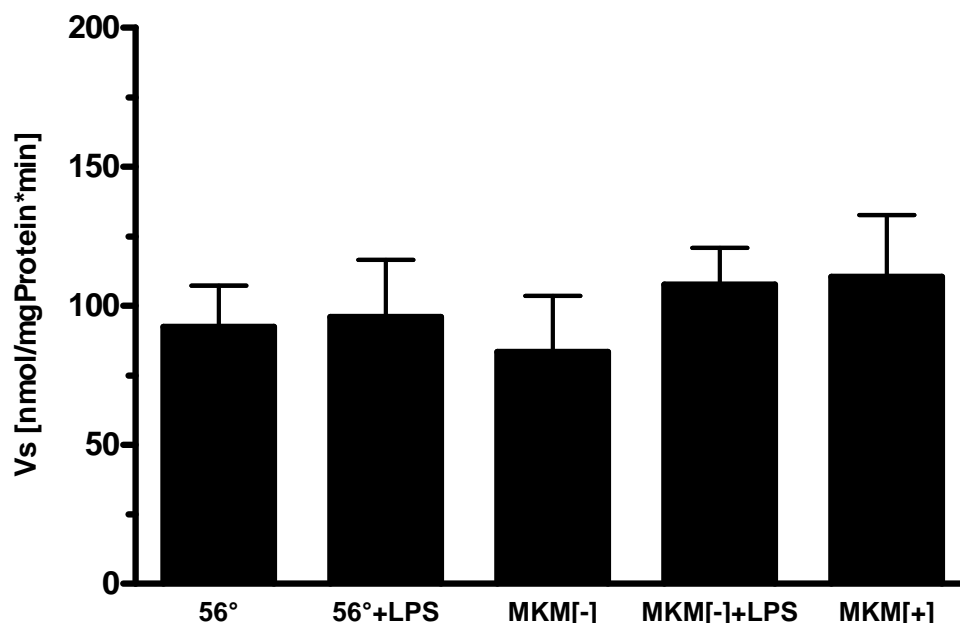


Abbildung 3.23 – Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium auf die Geschwindigkeit der Elimination (V_s) von $320 \mu\text{M}$ H_2O_2 durch primär kultivierte Astrozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen ($n = 4$). Astrozyten-Wachstumsmedium: 56° ($92,3 \pm 14,9$); Astrozyten-Wachstumsmedium mit Lipopolysaccharid (LPS): $56^\circ + \text{LPS}$ ($95,9 \pm 20,6$); konditioniertes Medium von nicht aktivierter Mikroglia: MKM[-] ($83,4 \pm 20,2$); mit LPS versetztes MKM[-]: MKM[-]+LPS ($107,6 \pm 13,2$); konditioniertes Medium von mit LPS aktivierter Mikroglia: MKM[+] ($110,4 \pm 22,2$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den 5 Versuchsgruppen (ANOVA, $p > 0,05$).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Kinetik der Elimination von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Cumolhydroperoxid (CHP) durch C6-Astrogliazellen und primär kultivierte Astrozyten der Ratte untersucht. Den Zellen wurden hierfür unterschiedlich hohe Konzentrationen der Peroxide im Versuchsmedium verabreicht und die Elimination mithilfe der Xylenol-Orange Methode bestimmt. Die Kultivierungsbedingungen wurden, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, variiert.

4.1 C6-Astrogliazellen

4.1.1 Kinetik der Elimination von H_2O_2 und CHP

Die Versuche zeigten, dass C6-Zellen in der Lage sind H_2O_2 und CHP aus dem Kulturmedium zu eliminieren. Die Geschwindigkeit des Peroxidabbaus war umso größer, je höher die Zelldichte in der Kultur. Die gemessenen Eliminationsgeschwindigkeiten [$\mu\text{M}/\text{min}$] wurden deshalb auf die jeweils vorliegende Zellproteinkonzentration bezogen, um Zellkonzentrations-unabhängige spezifische Eliminationsgeschwindigkeiten [$\text{nmol}/\text{mgZellprotein} \times \text{min}$] zu erhalten.

Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 50 - 5000 μM wurde H_2O_2 mit einer Kinetik 1. Ordnung eliminiert und es zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von der H_2O_2 -Konzentration. Legt man eine Michaelis-Menten Kinetik zu Grunde, deutet dies darauf hin, dass selbst die höchste untersuchte H_2O_2 -Konzentration von 5000 μM noch unterhalb der halbsättigenden Konzentration (K_m -Wert) dieses Abbauges liegt und die C6-Zellen eine sehr hohe Eliminationskapazität (V_{max}) für H_2O_2 besitzen, weit höher als 1500 [$\text{nmol} \text{H}_2\text{O}_2/(\text{mgZellprotein} \times \text{min})$]. Aus dem linearen Verhältnis zwischen Eliminationskapazität und H_2O_2 -Konzentration lässt sich eine intrinsische Clearance von 0,3 [$\text{ml}/(\text{mgProtein} \times \text{min})$] ermitteln.

Makino und Mitarbeiter (Sasaki et al., 1998; Hashida et al., 2002; Makino et al., 2004, 2008) beschreiben eine biphasische Konzentrationsabhängigkeit der H_2O_2 -Eliminationsgeschwindigkeit in Kulturen unterschiedlicher Zelltypen, darunter auch primäre Rattenastrozyten und C6-Zellen. Die erste Phase wird der Glutathionperoxidase (GPx) zugeschrieben, folgt einer Michaelis-Menten Kinetik und ist bei relativ kleinen H_2O_2 -Konzentrationen gesättigt. Die zweite Phase wird der praktisch nicht sättigbaren Katalase-Reaktion zugeschrieben und folgt einer Kinetik 1. Ordnung. Für C6-Zellen lässt sich aus der Abb.1 von Makino et al. (2008) eine spezifische Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (entspricht der intrinsischen Clearance) von ca. 0,27 [$\text{ml}/(\text{mgProtein} \times \text{min})$] für diese zweite Phase ablesen. Für die erste Phase lässt sich daraus eine maximale Eliminationsgeschwindigkeit (V_{max}) von ca. 38 [$\text{nmol}/(\text{mgProtein} \times \text{min})$],

die Sättigung der ersten Phase ab etwa $40 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ und eine intrinsische Clearance von etwa $1,1 \text{ [ml/(mgProtein x min)]}$ ablesen.

Eine solche zweiphasige Eliminationskinetik für H_2O_2 wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet. Möglicherweise weil weitere verlässliche Messwerte für den Konzentrationsbereich $< 50 \mu\text{M}$ mit der verwendeten Methode nicht zu ermitteln waren. Die beobachtete lineare Eliminationskinetik (intrinsische Clearance: $0,3 \text{ [ml/(mgProtein x min)]}$) entspricht offensichtlich der von Makino et.al. (2008) beobachteten zweiten Phase (intrinsische Clearance: $0,27 \text{ [ml/(mgProtein x min)]}$).

Während H_2O_2 mit zunehmender Konzentration schneller eliminiert wurde, verlief die Elimination von $100 - 500 \mu\text{M CHP}$ nahezu gleich schnell. Dieser Eliminationspfad war offensichtlich in diesem Konzentrationsbereich bereits gesättigt. Eine maximale Eliminationsgeschwindigkeit (V_{max}), die Eliminationskapazität, von ca. $16 \text{ [nmol/(mgProtein x min)]}$ konnte daraus abgeleitet werden. Da nur wenige Messwerte für CHP-Konzentrationen $< 100 \mu\text{M}$ vorliegen, müssen der aus der Anpassung einer Michaelis-Menten Funktion ermittelte K_m -Wert von ca. $19 \mu\text{M}$ und die damit berechnete intrinsische Clearance, $V_{\text{max}}/K_m = 0,86 \text{ [ml/(mgProtein x min)]}$, als sehr unsicher angesehen werden.

Vergleichbare Untersuchungen gibt es in der Literatur nicht. CHP wird, wie auch die im folgenden diskutierten Versuche mit Modulatoren antioxidativer Enzymsysteme zeigen, hauptsächlich durch die Glutathionperoxidase abgebaut (Brigelius-Flohé, 1999; Dringen et al., 1998, 2005). Wie von Makino et al. (2008) am Beispiel von H_2O_2 gezeigt wurde, ist dieser Abbauweg bereits bei geringen Peroxidkonzentrationen gesättigt (ca. $40 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), hat eine geringe Eliminationskapazität (ca. $38 \text{ [nmolH}_2\text{O}_2\text{/(mgProtein x min)]}$) und eine intrinsische Clearance von $0,86 \text{ [ml/(mgProtein x min)]}$. Vergleicht man die Eliminationskinetik von CHP mit der ersten Phase der H_2O_2 -Elimination, sieht man, dass sich die intrinsische Clearance in etwa entspricht, die Eliminationskapazität für H_2O_2 allerdings höher ist als die für CHP.

H_2O_2 wird insgesamt schneller und in höheren Konzentrationen abgebaut als CHP, was zum einen am Transport des kleineren Moleküls über Diffusion in den Intrazellularraum liegen könnte. Auch weisen die oben diskutierten Ergebnisse darauf hin, dass die beteiligten Enzymsysteme unterschiedlich effizient arbeiten.

4.1.2 Einfluss von Modulatoren antioxidativer Enzyme

Um die Bedeutung der Katalase und des Glutathionsystems für den Abbau von H_2O_2 und CHP durch die C6-Zellen näher zu charakterisieren, wurde die Geschwindigkeit der Elimination von $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ bzw. CHP nach Vorinkubation der C6-Zellen mit Modulatoren dieser enzymatischen Systeme gemessen. Unter den hier gewählten Normalbedingungen eliminierten die C6-Zellen H_2O_2 deutlich schneller als CHP.

3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) hemmt die Katalase und führte unter den hier gewählten Bedingungen zu einem nahezu vollständigen Verschwinden der Katalaseaktivität in den C6-Zellen

(A.Kunert, unveröffentlicht). 3AT senkte die Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 auf das Niveau von CHP. Das lässt sich so interpretieren, dass die Elimination von $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 in der Hauptsache durch die Katalase durchgeführt wird und nur zu einem geringen Teil durch die Glutathionperoxidase, die bei dieser H_2O_2 -Konzentration bereits gesättigt ist und nur eine vergleichsweise geringe Eliminationskapazität besitzt. Dieser Teil der Elimination bleibt unbeeinflusst durch 3AT. Allerdings wird auch die Eliminationsgeschwindigkeit von CHP durch 3AT reduziert, wenn auch nicht so stark wie die von H_2O_2 . Daraus könnte man ableiten, dass die Katalase auch an der Elimination von CHP beteiligt ist. Das widerspricht allerdings allen bisherigen Vorstellungen über den Abbau von organischen Hydroperoxiden (Brigelius-Flohé, 1999; Dringen et al., 1998, 2005; Liddell et al., 2006).

Mercaptosuccinat (MS), Buthionin-sulfoximin (BSO) und Natriumselenit (SE) wurden verwendet um das Glutathionsystem zu beeinflussen. Der Hemmstoff der Glutathionperoxidase, Mercaptosuccinat, zeigte keine Wirkung auf die Eliminationsgeschwindigkeit beider Peroxide. Daraus lässt sich jedoch nicht zwingend schließen, dass die Glutathionperoxidase keinen Einfluss auf die Elimination von H_2O_2 und CHP hat. Es ist z.B. nicht sichergestellt worden, dass Mercaptosuccinat unter den gewählten Bedingungen die GPx tatsächlich hemmt.

Buthionin-sulfoximin (BSO) verhindert die Glutathionsynthese durch Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase und führt unter den gewählten Bedingungen zu einer Reduktion des Gesamtglutathionspiegels von C6-Zellen auf etwa 10 % (A.Kunert, unveröffentlicht). Natriumselenit (SE) erhöht unter den hier gewählten Bedingungen die Aktivität der Glutathionperoxidase in C6-Zellen um mehr als 100 % (A.Kunert, unveröffentlicht). Die Reduktion des GSH-Spiegels verringerte die Eliminationsgeschwindigkeit von H_2O_2 nur geringfügig um 25 %, aber die von CHP um mehr als 50 %. Die Erhöhung der GPx-Aktivität führte zu einer Steigerung der H_2O_2 -Eliminationsgeschwindigkeit um 60 %, aber der CHP-Eliminationsgeschwindigkeit um mehr als 300 %. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Elimination von $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 hauptsächlich durch die Katalase und nur zu einem geringen Teil durch die Glutathionperoxidase bewerkstelligt wird, $100 \mu\text{M}$ CHP aber im Wesentlichen durch die Glutathionperoxidase abgebaut wird. Die Eliminationskapazität der Glutathionperoxidase hängt offensichtlich sowohl von der Konzentration des Co-Substrates, Glutathion, als auch von der Aktivität der Glutathionperoxidase ab.

4.1.3 Einfluss der Kulturbedingungen

Untersuchungen im gleichen Labor zeigten, dass C6-Zellen, deren Erhaltungskulturen in einem serumreichen Wachstumsmedium (Ham's F-10 mit 15 % Pferdeserum (HS) und 2,5 % fötalem Rinderserum (FBS)) kultiviert wurden weniger empfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 und CHP waren als C6-Zellen, die, wie in dieser Arbeit, in einem serumarmen Wachstumsmedium (DMEM mit 5 % FBS) kultiviert wurden (Brenner et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die relative Resistenz gegen Peroxide der im serumreichen

Medium kultivierten C6-Zellen mit einer erhöhten Eliminationskapazität für CHP einhergeht, d.h., wie oben diskutiert, mit einer erhöhten Eliminationskapazität des Glutathionperoxidase-Systems der C6-Zellen. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Brenner et al. (2010) die in C6-Zellen aus serumreichen Erhaltungskulturen deutlich höhere Glutathionspiegel und Glutathionperoxidase-Aktivitäten beobachteten als in C6-Zellen aus serumarmen Erhaltungskulturen. Die erhöhte Aktivität des Selenoenzyms Glutathionperoxidase kann durch eine vermehrte Versorgung der Zellen mit Selen erklärt werden. Das serumreiche Wachstumsmedium enthält ca. 50-fach höhere Selenkonzentrationen ($0,5 \mu\text{M}$) als das serumarme Medium ($0,01 \mu\text{M}$, A.Kunert, unveröffentlicht). Wie oben bereits diskutiert erhöht die Vorinkubation von C6-Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit die Eliminationskapazität für CHP um mehr als 300 %.

4.2 Astrozyten

4.2.1 Kinetik der Elimination von H_2O_2 und CHP

H_2O_2 wurde von primär kultivierten Astrozyten ebenso wie durch C6-Zellen über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von $50 - 2000 \mu\text{M}$ nach einer Kinetik 1.Ordnung abgebaut, allerdings mit einer niedrigeren intrinsischen Clearance von $0,19 [\text{ml}/(\text{mgProtein} \times \text{min})]$ als von C6-Zellen ($0,3 [\text{ml}/(\text{mgProtein} \times \text{min})]$). Die Regressionsgerade (Abb. 3.19) schneidet die Y-Achse bei $26 \pm 9 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$. Das deutet eine weitere Eliminationsphase an, mit einer Eliminationskapazität von etwa $26 [\text{nmol}/\text{mgZellprotein}]$, die bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$ schon gesättigt ist. Diese von Makino et al. (Sasaki et al., 1998; Hashida et al., 2002; Makino et al., 2004, 2008) der Glutathionperoxidase zugeschriebene erste Phase scheint demnach bei Astrozyten bedeutsamer zu sein als bei den C6-Zellen. In dieses Bild passt auch die mit etwa $42 [\text{nmol}/\text{mgProtein} \times \text{min}]$ höhere Eliminationskapazität der Astrozyten verglichen mit etwa $16 [\text{nmol}/\text{mgProtein} \times \text{min}]$ der C6-Zellen. Ob diese Unterschiede Zelltyp spezifisch sind, oder Ausdruck unterschiedlicher Ausprägungen des Glutathionsystems, kann nicht entschieden werden.

4.2.2 Einfluss von Mikroglia-konditioniertem Medium

Die Interaktion zwischen Mikroglia und Astrozyten wird über konditionierte Medien hergestellt. Das durch Lipopolysaccharide (LPS) aktivierte Mikroglia Medium setzt u.a. Chemokine, proinflammatorische Substanzen (Zytokine, Prostaglandine etc.) und radikale Sauerstoff- und Stickstoffspezies frei und kann hierdurch sowohl neuroprotektiv als auch neurodegenerativ wirken. Aktivierte Mikroglia regulieren antioxidative Systeme in den Astrozyten unter pathologischen Konditionen, assoziiert mit oxidativem Stress und Inflammation. Es ist bekannt, dass die Vorbehandlung von Astrozyten mit von aktivierter Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM),

deren Resistenz gegen H_2O_2 erhöht und die Zytotoxizität von H_2O_2 erniedrigt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass aktivierte Mikroglia, z.B. die Zellzahl und mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 (Röhl et al., 2007), erhöhen und dass sich auch die Vitalität der Astrozyten durch Kultivierung mit MKM[+] erhöht (Röhl et al., 2010, 2008).

Die Ergebnisse dieser Studie ergaben, dass Mikroglia-konditionierte Medien keinen Einfluss auf die H_2O_2 -Elimination der Astrozyten haben. Innerhalb der 5 Versuchgruppen (Astrozyten-Wachstumsmedium (56°), Astrozyten-Wachstumsmedium mit Lipopolysaccharid (56° +LPS), konditioniertes Medium von nicht aktivierter Mikroglia (MKM[-]), mit LPS versetztes MKM[-] (MKM[-] + LPS), konditioniertes Medium von mit LPS aktivierter Mikroglia (MKM[+]) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Peroxidclearance gemessen werden. Die protektive Wirkung der Mikroglia scheint somit nicht mit einer schnelleren Elimination von H_2O_2 verbunden zu sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeit von C6-Astrogliazellen und primär kultivierten Ratten-Astrozyten zu charakterisieren, Peroxide zu eliminieren. Dazu wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. Cumolhydroperoxid (CHP) im Kulturmedium inkubiert und die Abnahme der Peroxidkonzentration mit Hilfe der Xylenol Orange Methode gemessen. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob eine erhöhte Peroxid-Abbaufähigkeit von Astrozyten durch aktivierte Mikrogliazellen die Erhöhung der Resistenz gegenüber H_2O_2 -induziertem oxidativem Stress verursacht. Hierfür wurden Primärkulturen von Astrozyten und Mikrogliazellen aus Rattenhirnen angelegt, die Mikroglia durch bakterielles Lipopolysaccharid stimuliert und die Wirkung des von aktivierten Mikrogliazellen-konditionierten Mediums auf die Peroxid-Elimination von Astrozyten untersucht.

Die Geschwindigkeit der Peroxidelimination durch C6-Zellen und primär kultivierte Astrozyten war abhängig von der Peroxid- und der Zellkonzentration.

Der H_2O_2 -Abbau der C6-Zellen folgte über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 50 - 5000 μM einer Kinetik 1.Ordnung mit einer intrinsischen Clearance von 0,3 [ml/(mgProtein x min)]. Eine Sättigung war nicht zu beobachten, die Eliminationskapazität lag bei weit über 1500 [nmol H_2O_2 /(mgZellprotein x min)]. Die CHP-Elimination von C6-Zellen war langsamer als die von H_2O_2 und die Eliminationskapazität mit 16,4 [nmol/(mgProtein x min)] deutlich geringer. Ab 100 μM war eine Sättigung zu beobachten.

Das Verhalten der C6-Zellen ist von ihrer Kultivierung abhängig. Durch das Ersetzen des sonst üblichen serumarmen DMEM Mediums durch serumreiches Ham's F-10 Medium erhöhte sich die Eliminationskapazität für CHP auf 23,3 [nmol/(mgProtein x min)].

Die C6-Zellen wurden mit dem Katalase-Hemmer 3-Amino-1,2,4-triazol, dem Glutathion-synthese-Hemmer Buthionin-sulfoximin und mit Natriumselenit, essentiell für die Synthese von Glutathionperoxidase, vorinkubiert. 3-Amino-1,2,4-triazol verlangsamte die Elimination von H_2O_2 wesentlich stärker als die von CHP, Buthionin-sulfoximin verlangsamte die Elimination von CHP stärker als die von H_2O_2 und Natriumselenit führte zu einer stärkeren Beschleunigung der Elimination von CHP verglichen mit H_2O_2 . Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Elimination von H_2O_2 hauptsächlich durch die Katalase und zu einem geringeren Teil durch die Glutathionperoxidase bewerkstelligt wird, die Elimination von CHP aber im Wesentlichen durch die Glutathionperoxidase.

Astrozyten eliminieren wie die C6-Zellen H_2O_2 im untersuchten Konzentrationsbereich von 50 - 2000 μM mit einer Kinetik 1.Ordnung, allerdings mit geringerer Geschwindigkeit, die intrinsische Clearance betrug 0,19 [ml/(mgProtein x min)]. Die Eliminationskapazität der

Astrozyten für CHP war mit 42 [nmol/(mgProtein x min)] höher als die der C6-Zellen. Mikroglia-konditioniertes Medium zeigte keinen Einfluss auf die Fähigkeit von Astrozyten H_2O_2 zu eliminieren. Die durch aktivierte Mikroglia in Astrozyten bewirkte höhere Resistenz gegenüber H_2O_2 beruht somit nicht auf einer verstärkten H_2O_2 -Elimination.

Literaturverzeichnis

- Aebi, H. E. (1983). Catalase. In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., und Graßl, M. (Hg.): Methods of Enzymatic Analysis. 3. Aufl., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, S. 273-286.
- Andrae, U., Singh, J. and Ziegler-Skylakakis, K. (1985). Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 28, 93–98.
- Antunes, F. and Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475, 121–126.
- Azzi, A., Davies, K. J. A. and Kelly, F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 558, 3–6.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370–371.
- Brenner, S. (2009). Einfluss der Kulturbedingungen auf die Empfindlichkeit von C6 Gliomzellen für oxidative Stressoren. Masterarbeit aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Brenner, S., Gülden, M., Maser, E. and Seibert, H. (2010). Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 24, 2090–2096.
- Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951–965.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527–605.
- Chevion, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med* 5, 27–37.
- Desagher, S., Glowinski, J. and Premont, J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16, 2553–2562.
- Dringen, R. and Hamprecht, B. (1997). Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759, 67–75.

- Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J. and Hamprecht, B. (1999). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 72, 2523–2530.
- Dringen, R., Kussmaul, L. and Hamprecht, B. (1998). Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* 2, 223–228.
- Dringen, R., Pawlowski, P. G. and Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79, 157–165.
- Giandomenico, A. R., Cerniglia, G. E., Biaglow, J. E., Stevens, C. W. and Koch, C. J. (1997). The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 23, 426–434.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 1609–1623.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634–1658.
- Hashida, K., Sakakura, Y. and Makino, N. (2002). Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells: rate limitation by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1572, 85–90.
- Helmy, M. H., Ismail, S. S., Fayed, H. and El-Bassiouni, E. A. (2000). Effect of selenium supplementation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. *Toxicology* 144, 57–61.
- Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J. M. and Dringen, R. (2002). Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* 82, 635–644.
- Hyslop, P. A., Zhang, Z., Pearson, D. V. and Phebus, L. A. (1995). Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro. *Brain Res* 671, 181–186.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. and Wolff, S. P. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 268, 69–71.
- Kammann, J. (2009). Einfluss der Zellkonzentration auf die Zytotoxizität und Entgiftung von Peroxiden in Kulturen von C6-Glioma-Zellen. Masterarbeit aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

- Leist, M., Raab, B., Maurer, S., Rösick, U. and Brigelius-Flohé, R. (1996). Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radic Biol Med* 21, 297–306.
- Liddell, J. R., Dringen, R., Crack, P. J. and Robinson, S. R. (2006). Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia* 54, 873–879.
- Liddell, J. R., Robinson, S. R. and Dringen, R. (2004). Endogenous glutathione and catalase protect cultured rat astrocytes from the iron-mediated toxicity of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett* 364, 164–167.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Makino, N., Mise, T. and Sagara, J.-I. (2008). Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells analysis based on a mathematical model. *Biochim Biophys Acta* 1780, 927–936.
- Makino, N., Mochizuki, Y., Bannai, S. and Sugita, Y. (1994). Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 1020–1025.
- Makino, N., Sasaki, K., Hashida, K. and Sakakura, Y. (2004). A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochim Biophys Acta* 1673, 149–159.
- McCarthy, K. D. and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85, 890–902.
- Röhl, C. (2000). Wirkungen von Organozinnverbindungen auf primär kultivierte Rattenastrozyten. Doktorarbeit aus dem Institut für Toxikologie, Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Röhl, C., Armbrust, E., Herbst, E., Jess, A., Gülden, M., Maser, E., Rimbach, G. and Bösch-Saadatmandi, C. (2010). Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation. *Neurotox Res* 17, 317–331.
- Röhl, C., Armbrust, E., Kolbe, K., Lucius, R., Maser, E., Venz, S. and Gülden, M. (2008). Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro. *Glia* 56, 1114–1126.
- Röhl, C., Lucius, R. and Sievers, J. (2007). The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res* 1129, 43–52.

Sasaki, K., Bannai, S. and Makino, N. (1998). Kinetics of hydrogen peroxide elimination by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1380, 275–288.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Edmund Maser für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie und Toxikologie und PD Dr. med. Claudia Röhl für die Bereitstellung des Themas bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Jobst Sievers für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Anatomischen Institut.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Michael Gülden für die Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bei experimentellen und fachlichen Fragen. Ebenso danken möchte ich PD. Dr. med. Claudia Röhl für die fachliche Hilfe die Astrozyten betreffend.

Sabine Seibert und allen anderen Mitarbeitern der Zellkultur danke ich für die stets freundliche und geduldige Unterstützung beim experimentellen Arbeiten in der Zellkultur. Monika Grell danke ich für die Herstellung der Astrozytenkulturen.

Ein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitstreiter der Toxikologie, vor allem Dr. Yasser El-Hawari, deren sofortige Aufnahme und immer fröhliche Art, mir die Arbeit an der Dissertation zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht haben.

Der letzte Dank geht an meine Familie, ohne die ich diese Arbeit in dieser Form nicht fertig gestellt hätte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass meine Dissertation mit dem Titel „Vergleichende Untersuchung der Peroxid-Clearance von C6-Astrogliazellen und primär kultivierten Astrozyten der Ratte“, abgesehen von Ratschlägen meiner Doktormutter und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Kiel, 2011

Anne-Cathrin Jess

Lebenslauf

Anne-Cathrin Jess
Königsweg 62
24114 Kiel
E-Mail: annecjess@hotmail.com

Geburtsdatum: 28/10/1979
Geburtsort: Rendsburg

Schulbildung

08/1985 – 07/1989 Besuch der Grundschule Rantrum
08/1989 – 07/1999 Besuch der Hermann-Tast-Schule Husum,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Juli 1999)

Praktika

08/1999 – 03/ 2000 European Voluntary Service, Kidderminster, Groß Britannien
08/2000 – 07/2001 Georgia Rotary Student Programme, Georgia, USA;
Besuch des Gordon College, Barnesville

Akademische Laufbahn

10/2001 – 04/2003 Studium der Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04/2003 – 12/2008 Studium der Zahnmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel;
Abschluss: Staatsexamen (05.12.2008)

Auslandsaufenthalt

01/2009 – 12/2009 Work and Travel in Neuseeland, Cook Islands, Australien

Berufstätigkeit

04/2010 – 10/2010 Assistenz Zahnärztin in der Praxismgemeinschaft
Uthgenannt-Volk/Geyer in Lübeck
ab 10/2010 Assistenz Zahnärztin in der ZMK, Abteilung Prothetik
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel