

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

Bedeutung physiologischer Schutzsysteme für die Zytotoxizität von Peroxiden in C6-Astrogliazellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNE CHRISTINA MARIE JOHANNA KUNERT
aus Herdecke

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, _____

den _____

gez. _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einführung	1
1.1 Theoretische Grundlagen	1
1.1.1 Oxidativer Stress	1
1.1.2 Antioxidative Schutzsysteme	3
1.2 Hintergrund und Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	11
2.1 Zellkultur	11
2.1.1 C6 Astrogliazellen	11
2.1.2 Materialien	11
2.1.3 Kulturmedien und Arbeitslösungen	12
2.1.4 Kultivierung	13
2.2 Testsubstanzen	14
2.3 Versuchsaufbau	15
2.3.1 Versuche zur Beeinflussung der physiologischen Schutzsysteme	15
2.3.1.1 Übersicht	15
2.3.1.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	18
2.3.1.2.1 Zytotoxizitätstest	18
2.3.1.2.2 Mikroskopie	19
2.3.1.3 Einfluss auf die Elimination von Peroxiden	20
2.3.1.4 Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung	20
2.3.1.5 Einfluss auf den Glutathiongehalt und die Aktivität antioxidativer Enzyme	21
2.3.2 Versuche zur Zytotoxizität von Natriumselenit	21
2.4 Messmethoden	23
2.4.1 Proteinbestimmung	23
2.4.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry	23
2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford	26

2.4.2	MTT-Test	27
2.4.3	Xylenolorange Methode	28
2.4.4	Dichlorfluorescein-Assay	31
2.4.5	Bestimmung des Glutathiongehalts	33
2.4.6	Bestimmung der Enzymaktivität	37
2.4.6.1	Aufbereitung der Proben	37
2.4.6.2	Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität	37
2.4.6.3	Bestimmung der Katalase-Aktivität	40
2.4.7	Bestimmung des Selengehalt in Seren mittels Atomabsorptionsspektrometrie	42
2.5	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	3-Amino-1,2,4-triazol	47
3.1.1	Einfluss auf die Katalase-Aktivität	47
3.1.2	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	48
3.2	Buthionin-Sulfoximin	51
3.2.1	Einfluss auf den Glutathiongehalt	51
3.2.2	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	52
3.3	Cystin	56
3.3.1	Einfluss auf den Glutathiongehalt	56
3.3.2	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	57
3.4	Selen	59
3.4.1	Selengehalt in fötalen Rinderseren und Pferdeserum	59
3.4.2	Zytotoxizität von Natriumselenit	61
3.4.3	Vorinkubation mit Natriumselenit	62
3.4.3.1	Einfluss auf die Glutathionperoxidase-Aktivität	62
3.4.3.2	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	63
3.4.3.3	Einfluss auf die Elimination von Peroxiden	66
3.4.3.4	Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung	68
3.4.3.5	Mikroskopische Beobachtungen des Einflusses auf die Zytotoxizität von Peroxiden	70

4.	Diskussion	84
4.1	Hintergrund und Fragestellung	84
4.2	3-Amino-1,2,4-triazol	85
4.2.1	Einfluss auf die Katalase-Aktivität	85
4.2.2	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	86
4.3	Buthioninsulfoximin	87
4.3.1	Einfluss auf den Glutathiongehalt	88
4.3.1	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	88
4.4	Cystin	89
4.4.1	Einfluss auf den Glutathiongehalt und die Zytotoxizität von Peroxiden	89
4.5	Selen	91
4.5.1	Selengehalt in Kulturmedien	93
4.5.2	Zytotoxizität von Selen	94
4.5.3	Einfluss auf die Glutathionperoxidase-Aktivität	95
4.5.4	Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden	97
4.5.5	Einfluss auf die Elimination von Peroxiden	100
4.5.6	Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung	101
5.	Zusammenfassung	103
	Literaturverzeichnis	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Schematische Darstellung der Entstehung und Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies	2
Abbildung 2: Elimination von Wasserstoffperoxid	4
Abbildung 3: Reaktionen der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase	5
Abbildung 4: Glutathion	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Glutathion-Synthese	6
Abbildung 6: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen von CHP und H ₂ O ₂	7
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vorinkubationsprotokolls	17
Abbildung 9: Expositionsschema für CHP und H ₂ O ₂	19
Abbildung 10: Aussaat- und Vorinkubationsschema für die Bestimmung der Peroxid-induzierten Radikalbildung in Mikrotiterplatten	20
Abbildung 11: Inkubationsschema für die Zytotoxizitätsbestimmung von Natriumselenit in Mikrotiterplatten	22
Abbildung 12: Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Lowry in Mikrotiterplatten	25
Abbildung 13: Pipettierschema für die Xylenolorange Methode in Mikrotiterplatten	30
Abbildung 14: Expositionsschema für die Bestimmung von Radikalen in Mikrotiterplatten	32
Abbildung 15: Pipettierschema für die Bestimmung des Glutathiongehalts in Mikrotiterplatten	36
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Standardaddition	46
Abbildung 17: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die Katalase-Aktivität in C6-Zellen	48
Abbildung 18: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen	49
Abbildung 19: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	50
Abbildung 20: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf den Glutathiongehalt in C6-Zellen	51
Abbildung 21: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen	53
Abbildung 22: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	55

Abbildung 23: Einfluss von Cystin auf den Glutathiongehalt in C6-Zellen	56
Abbildung 24: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen	57
Abbildung 25: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	58
Abbildung 26: Selengehalt in tierischen Seren	60
Abbildung 27: Zytotoxizität von Natriumselenit in C6-Zellkulturen	62
Abbildung 28: Einfluss von Natriumselenit auf die Glutathionperoxidase-Aktivität in C6-Zellen	63
Abbildung 29: Einfluss von Natriumselenit auf die CHP-induzierte Reduktion des Proteingehalts in C6-Zellkulturen (Proteinbestimmung nach Lowry)	64
Abbildung 30: Einfluss von Natriumselenit auf die CHP-induzierte Reduktion der Zellvitalität in C6-Zellkulturen (MTT-Assay)	65
Abbildung 31: Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	66
Abbildung 32: Einfluss von Natriumselenit auf die Elimination von H ₂ O ₂ und CHP durch C6-Zellkulturen	67
Abbildung 33: Einfluss von Natriumselenit auf die H ₂ O ₂ - bzw. CHP-induzierte Radikalbildung in C6-Zellkulturen	69
Abbildungen 34: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen	71
Abbildungen 35: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen	72
Abbildungen 36: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen	73
Abbildung 37: Zellschädigung durch 100 µM CHP	75
Abbildung 38: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen	76
Abbildungen 39: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	78
Abbildungen 40: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	79
Abbildungen 41: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	80

Abbildung 42: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	83
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht selenabhängige Glutathionperoxidasen	4
Tabelle 2: Volumenverteilung [%] der flüssigen Bestandteile in DMEM-Wachstumsmedium	12
Tabelle 3: Messansatz für die Glutathionperoxidase-Aktivitätsmessung	39
Tabelle 4: Messansatz für die Katalase-Aktivitätsmessung	41
Tabelle 5: Additionsschritte bei der Bestimmung des Selengehalts in tierischen Seren	45
Tabelle 6: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen	54
Tabelle 7: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	54
Tabelle 8: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von H ₂ O ₂ in C6-Zellkulturen	59
Tabelle 9: Selengehalt in tierischen Seren	60
Tabelle 10: Selengehalt in Wachstumsmedien	61

Abkürzungsverzeichnis

3AT: 3-Amino-1,2,4-triazol

ATP: Adenosintriphosphat

BSA: Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)

BSO: Buthionin-sulfoximin

CAT: Katalase

CHP: Cumolhydroperoxid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

EC₅₀-Wert: halbmaximale effektive Konzentration

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

DCF: Dichlorfluorescein

DMF: Dimethylformamid

DTNB: 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) TNB: 5-Thio-2-nitrobenzoesäure

FBS: Fötale Rinderserum

GPx: Glutathionperoxidase

GR: Glutathionreduktase

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathiondissulfid

Ham's F-10: Ham's Nutrient Mixture F-10

HO[•]: Hydroxyl-Radikal

H₂O₂: Wasserstoffperoxid

HS: Pferdeserum, Horse Serum

LDL: Low-Density-Lipoprotein

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NADPH: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

O₂^{•-}: Superoxid-Radikal

PBS: Phosphate buffered saline nach Dulbecco (Phosphat-Puffer)

ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

ROO[•]: organisches Peroxyl-Radikal

RO[•]: Alkoxy-Radikal

ROOH: organisches Hydroperoxid

SDS: Dodecylsulfat Natriumsalz

SEM: Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwert TrxR: Thioredoxin-Reduktase

SOD: Superoxiddismutase

1. Einführung

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als einer der ursächlichen Faktoren bei der Pathogenese von diversen Krankheiten und Alterungsprozessen angesehen. Als oxidativer Stress wird der Zustand bezeichnet, der durch ein Ungleichgewicht zwischen Anfall und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), zustande kommt. Hierbei überwiegt die Wirkung der ROS gegenüber den antioxidativen Schutzsystemen.

Zu der Familie der ROS gehören zu einem freie Radikale, die sich durch ein ungepaartes oder mehrere ungepaarte Elektronen auszeichnen. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem Superoxid-Radikale ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxyl-Radikale (HO^{\bullet}) sowie die organischen Peroxyl- (ROO^{\bullet}) und Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}). Des Weiteren werden zur Gruppe der ROS auch stabilere Sauerstoffderivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und organisches Hydroperoxid ($ROOH$) gezählt, die an sich keine reaktiven Metaboliten darstellen, aber mittels der Fenton-Reaktion in reaktionsfreudige Moleküle umgewandelt werden können (Halliwell & Gutteridge, 1984, Dringen et al., 2000).

In aeroben Zellen entstehen kontinuierlich ROS sowohl endogen, bei einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen, als auch durch exogene Einflüsse (Abb. 1).

Endogen kommt es vor allem im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung von ROS. Im Zuge von Elektronenübertragungen bei den Redoxreaktionen der Atmungskette können einzelne Elektronen entweichen und zu einer Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) zu Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$) führen (MCCORD, 2000). Katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD) kann $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und O_2 umgewandelt werden:



Das entstehende H_2O_2 ist gut membranpermeabel und kann sich somit frei in verschiedenen Zellkompartimenten verteilen. Das relativ reaktionsträge H_2O_2 kann aber in der von Haber und Weiss beschriebenen Reaktion, gemeinsam mit $O_2^{\bullet-}$ und Übergangsmetallionen (Fe^{3+}/Fe^{2+}) reagieren, wodurch es zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen (HO^{\bullet}) kommt:

1. $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$
2. $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + ^-OH$ (Fenton-Reaktion)

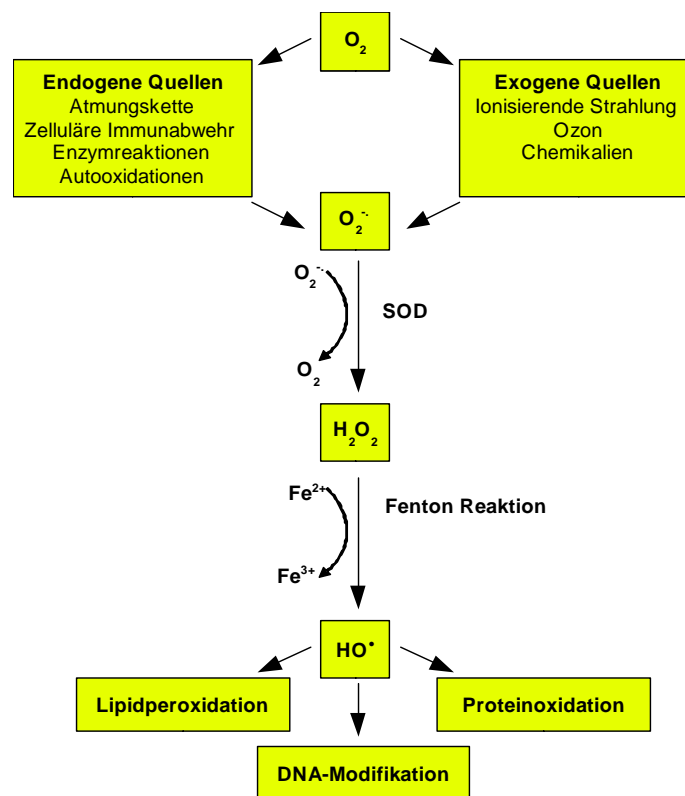


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung und Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies

Dargestellt sind die Hauptquellen von Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), die Umwandlung von Superoxid-Radikal in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mittels der Superoxid-Dismutase (SOD), die durch die Fenton-Reaktion vermittelte Bildung von Hydroxyl-Radikal (HO^{\bullet}) sowie die Angriffsorte von HO^{\bullet} .

Hydroxyl-Radikale sind äußerst reaktiv und reagieren mit einer Vielzahl an Molekülen, unter anderem mit Zuckern, Aminosäuren und Nukleotiden (Young & Woodside, 2001). Verschiedenste zelluläre Bestandteile wie Lipide, Proteine und DNA können somit durch HO^{\bullet} oxidiert werden.

Die durch ROS hervorgerufenen Effekte können sowohl negative als auch erwünschte Auswirkungen in Zellen haben. Außer bei der Entstehung von ROS als Nebenprodukt, im Rahmen von physiologischen Vorgängen, werden reaktive Sauerstoffspezies auch gezielt produziert. ROS werden im Rahmen der zellulären Immunabwehr von Phagozyten gebildet, spielen eine Rolle bei der Regulation der Zellvermehrung und beeinflussen über die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren das Proteom (McCord, 2000, Finkel & Holbrook, 2000, Foraman & Torres, 2002).

Daneben können aber durch ROS ausgelöste Oxidationen zu Fehlfunktionen bzw. einem Funktionsverlust von Proteinen, Schäden an Lipiden und der DNA führen. In der DNA können ROS zu oxidativen Veränderungen von Basen, Fehlpaarungen und Strangbrüchen

führen (Maynard et al., 2009, Lovell & Markesberry, 2007). Diesen oxidativen Schäden wird eine Schlüsselrolle bei der Entstehung weit verbreiteter Krankheiten wie der Arteriosklerose, Krebserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben.

Verschiedene Untersuchungen zur Arteriosklerose legen einen Zusammenhang mit oxidativem Stress nah. Durch ROS kommt es in Endothelzellen, über eine veränderte Expression von Proteinen, zu einer zellulären Dysfunktion. Des Weiteren führt ROS zur Oxidation von Lipoproteinen, vor allem von LDL (Low-Density-Lipoprotein), welches im Vergleich zu nicht-oxidiertem LDL einfacher durch Makrophagen aufgenommen werden kann (Vogiatzi et al., 2008, Kondo et al., 2009, Young & Woodside, 2001). Die Ablagerung von oxidierten LDL in Makrophagen führt zu einer Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen, welche wiederum eine chronische Entzündungsreaktion hervorrufen. Diese mündet schließlich in der Bildung von atherosklerotischen Plaques. Atherosklerotische Plaques bergen ein hohes Risiko für die Entstehung eines Thrombus und gegebenenfalls eines Gefäßverschlusses, im Sinne eines Myokardinfarkts.

Auch bezüglich der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose und Amyotrophe Lateralsklerose wird oxidativer Stress als mit auslösender Faktor angesehen (Uttara et al., 2009).

1.1.2 Antioxidative Schutzsysteme

Zum Schutz gegen die durch oxidativen Stress ausgelösten Schädigungen gibt es in Zellen eine Vielzahl an Abwehrmechanismen. Von besonderer Wichtigkeit sind dabei enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien. Als Antioxidantien werden Enzyme und niedermolekulare Substanzen bezeichnet, die, selbst wenn sie in niedrigeren Konzentrationen als das zu schützende Substrat vorkommen, die Oxidation dieses Substrats vermindern oder sogar komplett verhindern (Young & Woodside, 2001).

Zur Gruppe der enzymatischen Antioxidantien gehören die Superoxid-Dismutasen (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidasen (GPx).

SODs kommen sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytosol und extrazellulär vor. Die unterschiedlichen SODs benötigen als Co-Faktoren verschiedene Mineralien, wie Mangan, Zink und Kupfer. Wie oben beschrieben führt die SOD zur Umwandlung von $O_2^{\bullet-}$ zu dem weniger reaktiven H_2O_2 . Besondere Bedeutung kommt der mitochondrialen SOD zu, die, da sie in direkter Nachbarschaft mit den Komplexen der Atmungskette vorkommt, mit großen Mengen an $O_2^{\bullet-}$ konfrontiert wird (McCord, 2008, Dringen, 2005).

Das durch die SODs entstehende H_2O_2 kann sowohl mittels der Katalase als auch der GPx abgebaut werden (Abb. 2) (Makino et al., 2008).

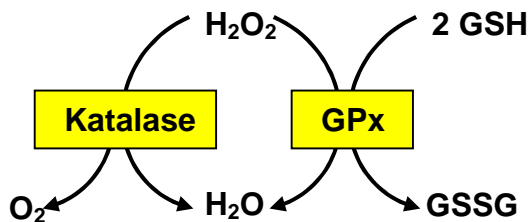


Abbildung 2: Elimination von Wasserstoffperoxid

Dargestellt ist der Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Katalase bzw. mittels der Glutathionperoxidase (GPx). Die GPx benötigt Glutathion (GSH) als Cofaktor, welches bei der Reaktion oxidiert wird. Zwei oxidierte Moleküle GSH verbinden sich zu Glutathion-Disulfid (GSSG).

Die Katalase kommt in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor, vor allem in Mitochondrien und Peroxisomen.

H_2O_2 wird durch die Katalase in zwei Schritten abgebaut. Dabei liegt die Wechselzahl des Enzyms sehr hoch. In vivo ist es nahezu unmöglich eine Sättigung der Katalase zu erreichen (Young & Woodside, 2001). H_2O_2 kann außer durch die Katalase auch von der GPx abgebaut werden. Die GPx kann neben H_2O_2 auch organische Hydroperoxide (ROOH) zu den korrespondierenden Alkoholen (ROH) abbauen. Organische Hydroperoxide entstehen vor allem bei Peroxidationen von Lipiden durch ROS.

Von den sechs bei Säugern bekannten GPx, gehören fünf zu der Gruppe der Selenoproteine, welche Selen in Form der Aminosäure Selenocystein beinhalten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht selenabhängige Glutathionperoxidasen

Name	Abkürzungen
Zytosolische bzw. klassische Glutathionperoxidase	cGPx, GPx-1
Gastrointerstinale Glutathionperoxidase	GI-GPx, GPx2
Plasma-Glutathionperoxidase	pGPx, GPx3
Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase	PHGPx, GPx4
Olfaktorische Glutathionperoxidase	GPx6

Die einzelnen GPx unterscheiden sich sowohl durch ihre Lokalisation als auch durch ihre Substratspezifität (Brigelius-Flohé, 1999, Brigelius-Flohé, 2006). Glutathionperoxidasen

kommen in allen Organen und Geweben vor, in besonders hoher Konzentration in der Leber (Young & Woodside, 2001).

Zum Abbau von H_2O_2 bzw. ROOH durch die GPx wird Glutathion (GSH) als Cofaktor benötigt. GSH fungiert bei dieser Reaktion als Elektronen-Donator, wodurch es selbst oxidiert wird. Die Oxidation von GSH führt zu Bildung von Glutathion-Disulfid (GSSG). Mittels der Glutathionreduktase (GR) kann GSH in einer NADPH^+ -abhängigen Reaktion aus GSSG regeneriert werden (Abb. 3).

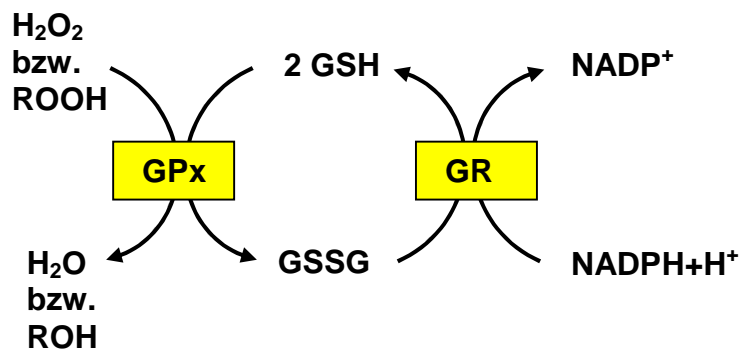


Abbildung 3: Reaktionen der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase

Dargestellt ist der Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. organischem Hydroperoxid (ROOH) mittels der Glutathionperoxidase (GPx). Die GPx benötigt Glutathion (GSH) als Cofaktor, welches bei der Reaktion oxidiert wird. Zwei oxidierte Moleküle GSH verbinden sich zu Glutathion-Disulfid (GSSG). GSH kann mittels der NADPH^+ -abhängigen Glutathionreduktase (GR) regeneriert werden.

Wie oben dargestellt, kann GSH enzymatisch, als Cofaktor der GPx, zum Abbau von ROS beitragen. Zusätzlich kann GSH auch nicht-enzymatisch mit ROS reagieren.

GSH, ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, enthält eine freie Thiolgruppe, mittels derer eine Reaktion mit ROS möglich ist (Abb.4)

Neben der Funktion als Antioxidants, spielt GSH unter anderem auch als Reaktionspartner bei dem Abbau von Xenobiotika sowie als Transport- und Speicherform von Cystein eine Rolle im zellulären Metabolismus (Anderson, 1998, Dringen, 2000).

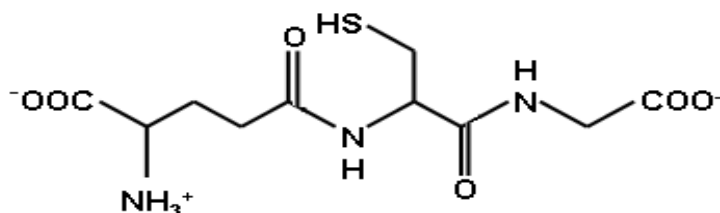


Abbildung 4: Glutathion

GSH wird in zwei ATP-abhängigen Schritten synthetisiert. In Abbildung fünf sind die Synthese-Schritte schematisch dargestellt. Zunächst werden, katalysiert durch die γ -Glutamylcystein-Synthetase, Glutamat und Cystein über eine γ -Peptidbrücke miteinander verknüpft. Diese γ -Peptidbrücke verhindert die Hydrolyse von GSH durch die meisten Peptidasen, wodurch die Halbwertszeit von GSH erhöht wird. Die für die Antioxidative Wirkung von GSH wichtige Thiolgruppe wird durch Cystein mit eingebracht. Mittels der Glutathion-Synthetase wird im Anschluss Glycin mit dem Dipeptid verknüpft.

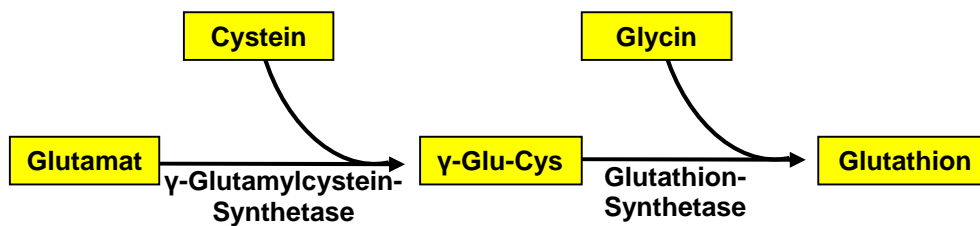


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Glutathion-Synthese

Die GSH-Synthese wird über einen Feedback-Mechanismus reguliert, so dass hohe GSH-Konzentrationen zu einer Abnahme der Synthese-Rate führen (Anderson, 1998). Neben GSH stellen Harnsäure, Pyruvat und einige Plasmaproteine weitere endogen synthetisierte Antioxidantien dar (Andrae et al., 1985, Halliwell & Gutteridge, 2007). So kann zum Beispiel Albumin, dem ein Hautanteil an den Plasmaproteinen zukommt, ähnlich wie Glutathion, über freie Thiolgruppen mit ROS interagieren und stellen so einen extrazellulären Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress dar. Durch die Interaktion mit ROS kommt es zwar zu einer Schädigung von Albumin, welche allerdings ohne weitreichende Folgen bleibt, da Albumin in hohen Konzentrationen vorkommt und zudem eine kurze Halbwertszeit aufweist (Young & Woodside, 2001).

Des Weiteren kommen auch den durch die Nahrung aufgenommenen Antioxidantien eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen oxidativen Stress zu.

Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Vitamin C und Vitamin E, Carotinoide und Flavonoide. Die schützende Funktion dieser Substanzen ergibt sich zu einem aus ihrer Rolle als Cofaktoren von diversen Enzymen als auch in einer direkten Reaktion mit ROS (Young & Woodside, 2001, Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.2 Hintergrund und Zielsetzung

Die Abteilung für Zellkultur des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein beschäftigt sich seit einigen Jahren mit reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativem Stress in C6-Astrogliazellen. In diesen Untersuchungen wurden und werden die Peroxide Cumolhydroperoxid (CHP) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet, um in C6-Astrogliazellen zytotoxischen oxidativen Stress auszulösen. Zur Bestimmung der zytotoxischen Potenz der Peroxide bzw. der Empfindlichkeit der C6-Zellen für deren zytotoxische Wirkung wird die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung gemessen und durch den EC_{50} -Wert, die halbmaximal zytotoxische Konzentration, charakterisiert. Je höher der EC_{50} -Wert um so geringer die zytotoxische Potenz der Peroxide bzw. die Empfindlichkeit der C6-Zellen.

Abbildung 6 zeigt, dass die Empfindlichkeit der C6-Zellen für die zytotoxische Wirkung von CHP und H_2O_2 ab dem Jahr 2006 deutlich höher war als vorher.

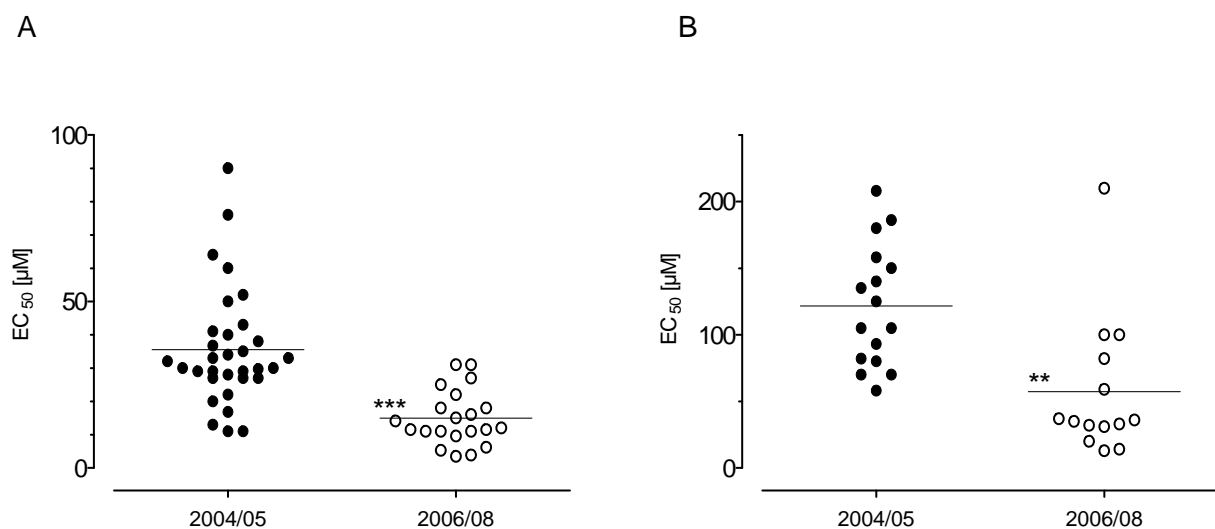


Abbildung 6: Halbmaximale zytotoxische Konzentrationen von CHP und H_2O_2

Dargestellt sind die halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von CHP (A) sowie von H_2O_2 (B) in C6-Zellkulturen aus den Jahren 2004 und 2005 (●) sowie aus den Jahren 2006 und 2008 (○). Die zytotoxische Wirkung von CHP und H_2O_2 wurde in 96-Well-Mikrotierplatten als Verlust von Zellprotein gemessen. Aus den resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die EC_{50} -Werte, die die halbmaximale zytotoxische Konzentration beschreiben, bestimmt.

** $p \leq 0,01$: signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test) zwischen den EC_{50} -Werten

*** $p \leq 0,001$: signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test) zwischen den EC_{50} -Werten

Quelle: Brenner et al., 2010

Als eine mögliche Ursache dafür kann die Umstellung der Erhaltungskulturbedingungen für die C6-Zellen mit dem Jahreswechsel 2005/2006 in Frage kommen. Bis Ende 2005 wurden die C6-Erhaltungskulturen in Ham's-F-10-Wachstumsmedium kultiviert. Dieses Wachstumsmedium enthielt neben dem Basismedium noch 15 % Pferdeserum (Horse Serum, HS) sowie 2,5 % fötales Rinderserum (Fetal Bovine Serum, FBS). Aus den Erhaltungskulturen angelegte Versuchskulturen wurden in Dulbecco's Minimal Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Ab dem Beginn des Jahres 2006 wurde ausschließlich DMEM-Wachstumsmedium mit 5% FBS eingesetzt, so dass ab diesem Zeitpunkt die Erhaltungs- und Versuchskulturen unter einheitlichen Bedingungen kultiviert wurden.

Im Folgenden wurde der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Peroxidresistenz von C6-Zellen untersucht. Sibylle Brenner verglich im Rahmen ihrer Masterarbeit die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber oxidativen Stressoren von in DMEM-Wachstumsmedium (5 % FBS) kultiviert und in Ham's-F-10-Wachstumsmedium kultivierten Zellen (15 % HS, 2,5 % FBS) (BRENNER, 2009).

Die oben beschriebene Beobachtung einer reduzierten Peroxidresistenz von in DMEM-Wachstumsmedium kultivierten Zellen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Zu dem zeigte sich, dass in den DMEM-Kulturen die Entgiftungsfähigkeit der C6-Zellen für CHP und H_2O_2 reduziert waren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen fand sich bei dem Vergleich der antioxidativen Schutzsysteme unterschiedlich kultivierter C6-Zellen. Der Gehalt an Glutathion (GSH) sowie die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) war in den in DMEM-Wachstumsmedium kultivierten Kulturen signifikant niedriger als in den in Ham's-F-10-Wachstumsmedium gewachsenen Kulturen (Brenner et al., 2010).

Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass zwischen den beiden eingesetzten Wachstumsmedien Unterschiede im Gehalt an exogener Antioxidantien und an, für die Funktion der endogenen antioxidativen Schutzsysteme notwendigen, Substanzen bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an α -Tocopherol, welches den Wachstumsmedien nur über die eingesetzten tierischen Seren hinzugefügt wird, in diesen Seren stark variiert (Müller, 2008). Während in Pferdeserum der α -Tocopherol-Gehalt bei $0,74 \pm 0,08 \mu\text{M}$ liegt, enthält fötales Rinderserum $1,08 \pm 0,3 \mu\text{M}$ α -Tocopherol. Daraus ergibt sich ein α -Tocopherol-Gehalt in Ham's-F-10-Wachstumsmedium (15 % HS, 2,5 % FBS) von $0,14 \mu\text{M}$. Im aktuell eingesetzten DMEM-Wachstumsmedium (5 % FBS) beträgt der Gehalt an α -Tocopherol dagegen nur $0,054 \mu\text{M}$ (Müller, 2008). Das lipophile α -Tocopherol agiert unter anderem in Zellmembranen als Radikalfänger und verhindert so die Lipidperoxidation. Eine gezielte Vorinkubation von C6-Zellen mit α -Tocopherol führte zu einer verstärkten

Resistenz der Zellen gegenüber CHP. Die Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber H_2O_2 blieb dagegen unbeeinflusst (Müller, 2008).

Auch die Rolle der intrazellulären antioxidativen Schutzsysteme für die Fähigkeit von C6-Zellen Peroxide zu eliminieren wurde untersucht. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber einem Peroxid maßgeblich von der Fähigkeit der Peroxid-Elimination abhängig ist.

Es zeigte sich, dass die einzelnen Bestandteile des Schutzsystems unterschiedlich bedeutend für die Entgiftung von CHP und H_2O_2 durch C6-Zellen sind. Während der Katalase ein erheblicher Einfluss bei der Entgiftung von H_2O_2 zu kommt, wird CHP hauptsächlich über das Glutathion-System abgebaut. Im Zuge dieser Untersuchung zeigte sich des Weiteren, dass eine Vorinkubation mit Selen zu einer gesteigerten Eliminationsrate, vorwiegend von CHP, in geringerem Ausmaß auch von H_2O_2 , führt (JESS, 2007) Erklärbar ist dieser Effekt mit der zentralen Rolle, die dem essentiellen Spurenelement Selen bei der Synthese der GPx zukommt (siehe Abschnitt 1.1.2).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte nun die weitergehende Untersuchung der Bedeutung der antioxidativen Schutzsysteme von C6-Astrogliazellen für die Zytotoxizität von H_2O_2 und CHP. Hierbei wurde ins Besondere der zentralen Rolle von Selen Beachtung geschenkt. Wie auch α -Tocopherol ist Selen nicht in den Basismedien Ham's-F-10 und DMEM enthalten und wird den Wachstumsmedien alleinig über die eingesetzten tierischen Seren hinzugefügt.

Aus den oben beschriebenen Beobachtungen, ergaben sich für die vorliegende Arbeit zunächst folgende Fragestellungen:

- Wie hoch sind die Selengehalte der verwendeten tierischen Seren und Kulturmedien? Unterscheiden sich die beiden Erhaltungskulturmedien hinsichtlich des Selengehaltes?
- Beeinflusst eine Supplementierung der Kulturmedien mit Selen die Glutathionperoxidase in C6-Zellen?
- Beeinflusst die Supplementierung der Kulturmedien mit Selen die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP und H_2O_2 ?
- Beeinflusst die Supplementierung der Kulturmedien mit Selen die Peroxid-induzierte Radikalbildung in C6-Zellen?

Neben der Erfassung des Einflusses von Selen, sollte auch die Bedeutung des Glutathion-Systems und der Katalase für die Zytotoxizität von H_2O_2 und CHP in C6-Astrogliazellen weitergehend untersucht werden. Zu diesem Zweck, sollte eine gezielte Beeinflussung der physiologischen Schutzsysteme durch folgende Substanzen erfolgen:

- den Katalase-Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)
- den Inhibitor der Glutathionsynthese Buthionin-Sulfoximin (BSO)
- den Glutathion-Prekursor Cystin

Die Auswirkung dieser Manipulation auf die zelluläre Katalase-Aktivität bzw. den zellulären Glutathionspiegel sowie auf die Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP und H_2O_2 sollten bestimmt werden. Zusammenfassend formuliert, sollte somit die Bedeutung der physiologischen Schutzsysteme für die Zytotoxizität von Peroxiden in C6-Astrogliazellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 C6 Astrogliazellen

Die für die vorliegende Arbeit genutzten Zellen gehören zu der Astrogliazelllinie C6. Diese permanente Zelllinie wurde aus einem primären Rattenhirntumor, der durch N-nitrosomethylharnstoff induziert wurde, von Benda et al. (1968) etabliert.

Die C6 Zellen wurden am 12.10.1999 in der 37. Passage von der American Type Culture Collection (ATCC: CCL 107) bezogen, dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden Zellen der Passage 45 bis 55 verwendet.

2.1.2 Materialien

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit 4,5g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot	c.c.pro: PM-13-S
DMEM ohne Glucose, ohne Pyruvat, ohne Phenolrot	PAN
Fötale Rinderserum (Fetal Bovine Serum, FBS)	Biochrom
Hepes Puffersubstanz	Merck
Glutamin (200 mM)	c.c.pro
D(+)-Glucose (wasserfrei)	Merck
Gentamycin (10mg/ml)	Gibco
Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	Gibco
Trypsin - EDTA (10x)	Gibco
Trypsin - TrypLE Select	Gibco
25 cm ² Zellkulturflaschen	Sarsted AG
75 cm ² Zellkulturflaschen	Sarsted AG
35 mm-Kulturschalen	Sarsted AG
96-Well-Mikrotiterplatten	Falcon
Schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden	Corning

2.1.3 Kulturmedien und Arbeitslösungen

Wachstumsmedium

Zur Herstellung des Wachstumsmediums wurde das DMEM Basismedium (mit Phenolrot, ohne Pyruvat) in ultra pure H₂O gelöst und mit 3,7 g/l NaHCO₃ sowie 4,766 g/l Hepes versehen. Des Weiteren wurde dem Medium Gentamycin und Fungizone, sowie fötales Rinderserum (FBS) wie folgt hinzugefügt:

Tabelle 2: Volumenverteilung [%] der flüssigen Bestandteile in DMEM-Wachstumsmedium

	DMEM Wachstumsmedium [Vol. %]
DMEM (mit Phenolrot, ohne Pyruvat)	93,5
FBS	5
Gentamycin (10 mg/ml)	1
Fungizone (250 µg/ml)	0,5

Es wurde zusätzlich noch phenolrotfreies, pyruvatfreies Wachstumsmedium verwendet. Zur Herstellung wurde dem phenolrotfreien DMEM-Basismedium neben 3,7 g/l NaHCO₃ und 4,766 g/l Hepes zusätzlich 20 ml/l Glutamin (200 mM) und 4,5 g/l Glucose hinzugefügt. Die weitere Zusammensetzung entspricht der des Wachstumsmediums mit Phenolrot, ohne Pyruvat (siehe Tabelle 2).

Versuchsmedien

Zur Herstellung der serumfreien Versuchsmedien wurde das oben beschriebene phenolrothaltige (Versuchsmedium 1) bzw. phenolrotfreie (Versuchsmedium 2) DMEM-Basismedium (98,5 %) mit Gentamycin (1 %) und Fungizone (0,5 %) versetzt. Auf den Zusatz von FBS wurde verzichtet.

PBS (Phosphate buffered saline nach Dulbecco)

Zusammensetzung des PBS Puffer ohne Calcium und Magnesium :

NaCl	8000 mg/l	Merck
Kcl	200 mg/l	Merck
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l	Merck
KH ₂ PO ₄	200 mg/l	Merck
Gelöst in 1 l ultra pure H ₂ O		

Der PBS Puffer mit Calcium und Magnesium wurde durch zusätzliches Hinzufügen von:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l	Merck
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	132 mg/l	Merck

hergestellt.

Trypsin-EDTA-Lösung

1 ml der 10-fach konzentrierten Trypsin-EDTA-Lösung wurde mit 9 ml des PBS Puffers ohne Calcium und Magnesium verdünnt.

Der pH-Wert aller Medien und Lösungen betrug 7,4. Vor Gebrauch wurden sie im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

2.1.4 Kultivierung

Die Erhaltungskulturen wurden in 25 cm² Flaschen bei 37°C im Begasungsschrank (10 % CO₂) kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS (ohne Ca und Mg) gespült. Dann wurde für ca. 35 Sekunden Trypsin EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) hinzugefügt. Im Verlauf der Laborarbeiten wurde diese Trypsin-Lösung durch rekombinantes Trypsin (TrypLE Select) ersetzt. Von dieser Trypsin-Lösung wurden dann ebenfalls 5 ml hinzugefügt und diese nach 1 Minute wieder entfernt. Nach Absaugen des Trypsins wurden die Kulturflaschen für 10 Minuten in den Brutschrank gestellt. Die Lösung der Zellkontakte und damit die Ablösung des Zellrasens, sind nach dieser Zeitspanne makroskopisch sichtbar. Anschließend wurden 5 ml des Wachstumsmediums hinzugegeben und die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren des Mediums weiter gelöst, so dass eine homogene Zellsuspension entstand. Diese wurde in ein auf Eis liegendes Röhrchen überführt. Um vor der Aussaat die genaue Zellkonzentration zu bestimmen, wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und mit 100 µl Trypanblau angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Thoma Zählkammer ausgezählt. Dabei gingen die durch die Blaufärbung gekennzeichneten toten Zellen nicht in die Zählung mit ein. Durch Verdünnen der Zellsuspension mit der entsprechenden Menge an Wachstumsmedium wurde die gewünschte Zellkonzentration für Erhaltungskultur bzw. Versuchskulturen hergestellt. Jede neue Erhaltungskultur erhielt eine an die differierenden Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Passagen angepasste Menge an Zellen, zwischen 100.000 Zellen (späte Passagen) und 500.000 Zellen (frühe Passagen) in 7 ml Wachstumsmedium. Am 2. und 4. Kulturtag wurde das Wachstumsmedium ausgetauscht.

2.2 Testsubstanzen

Natriumselenit (Na_2SeO_3)	Sigma-Aldrich
Cystin (L-Cystindihydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Buthionin-Sulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich
3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)	Sigma-Aldrich
Cumolhydroperoxid (CHP), 88 %	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Sigma-Aldrich

Das Natriumselenit, in Pulverform vorliegend, wurde lichtgeschützt bei Zimmertemperatur gelagert. Zur Behandlung der Zellen wurde das Natriumselenit abgewogen und direkt in Medium gelöst. Es wurde dabei eine 10 mM Stammlösung (34,59 mg Na_2SeO_3 /20 ml Medium) hergestellt, aus der die weiteren Konzentrationen, ebenfalls in Medium, angefertigt wurden.

Cystin, das in Form von kristallinem Pulver vorlag, wurde ebenfalls lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und in einer Endkonzentration von 0,5 mM Cystin im Wachstumsmedium verwendet. Zuerst wurde eine Stammlösung von 159,6 mM Cystin hergestellt. Dazu wurde das Cystin abgewogen und in 0,5 N HCl gelöst (50 mg Cystin/ml HCl). Anschließend wurde eine Konzentrationsreihe mit absteigenden Konzentrationen in Medium hergestellt. Bei der Konzentration von 0,5 mM Cystin war durch die starke Verdünnung nur noch 0,00314 N HCl im Medium enthalten.

Die Hemmstoffe 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) und Buthionin-Sulfoxamin (BSO) wurde bei -20°C (3AT) bzw. 4°C (BSO) lichtgeschützt gelagert und konnten direkt in Medium gelöst werden. 3AT wurde in einer Konzentration von 10 mM (25,224 mg 3AT/30 ml) benutzt. BSO wurde erst in einer 10 mM Stammlösung angesetzt (44,462 mg BSO/20 ml) und diese dann auf 0,5 mM verdünnt.

Die Lagerung der beiden Peroxide erfolgte im Kühlschrank bei 4°C . Zur Exposition der Zellen mit den Peroxiden, wurden diese direkt im Versuchsmedium gelöst. Durch den Verzicht auf FBS im Medium, konnte das weitere Wachstum der Zellen während der Inkubation mit den Peroxiden verhindert werden.

Aus der 30 %igen H_2O_2 -Lösung (8,18 M) wurde zunächst durch Vermengung von 100 μl H_2O_2 -Lösung mit 9,9 ml Medium eine 88,18 mM H_2O_2 -Lösung hergestellt. Von dieser wurde anschließend 1 ml mit 7,818 ml Medium vermengt, so dass eine 10 mM Stammlösung entstand. Aus dieser Stammlösung wurden die benötigten Konzentrationen hergestellt.

CHP lag in Form einer 88 %igen Lösung vor. Aus dieser Lösung wurde eine 10 mM Stammlösung erstellt, in dem 17,3 ml mit 10 ml Medium vermischt wurde. Aus dieser Stammlösung wurden anschließend die eingesetzten CHP-Konzentrationen hergestellt.

Die Stammlösungen und die dazugehörigen Konzentrationsreihen wurden an den Versuchstagen frisch angesetzt.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Versuche zur Beeinflussung der physiologischen Schutzsysteme

2.3.1.1 Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Versuche zur Beeinflussung der physiologischen Schutzsysteme, sowohl durch antioxidativ-wirkende Substanzen als auch durch Hemmstoffe der antioxidativen Systeme, durchgeführt. Die Abbildung 7 zeigt den prinzipiellen Aufbau dieser Versuche.

Die Versuchskulturen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten durch Einsaat von 20.000 Zellen/Well (200 µl Medium/Well), in 35 mm Kulturschalen durch Einsaat von 400.000 Zellen/Schale (2 ml Medium/ Schale) bzw. in 75 cm² Kulturflaschen durch Einsaat von 5 x 10⁶ Zellen/Flasche (21 ml Medium/Flasche) hergestellt und für 72 bzw. 74 Stunden in Wachstumsmedium kultiviert (10 % CO₂, 37° C). Während dieser Wachstumsphase wurden die Zellen über den gesamten Zeitraum mit Natriumselenit oder Cystin bzw. über die letzten 24 Stunden mit BSO oder die letzten 2 Stunden mit 3AT behandelt (Abb. 8). Parallel wurde jeweils Kontrollkulturen in zusatzfreiem Wachstumsmedium angelegt. Die Kontrollkulturen wurden analog zu den Versuchskulturen behandelt, d. h. die Medien wurden zu den gleichen Zeiten ausgewechselt, allerdings wurde hierbei durchgängig zusatzfreies Wachstumsmedium benutzt.

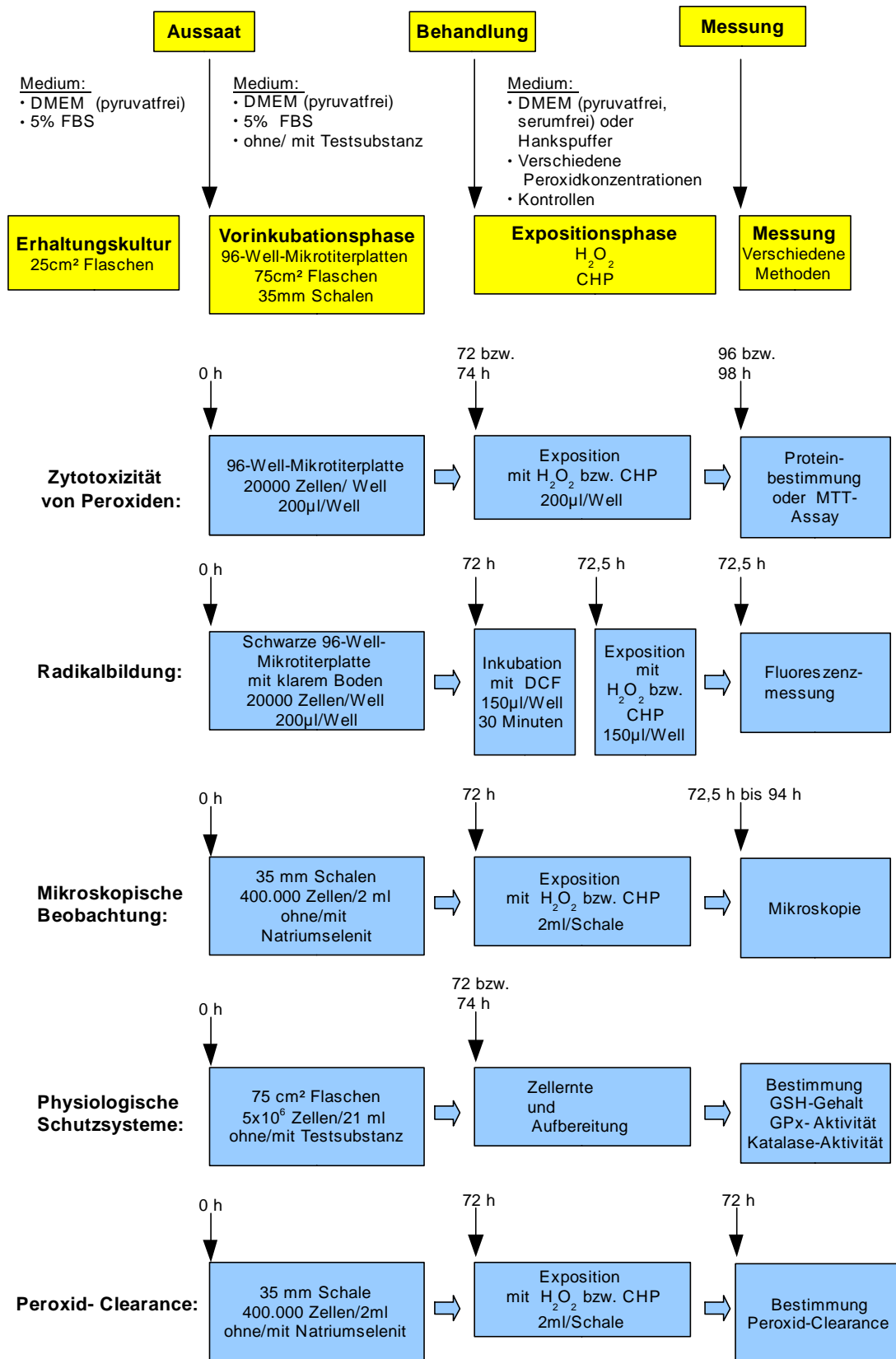


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die gelb unterlegten Felder zeigen eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsphasen. Die blau unterlegten Felder stellen die Versuchsbedingungen der durchgeführten Versuche dar.

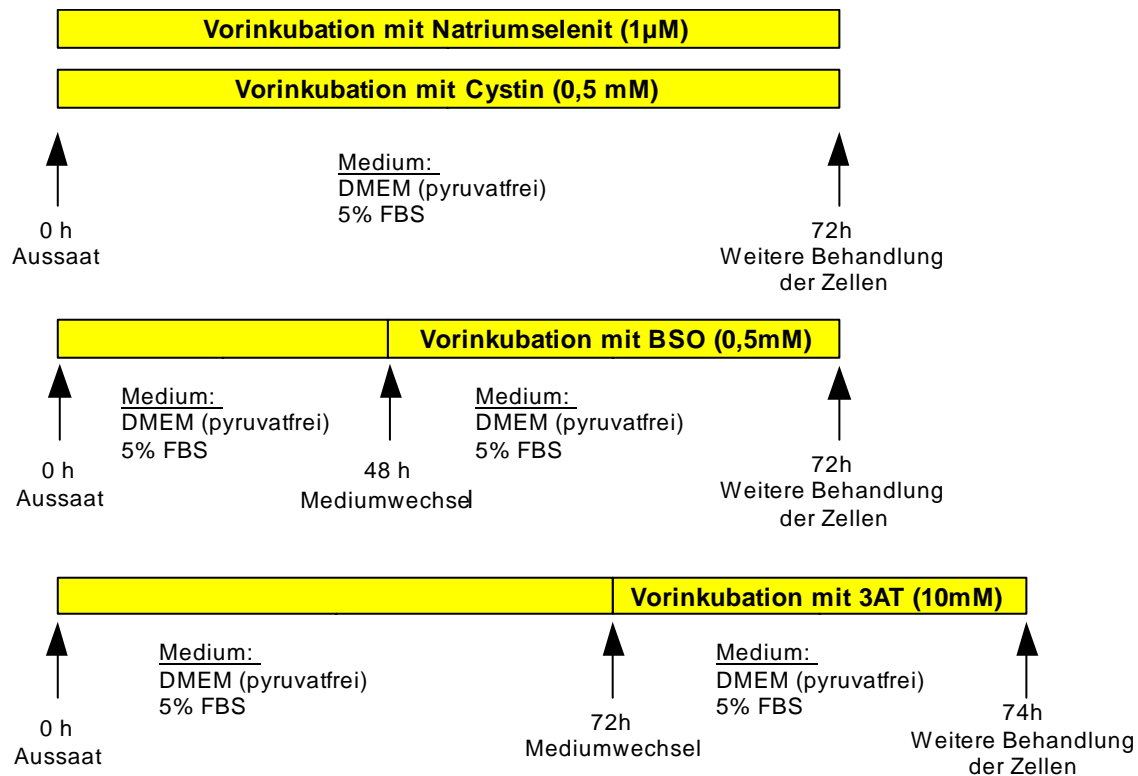


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vorinkubationsprotokolls

Dargestellt sind der zeitliche Verlauf und die Bedingungen bei der Vorinkubation.

BSO: Buthionin-Sulfoximin

3AT: 3-Amino-1,2,4-triazol

Nach der Vorinkubationsphase wurde das Medium der Kontroll- und Versuchskulturen abgesaugt, die Zellen für die Bestimmung des Glutathiongehalts bzw. der Aktivität antioxidativer Enzyme geerntet (75 cm² Flaschen) oder die Zellen zweimal mit serumfreiem Versuchsmedium gewaschen und

- die Mikrotiterplattenkulturen mit den Peroxiden CHP oder H₂O₂ in serumfreiem Versuchsmedium inkubiert zur Bestimmung ihrer zytotoxischen Potenz
- die Black-Well-Mikrotiterplatten zuerst mit DCF und darauf mit CHP oder H₂O₂ in serumfreiem Versuchsmedium inkubiert zur Erfassung der peroxidinduzierten intrazellulären Radikalbildung
- die 35 mm Schale mit den Peroxiden CHP oder H₂O₂ in serumfreiem Versuchsmedium inkubiert zur Bestimmung der Peroxid-Elimination
- die 35 mm Schalen mit den Peroxiden CHP oder H₂O₂ in serumfreiem Versuchsmedium inkubiert zur mikroskopischen Untersuchung des Zeitverlaufs der Peroxidwirkung

2.3.1.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

2.3.1.2.1 Zytotoxizitätstest

Am ersten Versuchstag wurden die C6-Zellen in den 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Dabei wurden in den Spalten 3-10, jeweils in den Wells B-G, 20.000 Zellen in 200µl Wachstumsmedium ausgesät. Die äußeren Wells wurden freigelassen, diese waren für die notwendigen Standards bei der späteren Proteinbestimmung vorgesehen. Auch für Platten, deren Zellen später mit dem MTT-Test auf ihre Vitalität untersucht werden sollten, wurde diese Belegung der Platte gewählt.

Bei der Aussaat wurden die in Abbildung 7 dargestellten Bedingungen der Vorinkubation eingehalten. Somit wurden die Zellen je nach der zu untersuchenden Substanz auf unterschiedliche Weisen und über unterschiedliche Zeiträume vorinkubiert. Die ersten 72 bzw. 74 Stunden der Versuche unterschieden sich daher voneinander, danach wurde bei allen Versuchen einheitlich vorgegangen.

Nach 72 bzw. 74 Stunden wurde das serumhaltige Medium abgesaugt und die gesamte Mikrotiterplatte zweimal mit serumfreiem Versuchsmedium gespült, um jegliche Reste des FBS gründlich zu entfernen.

Zur Erfassung der Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von CHP und H₂O₂ wurden die Mikrotiterplatten-Kulturen mit sechs unterschiedlichen Konzentrationen eines Peroxids behandelt.

Sowohl bei den Versuchen mit H₂O₂, als auch bei den Versuchen mit CHP, wurden Konzentrationen von 10, 20, 50, 100, 200 und 500 µM H₂O₂ bzw. CHP benutzt (Abb.10). Lediglich bei der Untersuchung des Einflusses der Vorinkubation mit BSO, wurden bei zusätzlichen Versuchen Konzentrationen von 1, 2, 5, 10, 20 und 50 µM CHP eingesetzt.

Für die Proteinbestimmung erhielten jeweils sechs Wells 200 µl serumfreies Versuchsmedium mit dergleichen Peroxidkonzentration. Die Wells der Spalten 3 und 7 erhielten je 200 µl peroxidfreies Versuchsmedium, da diese als Kontrollen genutzt wurden.

Zur Durchführung des MTT-Tests wurde sowohl serum- als auch phenolrotfreies Versuchsmedium (Versuchsmedium 2) verwendet. Zudem wurde hierbei jedes Well mit nur 150 µl peroxidhaltigem bzw. bei den Kontroll-Wells peroxidfreiem Medium befüllt.

Nach der 24-stündigen Peroxid-Exposition wurde die zytotoxische Wirkung als Verminderung des Proteingehalts je Well (Proteinbestimmung) oder als Verminderung der Zellvitalität (MTT-Test) gemessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
A													A								
B			Kontrolle	10µM CHP bzw. H ₂ O ₂	20µM CHP bzw. H ₂ O ₂	50 µM CHP bzw. H ₂ O ₂	Kontrolle	100 µM CHP bzw. H ₂ O ₂	200 µM CHP bzw. H ₂ O ₂	500 µM CHP bzw. H ₂ O ₂				B							
C																				C	
D																					D
E																					E
F													F								
G													G								
H													H								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									

Abbildung 9: Expositionsschema für CHP und H₂O₂

2.3.1.2.2 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Beobachtung des Einfluss der Vorinkubation mit Natriumselenit auf die Wirkung von Peroxiden, wurden C6-Zellen in 35mm Kulturschalen ausgesät. Es wurden jeweils 400.000 Zellen in 2 ml Wachstumsmedium ausgesät. Sowohl für den Versuch mit H₂O₂ als auch für den Versuch mit CHP, wurden acht Kontrollkulturen und acht mit Natriumselenit vorinkubierte Kulturen angelegt.

Nach 72 Stunden wurden die Zellen zwei Mal mit serumfreiem Versuchsmedium 1 gespült und darauf folgend mit verschiedenen Konzentrationen der Peroxide behandelt. Direkt im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen mikroskopisch beobachtet und nach morphologischen Charakteristika beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten mittels einer an das Phasenkontrastmikroskop (IMT-2, Olympus) angeschlossenen Digitalkamera (E-300, Olympus) in 10- und 20facher Vergrößerung fotografiert. Es wurden Aufnahmen nach 30 Minuten, 1, 2, 4, 6 und 22 Stunden gemacht und ausgewertet. Nach der letzten Aufnahme wurden die Zellen mit PBS-Puffer zweimal gespült und anschließend eingefroren (-20°C). Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte dann aus den 35mm -Kulturschälchen eine Proteinbestimmung nach Lowry.

2.3.1.3 Einfluss auf die Elimination von Peroxiden

Der Einfluss der Vorinkubation auf die Peroxid-Elimination durch C6-Zellen, wurde mittels der Xylenolorange Methode (Jingen et al., 1990) untersucht. Dazu wurden je 400.000 Zellen/35 mm Schale ausgesät und für 72 Stunden in 2 ml zusatzfreiem Kulturmedium (Kontrollen) bzw. 2ml natriumselenithaltigem Kulturmedium (1 μM Natriumselenit) kultiviert. Nach dieser Inkubationsphase erfolgte die Peroxid-Exposition mit 100 μM H_2O_2 bzw. 100 μM CHP und anschließender Bestimmung der Peroxidkonzentrationen im Medium über 30 Minuten.

2.3.1.4 Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung

Um den Einfluss der Vorinkubation mit Natriumselenit auf die durch Peroxide ausgelöste Bildung von Radikalen zu untersuchen, wurden spezielle schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem, durchsichtigem Boden benutzt. Diese waren notwendig, um beim Dichlorfluorescein-Assay eventuelle Störungen durch benachbarten Wells zu vermeiden.

Am 1. Tag wurden die Zellen in die Mikrotiterplatte ausgesät. Dabei wurden in den Wells der Spalten 2-6 je 20.000 Zellen/Well in phenolrotfreiem Wachstumsmedium. In den Spalten 7-11 wurden die Zellen in phenolrotfreiem Wachstumsmedium dass 1 μM Natriumselenit beinhaltetete, ausgesät. Die äußeren Wells wurden frei gelassen, da dort später die Blindwerte eingesetzt wurden (Abb. 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C		20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl	20.000 Zellen/200 μl		C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 10: Aussaat- und Vorinkubationsschema für die Bestimmung der Peroxid-induzierten Radikalbildung in Mikrotiterplatten

Die gelb unterlegten Spalten stellen die mit 1 μM Natriumselenit vorinkubierten Zellen dar.

Die Zellen wurden dann für 72 Stunden kultiviert. Nach dieser Wachstums- bzw. Vorinkubationsphase folgte die Peroxid-Exposition und die Bestimmung der intrazellulären Radikalbildung mittels des Dichlorfluorescein (DCF)-Assay.

2.3.1.4 Einfluss auf den Glutathiongehalt und die Aktivität antioxidativer Enzyme

Zur Bestimmung der intrazellulären Antioxidantien, wurden C6-Kulturen in 75cm² Flaschen angelegt. Dabei wurden pro Kulturflasche 5×10^6 Zellen in 21 ml Wachstumsmedium ausgesät. Zur Vorinkubation wurden Natriumselenit, Cystin, 3AT und BSO eingesetzt. Zur Aussaat und Kultivierung wurden die oben beschriebenen Vorinkubationsprotokolle benutzt. Um ausreichend Zellmaterial für die Bestimmung des Glutathiongehalt und der Enzymaktivitäten zu haben, wurden jeweils drei Kulturflaschen mit vorinkubierten C6-Zellen, sowie zugehörigen Kontrollkulturen, in drei aufeinander folgenden Passagen angelegt.

Die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert, danach erfolgte die Zellernte.

Zur Zellernte wurden das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem Ca²⁺- und Mg²⁺-haltigem PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummispatel vom Boden der Kulturflasche gelöst, mit 10 ml PBS-Puffer abgespült und in ein vorgekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses Verfahren wurde fünf Mal wiederholt, so dass 50 ml Zellsuspension pro Flasche gewonnen wurde. Diese Zellsuspension wurde dann für 10 Minuten bei 4°C und 2000xg zentrifugiert. Im Folgenden wurde der Überstand vorsichtig abgehoben, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Hierauf folgte ein erneutes Zentrifugieren, wiederum zehnminütig, bei 4°C und 2000xg. Der entstandene Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und das Zellpellet zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die so gewonnen Pellets wurden bei -80°C gelagert und erst bei der Bestimmung des Glutathiongehalt oder der Enzymaktivität weiter aufbereitet. Aus den Pellets wurde zu diesem Zeitpunkt dann auch eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.3.2. Versuche zur Zytotoxizität von Natriumselenit

Proliferierende C6-Zellen

Bei den Versuchen zur zytotoxischen Wirkung von Natriumselenit auf proliferierende C6-Zellen, wurden die Zellen in Wachstumsmedium in die 96-Well-Mirkotiterplatten ausgesät.

Hierbei wurden je Well jeweils 10.000 Zellen in 200 μ l Wachstumsmedium ausgesät und diese für 24 Stunden kultiviert. Die äußeren Wells der Mikrotiterplatte wurden freigelassen, da bei der folgenden Proteinbestimmung diese mit den Standards bestückt wurden. Nach 24 Stunden wurde das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen zweimalig mit Wachstumsmedium gespült und anschließend die Zellen mit unterschiedlichen Natriumselenitkonzentrationen in Wachstumsmedium inkubiert (Abb. 12). Jeweils 6 Wells erhielten 200 μ l Wachstumssmedium mit derselben Natriumselenitkonzentration. Die Wells der Spalten 3 und 7 wurden als Kontrollen genutzt. Diese Zellen wurden mit zusatzfreiem Wachstumsmedium behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurde der Zellproteingehalt der Wells mittels der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt.

Wachstumsgehemmte C6-Zelle

Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Natriumselenit auf wachstumsgehemmte C6 Zellen, wurden 20.000 Zellen/Well in 200 μ l Wachstumsmedium ausgesät. Die äußeren Wells der Mikrotiterplatte wurden wiederum freigelassen, da später hier die Standards für die Proteinbestimmung eingesetzt wurden. Nach einer 72-stündigen Kultivierungszeit, wurde die Zellen zweimalig mit dem serumfreien Versuchsmedium 1 gespült und anschließend mit 200 μ l mit unterschiedlichen Natriumselenitkonzentrationen in Versuchsmedium 1 für 24 Stunden inkubiert (Abb. 12).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
A													A								
B			Kontrolle	3 μ M Natriumselenit	10 μ M Natriumselenit	30 μ M Natriumselenit	Kontrolle	100 μ M Natriumselenit	300 μ M Natriumselenit	1000 μ M Natriumselenit			B								
C																				C	
D																					D
E																					E
F																					F
G																					G
H													H								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									

Abbildung 11: Inkubationsschema für die Zytotoxizitätsbestimmung von Natriumselenit in Mikrotiterplatten

Hierbei wurden ebenfalls jeweils 6 Wells mit dergleichen Natriumselenitkonzentration behandelt. Die Wells der Spalten 3 und 7 wurden als Kontrolle genutzt. Daher wurden diese Wells nicht mit Natriumselenit inkubiert, sondern nur mit Versuchsmedium 1 behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry.

2.4 Messmethoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung bei den vorliegenden Versuchen, wurden zwei verschiedene Methoden benutzt. Die Zellproteinmenge in den Mikrotiterplatten und 35mm Schalen-Kulturen wurde mit einem von Lowry et al. (1951) entwickelten Verfahren bestimmt. Die Proteinmenge im Zelllysat wurde mit dem von M. M. Bradford (1976) entwickelte Bradford-Assay bestimmt.

2.4.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Lowry-Methode beruht auf zwei Reaktionen. Zu einem wird die Biuret-Reaktion genutzt, bei der sich im alkalischen Milieu gelöstes Biuret (Carbamoylharnstoff), Cu^{2+} von Kupfersulfat und Proteine zu einem farbigen Biuret-Komplex zusammenlagern. Cu^{2+} -Ionen werden in diesen Komplexen zu Cu^+ -Ionen reduziert. Des Weiteren wirken diese Cu^+ -Ionen reduzierend auf Natriumwolframat und -molybdat, wodurch diese in verschiedene reduzierte Formen, mit charakteristischer Blaufärbung, umgewandelt werden. Darüber hinaus wirken Tyrosin und Tryptophan, und in geringerem Ausmaß Cystin, Cystein und Histidin, auch direkt reduzierend auf Natriumwolframat und -molybdat. Natriumwolframat und -molybdat werden bei dieser Methode in Form von Folin-Ciocalteus Phenolreagenz eingesetzt. Die Extinktion der Blaufärbung wurde bei 630 nm im Mikrotiterplattenphotometer (BIO-TEK EL_x800_{UV}) gemessen.

Materialien und Lösungen:

Folin-Reagenz

Merck

Rinderserum-Albumin (BSA)

Sigma-Aldrich

PBS Puffer mit Calcium, Magnesium:

NaCl	8000 mg/l
Kcl	200 mg/l
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	132 mg/l

Gelöst in einem Liter ultra pure H₂O.

Biuretlösung: 48 Teile 4 % Na₂CO₃, 1 Teil 2 % K-Na-Tartrat und 1 Teil 1 % CuSO₄ x 5 H₂O, frisch angesetzt am Messtag

Folinlösung: 1 Teil Folin-Reagenz und 1 Teile ultra pure H₂O

Proteinstandards: Es wurden sechs verschiedene Standards verwendet, die aus Rinderserum-Albumin in 0,5 N NaOH gelöst, bestanden. Die Proteinmenge der Standards lag zwischen 0,025 und 0,4 mg BSA/ml.

Nach dem Ansetzen wurden die Standards portionsweise in Eppendorfhütchen pipettiert und tiefgefroren gelagert. Am Versuchstag wurde die benötigte Menge aufgetaut.

Die Proteinbestimmung wurde stets in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Je nachdem, ob der Proteingehalt direkt in 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen oder aus 35 mm-Kulturschalen bestimmt werden sollte, wurden die Wells oder Schalen unterschiedlich vorbehandelt. Bei den Versuchen in denen die Zellen direkt in den 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät wurden, wurde in einem ersten Schritt das Medium entfernt und alle Wells drei Mal mit 200µl des PBS Puffer (ohne Ca und Mg) gespült.

In die zellhaltigen Wells der Spalten 3-10 wurde anschließend 60µl 0,5 N NaOH gegeben und die Mikrotiterplatte zur besseren Zellsolubilisierung für 45 Minuten auf dem Shaker-Inkubator bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden in die beiden äußeren, zellfreien Spalten je 60 µl/Well 0,5 N NaOH (Blindwerte) und Proteinstandards pipettiert (Abb. 13). Nachfolgend wurden 150 µl Biuretlösung in jedes Well gegeben und die Platte erneut für 10 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt.

In einem letzten Arbeitsschritt wurde den Wells 60 µl Folinlösung hinzugefügt, dieses durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gut vermischt und die Mikrotiterplatte für 20 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit, wurden die Extinktion der

entstandenen Blaufärbung bei 630 nm mittels des Mikrotiterplattenphotometer (BIO-TEK Elx800uv) gemessen. Aus den blindwertbereinigten Extinktionen der Proteinstandards wurde eine Eichgerade erstellt, die es ermöglichte, der gemessenen Extinktion eines Wells die entsprechende Proteinmenge in $\mu\text{g}/\text{Well}$ zuzuordnen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	St3									St3	Blk	A
B	Blk	St3									St3	Blk	B
C	Blk	St4									St4	Blk	C
D	Blk	St4	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	St4	Blk	D
E	St1	St5	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	St5	St1	E
F	St1	St5	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	St5	St1	F
G	St2	St6	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	St6	St2	G
H	St2	St6	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	C6-Zellen	St6	St2	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 12: Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Lowry in Mikrotiterplatten

Blk: 0,5 N NaOH

St1-St6: Proteinstandards (24, 18, 12, 6, 3, 1,5 μg BSA/Well)

Bei der Bestimmung des Proteingehalts in den 35 mm-Schalen, die bei der mikroskopischen Untersuchung eingesetzt wurden, mussten die bei -20°C trocken eingefrorenen Zellen zunächst in 1 ml 0,5 N NaOH aufgetaut und aufgelöst werden. Dazu wurden die Schälchen für 45 Minuten auf den Shaker-Inkubator geschüttelt. Eine Mikrotiterplatte wurde vorbereitet, indem die äußeren beiden Reihen mit je 60 μl /Well 0,5 N NaOH (Blindwerte) bzw. Proteinstandards wie oben beschrieben befüllt wurden.

Anschließend wurden jeweils 60 μl der Proteinproben in die frei verfügbaren übrigen Wells pipettiert. Dabei wurden von jeder Probe 1:2-, 1:4-, 1:8- und 1:16-Verdünnungen mit 0,5 N NaOH hergestellt. Zudem erfolgte eine Doppelbestimmung.

Die weitere Behandlung und Messung erfolgte gemäß dem oben beschriebenen Vorgehen.

Bei den direkt in den 96-Well-Mikrotiterplatten angesetzten Versuchen, wurde der gemessene Proteingehalt der Kontroll-Wells (jeweils sechs Wells von zwei Kontrollreihen) gemittelt und diesem Wert 100 % zugeordnet. Der Proteingehalt der Testreihen wurde ebenfalls gemittelt und anschließend in % der Kontrolle angegeben.

Die gemessene Proteinmenge der 35 mm-Schalen wurden gleichermaßen gemittelt, die Verdünnungsfaktoren mit einbezogen. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde als 100 % gesetzt, die Proteinmenge der Testschalen als % der Kontrolle ausgedrückt.

2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die zur Bestimmung des Glutathiongehalts und der Enzymaktivität angelegten und behandelten Zellkulturen wurden nach der Zellernte in Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren. Zur Messung des Glutathiongehalts und der Enzymaktivität mussten diese Zellproben in unterschiedlicher Weise aufgeschlossen werden (vgl. 2.4.5, 2.4.6). Da bei der Aufbereitung der Zellpellets die Detergenzien EDTA und Triton X-100 benötigt wurden, und diese die Proteinbestimmung nach Lowry stören, wurde zur Bestimmung des Proteingehalts die von Bradford (1976) entwickelte Methode eingesetzt.

Bei dem Bradford-Assay wird ein Triphenylmethanfarbstoff genutzt, der in der ungebunden, kationischen Form sein Absorptionsmaximum bei 470 nm hat und rotgefärbt ist. In saurem Milieu hat dieser Farbstoff die Eigenschaft mit Proteinen Komplexe zu bilden. Bei dieser Komplexbildung wird der Triphenylmethanfarbstoff in seine anionische, blaue Form überführt und seine Absorptionsmaximum verlagert sich auf 595 nm (Compton & Jones, 1985). Da die photometrisch bestimmte Absorption direkt proportional zu der Proteinkonzentration ist, kann so der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

Materialien und Lösungen:

Halbmikroküvetten	Sarstedt
Rührspatel	Sarstedt
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich
Rinderserum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth GmbH

Proben-Verdünnungspuffer: 0,1 % Triton X-100 und 1mM EDTA in 50mM TRIS-HCl (0,606g TRIS ad 100ml ultra pure H_2O , Tritation mit HCl bis pH-Wert 7,4) lösen

Proteinstandards: Es wurden sechs verschiedene Standards verwendet, die aus Rinderserum-Albumin in Proben-Verdünnungspuffer gelöst, bestanden. Die Proteinmenge der Standards lag zwischen 0,125 mg BSA/ml und 2 mg BSA/ml.

Nach dem Ansetzen wurden die Standards portionsweise in Eppendorfhütchen pipettiert und tiefgefroren gelagert. Am Versuchstag wurde die benötigte Menge aufgetaut.

Die Arbeitslösungen und die Proteinstandards wurden zur Durchführung des Assays auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt. Mit dem Proben-Verdünnungspuffer wurden aus den Proben 1:10-, 1:20- und 1:40-Verdünnungen hergestellt.

Der Assay konnte direkt in den Halbmikroküvetten angesetzt werden. Dazu wurden 50µl der verdünnten Probe oder der Standards mit 1,5 ml des Bradford-Reagenz vermengt und mittels der Rührspatel gut durchmischt. Als Blindwert wurden 50µl Proben-Verdünnungspuffer mit 1,5 ml Bradford-Reagenz eingesetzt. Es erfolgte immer ein doppelter Ansatz der Proben und der Standards, so dass eine Doppelbestimmung erfolgen konnte. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism wurde aus der Absorption der Standards eine Standardkurve ermittelt, um die Proteinkonzentration der Probe zu bestimmen. Diese Proteinkonzentration [mg/ml] wurde für die Normierung der Glutathiongehalte sowie der Aktivitäten von Katalase und Glutathionperoxidase verwendet.

2.4.2 MTT-Test

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen wurde der MTT-Test (Mosmann, 1983), eingesetzt. Bei dem MTT-Test wird Tetrazoliumsalz (MTT) eingesetzt, welches von Dehydrogenasen in Mitochondrien von lebenden Zellen zu violetter Formazan reduziert wird. Die Farbentwicklung kann photometrisch bestimmt werden.

Materialien und Lösungen:

DMEM ohne Glucose, ohne Pyruvat, ohne Phenolrot	PAN
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck

MTT-Lösung:

Es wurden 5 mg MTT-Pulver pro 1 ml PBS Puffer gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Solubilisierungslösung:

Zunächst wurde eine 50 %ige DMF- und eine 80 %ige Essigsäure-Lösung in ultra pure H₂O hergestellt. Zur Herstellung von 100 ml Solubilisierungslösung wurden 20 g SDS in etwa 70 ml 50 %iger DMF-Lösung gelöst, dann 2,5 ml der 80 %igen Essigsäurelösung und 2,5 ml 1N HCl hinzugefügt und zuletzt mit 50 %iger DMF-Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Die Lösungen sowie das Versuchsmedium wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Bei dem MTT-Test wurde in die mit Medium befüllten Wells (150 µl Medium/Well) zusätzlich 25 µl MTT-Lösung gegeben und die Mikrotiterplatten für eine Stunde im Brutschrank bei 37° und 10 % CO₂ inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Platte wieder herausgenommen und in jedes Well 75 µl Solubilisierungslösung gegeben. Durch die Solubilisierungslösung wurde die weitere Farbentwicklung gestoppt. Zur besseren Vermischung wurden die Platten für 5 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Dann folgte eine weitere zweistündige Inkubationsphase im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO₂.

Vor der photometrischen Messung wurden die Zellen erneut auf dem Shaker-Inkubator für zwei Minuten geschüttelt und die Lösungen in den einzelnen Wells zusätzlich mittels eines Plastikspatels umgerührt. Die Extinktion wurde bei 570 nm gemessen.

Die Absorption der Kontrollgruppen wurde gemittelt und gleich 100 % gesetzt. Die Absorptionen der Testgruppen wurden ebenfalls gemittelt und als % der Kontrolle ausgedrückt.

2.4.3 Xylenolorange Methode

Zur Bestimmung der H₂O₂- bzw. CHP-Elimination wurde die H₂O₂- bzw. CHP-Konzentration in Medium über einen Zeitraum von 30 Minuten mittels der Xylenolorange Methode von Jiang et al. (1990) bestimmt. Peroxide oxidieren in saurem Milieu Fe²⁺ zu Fe³⁺. Die Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺ wird durch D(-)Sorbit katalysiert. Fe³⁺ reagiert mit dem Triphenylmethanfarbstoff Xylenolorange zu einem farbigen Komplex. Die Absorption durch diesen Komplex kann bei 540-560 nM quantifiziert werden.

Materialien und Lösungen:

96-Well-Mikrotiterplatten	Falcon
Ammonium Eisen(II)sulfat-Hexahydrat ((NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂)	Merck
D(-)-Sorbit (Sorbitol)	Merck
Xylenolorange	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 95-97 %	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Sigma-Aldrich
Cumolhydroperoxid (CHP), 88 %	Sigma-Aldrich

Schwefelsäure-Lösung (25 mM):

Zunächst wurde eine 1 M H₂SO₄-Stammlösung hergestellt. Dazu wurde 1 ml der 18 M H₂SO₄-Lösung (entspricht 95-97 % H₂SO₄) mit 17 ml ultra pure H₂O vermengt. 12,5 ml dieser Stammlösung wurden anschließend mit 487,5 ml ultra pure H₂O zu einer 25 mM H₂SO₄-Lösung verdünnt.

Reaktionslösung:

In 100 ml der 25 mM H₂SO₄-Lösung wurden 19,61 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 3,6434 g D(-)-Sorbit und 15,212 mg Xylenolorange gelöst. Die Reaktionslösung wurde lichtgeschützt bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

H₂O₂- bzw. CHP-Standards:

Es wurden eine 10 mM-H₂O₂-Stammlösung sowie eine 10 mM-CHP-Stammlösung in phenolrot-, serumfreiem Versuchsmedium 2 angesetzt. Aus dieser wurden anschließend durch Verdünnung die benötigten Standards zwischen 3,125 und 100 µM H₂O₂ bzw. CHP hergestellt.

Die benötigten Lösungen und Standards wurden frisch angesetzt. Zusätzlich wurden 10 ml eines 100 µM H₂O₂-haltigem bzw. eines 100 µM CHP-haltigem Mediums hergestellt. Danach wurden für jedes Peroxid je zwei Mikrotiterplatten vorbereitet. Dazu wurden in alle Wells der Mikrotiterplatte 140 µl der 25 mM H₂SO₄-Lösung gegeben und die Blindwerte (jeweils 10 µl Versuchsmedium/Well) und die Standards (jeweils 10 µl/Well), gemäß des Schema (Abb.14) pipettiert.

Anschließend wurden die 35 mm-Schalen, eine Kontrollkultur sowie eine mit 1 μM Natriumselenit vorinkubierte Kultur, aus dem Brutschrank entnommen, das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 2ml phenolrotfreiem Versuchsmedium gespült.

Jede 35mm-Schale erhielt im Anschluss 2 ml des 100 μM -H₂O₂-haltigem, bzw. des 100 μM -CHP-haltigem Mediums und wurden wieder in den Brutschrank gestellt. Im Folgenden wurde jeweils 10 μl des 100 μM -H₂O₂-haltigem, bzw. des 100 μM -CHP-haltigem Mediums in die drei Wells P1 pipettiert. Jeweils nach 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 Minuten wurde die 35 mm-Schale aus dem Brutschrank genommen, vorsichtig durchmischt und 30 μl des Mediums entnommen und jeweils 10 μl davon in die Wells P2 bis P7 pipettiert (Abb. 14).

Im Anschluss wurde jedem Well 150 μl der Reaktionslösung hinzugefügt und die Mikrotiterplatte bei Zimmertemperatur für 45 Minuten auf dem Shaker-Inkubator vorsichtig durchmischt. Nach dieser Inkubationszeit folgte die Absorptionsbestimmung bei 570 nm mit dem Mikrotiterplattenphotometer (BIO- TEK EL_x800_{UV}).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	St3	P1	P3	P5	P7					St3	Blk	A
B	Blk	St3	P1	P3	P5	P7					St3	Blk	B
C	Blk	St4	P1	P3	P5	P7					St4	Blk	C
D	Blk	St4									St4	Blk	D
E	St1	St5									St5	St1	E
F	St1	St5	P2	P4	P6						St5	St1	F
G	St2	St6	P2	P4	P6						St6	St2	G
H	St2	St6	P2	P4	P6						St6	St2	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 13: Pipettierschema für die Xylenolorange Methode in Mikrotiterplatten

Blk: Blindwerte

St1-St6: Standards (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 μM H₂O₂ bzw. CHP)

P1: Probe zum Zeitpunkt 0, P2: Probe nach 2,5 min., P3: Probe nach 5 min., P4: Probe nach 10 min., P5: Probe nach 15 min., P6: Probe nach 20 min., P7: Probe nach 30 min.

Es erfolgte eine Dreifachbestimmung jeder Probe, die Werte wurden gemittelt und um den Blindwert bereinigt. Durch Bestimmung der durch die Standards ausgelösten Absorptionen konnte eine Eichgerade erstellt werden, anhand derer den gemessenen Absorptionen der Proben eine Peroxidkonzentration zugeordnet werden konnte. Die so ermittelten Peroxidkonzentrationen wurden gegen die Zeit aufgetragen.

2.4.4 Dichlorfluorescein-Assay

Zur Bestimmung der durch Peroxide ausgelösten Bildung von Radikalen wurde eine für 96-Well-Platten modifizierte Form des Dichlorfluorescein-Assay von Wang et al. (1999) eingesetzt. Bei diesem Assay wird 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (H₂-DCF-DA), eine licht- und sauerstoffempfindliche Substanz, eingesetzt. H₂-DCF-DA wird in die Zellen aufgenommen und dort durch Esterase enzymatisch zu Dichlordihydrofluorescein (H₂-DCF) hydrolysiert. Durch eventuell vorhandene Radikale, Peroxynitrate, Oxidasen und Peroxidasen wird das H₂-DCF dann rasch zu Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert. DCF erzeugt eine starke Fluoreszenz, die fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von etwa 488 nm und einer Emissionswellenlänge von etwa 525 nm bestimmt werden kann. Die Messmethode ermöglicht eine Abschätzung des momentanen Radikalstatus, allerdings nicht den spezifischen Nachweis bestimmter reaktiver Sauerstoffspezies.

Materialien und Lösungen:

96-Well-Mikrotiterplatten, schwarz mit klarem Boden	Corning
2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (mind. 97 %)	Sigma-Aldrich

Hanks-Puffer:

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	185 mg/l
KCL	400 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg/l
NaCl	8000 mg/l
NaHCO ₃	350 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l
Glukose	1000 mg/l

Zunächst wurde eine 5mM DCF-DA-Stammlösung in Hanks-Puffer hergestellt. Das pulverförmige und lichtempfindliche DCF-DA musste dazu unter lichtgeschützten Bedingungen in DMSO gelöst werden. Ebenso wurden eine 10µM CHP- bzw. H₂O₂-Stammlösungen in Hankspuffer hergestellt. Die Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt.

Anschließend wurde die Mikrotiterplatte aus dem Kulturschrank entnommen und die Wells, mit und ohne Zellen, zweimal mit 150µl vorgewärmten Hankspuffer gespült. Die Spüllösung verblieb bis zur Weiterbehandlung in den Wells.

Es folgte die Herstellung einer 10µM DCF-Arbeitslösung, durch Verdünnung der Stammlösung mit Hankspuffer. Diese Arbeitslösung wurde lichtgeschützt, bei weitgehender Abdunkelung des Raumes, hergestellt. Folgend wurde die Spüllösung entfernt und die Zellen mit 150µl der DCF-Arbeitslösung (10µM) bestückt. Die Wells der Spalten 1 und 12, die keine Zellen enthielten, wurden mit 150µl Hankspuffer (Blindwerte) befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, während derer die Zellen das DCF-DA aufnehmen konnten. In der Zwischenzeit wurde die Peroxid-Verdünnungsreihe in Hankspuffer angesetzt und auf 37°C erwärmt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit Hankspuffer gespült und die Wells der Spalten 3-6 und 8-11 mit 150 µl der Peroxid-Konzentrationen versehen (Abb.15). Die Wells der Spalten 2 und 7 wurden als Kontrollen benutzt und erhielten somit 150µl Hankspuffer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk											Blk	A
B	Blk	Kontrolle	10 µM CHP bzw. 30 µM H ₂ O ₂	30 µM CHP bzw. 100 µM H ₂ O ₂	100 µM CHP bzw. 300 µM H ₂ O ₂	300 µM CHP bzw. 1000 µM H ₂ O ₂	Kontrolle	10 µM CHP bzw. 30 µM H ₂ O ₂	30 µM CHP bzw. 100 µM H ₂ O ₂	100 µM CHP bzw. 300 µM H ₂ O ₂	300 µM CHP bzw. 1000 µM H ₂ O ₂	Blk	B
C	Blk											Blk	C
D	Blk		Blk	D									
E	Blk		Blk	E									
F	Blk	Blk	F										
G	Blk	Blk	G										
H	Blk											Blk	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 14: Expositionsschema für die Bestimmung von Radikalen in Mikrotiterplatten

Gelb unterlegte Spalten: Zellen ausgesät in Wachstumsmedium mit 1µM Natriumselenit
Blk (Blindwerte): 150µl Hankspuffer

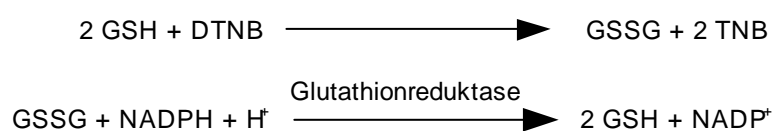
Direkt im Anschluss wurde das Fluoreszenzsignal alle 15 Minuten, über einen Zeitraum von 45 Minuten, mit Hilfe des Fluorimeters gemessen. Am Fluorimeter musste dabei der Gain-Wert eingestellt werden, der der Verstärkung der Fluoreszenz dient. Hierbei wurde für alle

Messungen ein Gain-Wert von 20 eingesetzt, so dass die Messungen miteinander vergleichbar waren.

Die Ergebnisse wurden als willkürliche Fluoreszenz-Einheiten angegeben, wobei für jede Peroxidkonzentration und die Kontrollen eine sechsfache Bestimmung erfolgt. Zusätzlich wurden die Blindwerte zehnfach bestimmt. Alle Ergebnisse einer Konzentration, bzw. Kontrolle, wurden gemittelt und um den Blindwert bereinigt. Dem Mittelwert der Kontrollen wurde 100 % zugeordnet. Anschließend wurden die Fluoreszenz-Einheiten der Testreihen in Prozentwerten der Kontrolle angegeben und gegen die Peroxidkonzentrationen aufgetragen.

2.4.5 Bestimmung des Glutathiongehalts

Zur Messung des Gesamt-Glutathiongehalts wurde ein enzymatischer Assay eingesetzt, der von Owens und Belcher entwickelt wurde (1965). Grundlage dieses Assays ist die Tatsache, dass Glutathion (GSH) kontinuierlich 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu gelblich gefärbten 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) reduziert. Zur Reduktion von DTNB werden zwei Moleküle GSH benötigt, diese werden dabei oxidiert und verbinden sich zu einem Molekül Glutathiondisulfid (GSSG). Die Konzentration von TNB kann photometrisch bei 405 nm gemessen werden. Des Weiteren wird das Glutathiondisulfid mittels der Glutathionreductase (GR) und NADPH wieder zu GSH reduziert. Somit wird mit diesem Assay sowohl das in der Probe enthaltene reduzierte GSH, als auch die oxidierte Form, vorliegend als GSSG, bestimmt.



Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Konzentration von GSH.

Materialien und Lösungen:

96-Well-Mirkotiterplatten	Falcon
Glutathionreduktase (GR), (100 Units; 502 Units/ml)	Sigma-Aldrich
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich
Sulfosalicylsäure (SSA)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich

5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
NADPH-Tetranatriumsalz	Sigma-Aldrich

Sulfosalicylsäure-Lösung:

10 % SSA-Lösung: 5mg/50 ml ultra pure H₂O

5 % SSA-Lösung: 2,5 mg/50 ml ultra pure H₂O

Assaypuffer:

50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4): Zu 19,6 ml 50 mM KH₂P₄ 80,4 ml 50 mM Na₂OHPO₄ hinzufügen. Anschließend 0,5 mM EDTA in 50 mM Phosphatpuffer lösen.

DTNB Stammlösung:

15 mg DTNB/10 ml DMSO

NADPH-Stammlösung (48 mM):

4 mg NADPH/100 µl ultra pure H₂O. Die NADPH-Stammlösung wurde nach der Herstellung in Aliquots zu 30 µl bei -20°C gelagert.

Glutathion-Standard-Stammlösung (10 mM):

15,336 mg GSH/ml ultra pure H₂O. Die GSH Standard Stammlösung wurde nach der Herstellung in Aliquots zu 100µl bei -20° C gelagert.

Am Versuchstag wurden aus den Stammlösungen die Arbeitslösungen hergestellt. Die folgenden Ansätze reichen für die Messung des Glutathiongehalts von 10 Proben und den benötigten Standards und Blindwerte.

Arbeitslösungen:

Glutathion Reduktase Lösung (6 Units/ml):

6,072 µl GR mit 500 µl Assaypuffer versetzen

NADPH-Arbeitslösung (0,16 mg/ml):

24µl der NADPH-Stammlösung mit 6 ml Assaypuffer vermengen

Reaktionslösung:

456 µl Glutathion Reduktase Lösung und 456 µl DTNB Stammlösung mit 16 ml Assaypuffer vermengen. Die Reaktionslösung wurde lichtgeschützt gelagert.

GSH-Standards:

Aus der GSH-Standard-Stammlösung wurden, durch Verdünnung mit 5 % SSA-Lösung, die verwendeten Standards, mit einem GSH-Gehalt zwischen 3,125 und 50 µM, hergestellt.

Es wurde der GSH-Gehalt in Proben bestimmt, die entweder mit Cystin oder BSO vorinkubiert worden waren. Zusätzlich wurde auch der GSH-Gehalt der Zellen der zeitgleich angelegten Kontrollkulturen bestimmt. Vor der Messung des GSH-Gehalts mussten die Proben aufbereitet werden. Die geernteten und bei -80°C gelagerten Zellen wurden am Versuchstag in 250 µl eiskalter HCl (10mM) resuspendiert. Anschließend folgte das Aufschließen der Proben mittels eines sogenannten Freeze-and-Thaw-Zyklus. Bei diesem wurden die in HCl gelösten Zellen mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde zweimal durchlaufen. Als nächstes wurden die Zellen, bzw. die Zellbruchstücke, durch Vortexen weiter in Lösung gebracht und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Mal Vortexen, wurden 200 µl des Zelllysates in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Die verbleibenden 50 µl wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford aufbewahrt.

Zu den 200 µl Zelllysate wurden nun 200 µl der 10 %-SSA-Lösung hinzugefügt und diese durch Schütteln auf dem Vortexer gut vermischt. Im Weiteren wurden die Proben bei 10000xg zentrifugiert und der dabei entstehende Überstand in weiteres, vorgekühltes Eppendorfgefäß gegeben und auf Eis gehalten. Aus dieser Probe wurden noch 1:4-, 1:8-, 1:16-Verdünnungen in 5 %-SSA-Lösung hergestellt. Zur Messung wurden die Proben und zugehörigen Verdünnungen in eine 96-Well-Mikrotiterplatte eingesetzt (Abb. 15).

Für die Proben der mit Cystin vorbehandelten Zellen sowie der mit BSO vorinkubierten Zellen und der jeweiligen Kontrollkulturen, wurden je eine Mikrotiterplatten benutzt. Es wurde jeweils ein Volumen von 10 µl pro Well eingesetzt und jede Probe doppelt bestimmt. In den Wells der Spalten 1 und 2 wurden die Blindwerte (5 %-SSA-Lösung) und GSH-Standards gefüllt. Die Spalten 3-5 wurden mit den Proben der mit Cystin oder BSO vorinkubierten Zellen und der der zusätzlichen Verdünnungen bestückt. Die Kontrollen sowie die zugehörige Verdünnungen wurden in die Spalten 6-8 gefüllt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	St3	P1 (1:2)	P2 (1:2)	P3 (1:2)	K1 (1:2)	K2 (1:2)	K3 (1:2)					A
B	Blk	St3	P1 (1:2)	P2 (1:2)	P3 (1:2)	K1 (1:2)	K2 (1:2)	K3 (1:2)					B
C	Blk	St4	P1 (1:4)	P2 (1:4)	P3 (1:4)	K1 (1:4)	K2 (1:4)	K3 (1:4)					C
D	Blk	St4	P1 (1:4)	P2 (1:4)	P3 (1:4)	K1 (1:4)	K2 (1:4)	K3 (1:4)					D
E	St1	St5	P1 (1:8)	P2 (1:8)	P3 (1:8)	K1 (1:8)	K2 (1:8)	K3 (1:8)					E
F	St1	St5	P1 (1:8)	P2 (1:8)	P3 (1:8)	K1 (1:8)	K2 (1:8)	K3 (1:8)					F
G	St2		P1 (1:16)	P2 (1:16)	P3 (1:16)	K1 (1:16)	K2 (1:16)	K3 (1:16)					G
H	St2		P1 (1:16)	P2 (1:16)	P3 (1:16)	K1 (1:16)	K2 (1:16)	K3 (1:16)					H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 15: Pipettierschema für die Bestimmung des Glutathiongehalts in Mikrotiterplatten

Blk (Blindwert): 5 % SSA-Lösung

St1-St5: Glutathionstandards (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 μM GSH)

P1-3: Proben der vorinkubierten Zellen in ihren Verdünnungen

K1-3: Proben der Kontrollkulturen in ihren Verdünnungen

Im Anschluss wurde in jedes Well 150 μl der Reaktionslösung gegeben und diese durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Die Mikrotiterplatten wurden nun bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurde in jedes Well zusätzlich 50 μl der NADPH-Arbeitslösung gegeben und erneut gut durchmischt. Direkt darauf folgte die Messung der Absorption bei 405 nm über 5 Minuten, mittels Mikrotiterplattenphotometer und dem Kinetikprogramm KC Junior (Bio Tek Instruments Inc.). Hierbei wurde die Änderung der Absorption über die Zeit gemessen.

Die Absorptionsänderung der Proben und Standards wurden dann um die Änderung der Absorption der Blindwerte bereinigt. Anschließend wurde den bekannten Glutathionkonzentrationen der Standards die dazugehörige Absorptionsänderung zugewiesen und dies in einem Koordinatensystem dargestellt. Es konnte so eine Standarddeichkurve ermittelt werden, an Hand derer es möglich war, den gemessenen Absorptionsänderungen der Proben eine Glutathionkonzentration (nmol/ml) zuzuordnen. Um die Proben besser miteinander vergleichen zu können, wurde der Glutathiongehalt auf den Proteingehalt der Probe bezogen (nmol GSH/mg Zellprotein).

Die Versuche zur Bestimmung des Glutathiongehalts wurden dreifach durchgeführt und diese Ergebnisse gemittelt.

2.4.6 Bestimmung der Enzymaktivität

Es wurde die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) in den mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen sowie den dazu gehörigen Kontrollkulturen bestimmt. Des Weiteren wurde bei den mit 3-Amino-1,2,4-triazol vorinkubierten Zellen die Katalase-Aktivität untersucht. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden unterschiedliche Verfahren eingesetzt, die Proben aber auf identische Weise aufbereitet.

2.4.6.1 Aufbereitung der Proben

Materialien und Lösungen:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth GmbH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Lysispuffer: Zur Herstellung des Lysispuffers wurden zu nächst eine 50 mM TRIS-HCl-Lösung hergestellt. Danach wurden 1 % Triton-X-100 und 1 mM EDTA hinzugefügt.

Die eingefrorenen Proben wurden am Versuchstag für die Messung vorbereitet. Dazu wurde zu den trocken eingefrorenen Zellpellets 300µl kalter Lysispuffer hinzugegeben und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

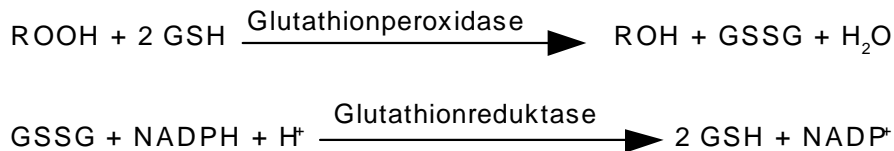
Es folgte ein dreimaliges Durchführen des Freeze-and-Thaw-Zyklus (Abschnitt 2.4.). Die Zellen wurden dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch mehrmals gemischt. Anschließend wurde eine Teilmenge von 50 µl abgenommen und zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Die verbleibende Menge des Zelllysats wurde für 15 Minuten und 4°C bei 10000xg zentrifugiert und der Überstand in ein vorgekühltes Eppendorfgesäß überführt.

2.4.6.2 Glutathionperoxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase wurde ein zweistufiges Testverfahren benutzt. Bei der von Paglia und Valentine (1967) entwickelten Methode wird in einem ersten Schritt ein organisches Hydroperoxid (ROOH) in Anwesenheit von Glutathion (GSH) mittels der Glutathionperoxidase (GPx) reduziert. Dabei entsteht neben der reduzierten Peroxidform

auch Glutathiondisulfid (GSSG) und Wasser. In einem zweiten Schritt wird das GSSG mit Hilfe der Glutathionreduktase und Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu 2 Molekülen GSH regeneriert. Das Verschwinden von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ im Probenansatz kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden.



Die hier beschriebene Messung orientiert sich an dem Versuchsprotokoll des von Sigma-Aldrich vertrieben Assays zur Bestimmung der zellulären Glutathionperoxidase-Aktivität.

Materialien und Lösungen:

Quarzküvetten	Hellma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Tertiäres Buthylhydroperoxid(t-BuOOH), 70 %	Merck
L-Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich
NADPH-Tetranatriumsalz	Sigma-Aldrich
Glutathionreduktase (GR), (100 Units; 453,6 Units/ml)	Sigma-Aldrich

Assaypuffer: Zur Herstellung von 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) 19,6 ml 50 mM KH_2P_4 mit 80,4 ml 50 mM Na_2OHPO_4 versetzten. In dem Phosphatpuffer 0,5 mM EDTA lösen.

30 mM Tertiäres Buthylhydroperoxid-Lösung: 30 μl 70 %iges t-BuOOH mit 7,740 ml Assaypuffer vermengen.

84 mM GSH-Lösung: 25,815 mg GSH in 1 ml Assaypuffer lösen.

NADPH-Reagenz: Zur Herstellung des NADPH-Reagenz wurden 709,76 μl der 84mM GSH-Lösung, 31,286 μl der GR und 677,36 μl Assaypuffer vermengt. In dieser Lösung wurden dann 5,67 mg NADPH gelöst.

Der Assay wurde direkt in 1 ml Quarzküvetten angesetzt. Zur Bestimmung der Aktivität der GPx in den Proben wurden 50 μl des Zelllysates mit Assaypuffer und NADPH-Reagenz

vermengt und mit einem Plastikspatel vermischt. Um die Reaktion zu starten, wurde dann das organische Peroxid t-BuOOH hinzugefügt und nach einer erneuten Vermischung die Abnahme der Absorption bei 340 nm über 3 Minuten gemessen (Cary 100 Scan, Varian). Zusätzlich zur Bestimmung der Absorptionsänderung in der Probe wurde auch die Absorptionsverminderung eines einfachen Blindwerts (ohne Zelllysat) sowie eines Probenblindwerts (ohne t-BuOOH) bestimmt. Die eingesetzten Volumina sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Messansatz für die Glutathionperoxidase-Aktivitätsmessung

	Blindwert (µl)	Proben-Blindwert (µl)	Probe (µl)
Probe	-	50	50
Assaypuffer	940	900	890
NADPH-Reagenz	50	50	50
t-BuOOH (30mM)	10	-	10

Es erfolgte ein Doppelbestimmung von jeder Probe und den dazugehörigen Blindwerten und der Probenblindwerte.

Zur Auswertung wurde die Absorptionsänderung pro Minute aus dem linearen Teil der Kurve ermittelt. Die Absorptionsänderungen der jeweiligen Messansätze wurden dann zu Mittelwerten zusammengefasst.

Per Definition oxidiert eine Unit GPx pro Minute 1 µmol NADPH. Mit der nachfolgenden Formel konnte aus der Absorptionsminderung des NADPH die Aktivität der GPx bestimmt werden:

$$\text{Units/ml Probe: } \frac{\Delta A/\text{min (Probe}_{\text{netto}})}{\text{PV} \times 6,22} \quad [\text{nmol/ml Probe}]$$

$\Delta A/\text{min}$ = Absorptionsänderung pro Minute

$\Delta A/\text{min (Probe}_{\text{netto}}) = \Delta A/\text{min (Probe)} - \Delta A/\text{min (Blindwert)} - \Delta A/\text{min (Probenblindwert)}$

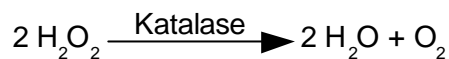
PV = eingesetztes Probenvolumen [ml]

6,22 = Millimolarer Extinktionskoeffizient NADPH

Um die Aktivitäten der GPx in den einzelnen Proben besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese auf den jeweiligen Proteingehalt der Proben bezogen [Units/mg Protein].

2.4.6.3 Katalase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der Katalase macht man sich zunutze, dass die Katalase H_2O_2 enzymatisch zu Wasser und Sauerstoff abbaut. Unterhalb von 100mM H_2O_2 verläuft die Katalase-Reaktion mit einer Kinetik erster Ordnung. Das Verschwinden von H_2O_2 kann photometrisch bei 240 nm gemessen werden.



Die Durchführung der folgenden Versuche orientiert sich an der Beschreibung des Katalase Assay-Kit der Firma Sigma-Aldrich.

Materialien und Lösungen:

Quarzküvetten	Hellma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Sigma-Aldrich

Assaypuffer: Zur Herstellung von 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) 19,6 ml 50 mM KH_2P_4 mit 80,4 ml 50 mM Na_2OHPO_4 versetzen. In dem Phosphatpuffer 0,5 mM EDTA lösen.

20mM H_2O_2 - Lösung:

Herstellung einer 88,18 mM H_2O_2 - Lösung: 100 μl H_2O_2 mit 9,9 ml Assaypuffer vermengen. Anschließend 2,268 ml dieser Lösung mit 7,732 ml Assaypuffer auf 20 mM verdünnen.

Zur Aktivitätsbestimmung der Katalase wurden die Abnahme der Absorption von H_2O_2 in den Proben und jeweils zugehörigen Probenblindwert sowie einem Probenblindwert bestimmt. Die Versuche wurden direkt in 1ml Quarzküvetten angesetzt und dabei die in Tabelle 4 dargestellten Volumenverteilungen eingehalten. Als erstes wurde das Zelllysate mit dem Assaypuffer vermischt und mittels eines Plastikspatels gut vermischt. Zum Starten der Reaktion wurde H_2O_2 hinzugegeben und sofort im Anschluss die Abnahme der Absorption gemessen. Dazu wurde die Absorption mit Hilfe des Cary 100 Scan (Varian) bei 240 nm über 30 Sekunden bestimmt. Es erfolgte eine doppelte Bestimmung jeder Probe und des dazugehörigen Blindwertes und Proben-Blindwertes.

Tabelle 4: Messansatz für die Katalase-Aktivitätsmessung

	Blindwert (µl)	Proben-Blindwert (µl)	Probe (µl)
Probe	-	20	20
Assaypuffer	500	980	480
20 mM H ₂ O ₂	500	-	500

Die Katalase hat eine sehr hohe Wechselzahl und eine hohe katalytische Effizienz. Es ist nicht möglich das Enzym mit H₂O₂ zu sättigen, da ab einer H₂O₂-Konzentration von 100 mmol/l die Katalase schnell inaktiviert wird (Ogura & Yamazaki, 1983), obwohl die maximale Sättigung noch nicht vorliegt. Somit ist es üblich die Aktivität der Katalase mit Konzentration von unter 100 mmol/l zu bestimmen. Daraus ergibt sich das Problem, dass es keine einfache Definition von der Katalase-Aktivität in Units gibt.

Um in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Katalase der unterschiedlichen Messungen zu vergleichen wurde sie durch zwei Kenngrößen dargestellt. Es wurde einmal die Katalase-Units bezogen auf den Proteingehalt der Proben (Units/mg Protein) bestimmt. Dabei ist eine Unit wie folgt definiert: Eine Unit Katalase baut bei einer Startkonzentration von 10 mM H₂O₂, 25°C und pH 7,4 innerhalb einer Minute 1 µmol H₂O₂ ab. Zusätzlich wurde auch die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung, bezogen auf den Proteingehalt der Proben (k/mg Protein), bestimmt.

Zur Bestimmung der Units/mg Protein wurde die Absorptionsänderung pro Minute aus dem linearen Teil der Kurve ermittelt und die aus den Doppelbestimmungen resultierenden Ergebnisse zu Mittelwerten zusammengefasst. Anschließend wurde dann nach folgender Formel vorgegangen:

$$\text{Units/ml Probe: } \frac{\Delta A/\text{min (Probe}_{\text{netto}})}{\text{PV} \times 0,0436} \quad [\text{nmol/ml Probe}]$$

$\Delta A/\text{min}$ = Absorptionsänderung pro Minute

$\Delta A/\text{min (Probe}_{\text{netto}}) = \Delta A/\text{min (Probe)} - \Delta A/\text{min (Blindwert)} - \Delta A/\text{min (Probenblindwert)}$

PV = eingesetztes Probevolumen [ml]

0,0436 = Millimolarer Extinktionskoeffizient H₂O₂

Zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse untereinander, wurde die Aktivität dann auf den Proteingehalt der Proben bezogen [Units/mg Protein].

Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante k erfolgte anhand der Formel:

$$k = V_0/C_0 [\text{min}^{-1}]$$

Es wurde zunächst die Anfangsgeschwindigkeit (V_0) bestimmt:

$$V_0: \frac{\Delta A/\text{min} (\text{Probe}_{\text{netto}})}{0,0436} \quad [\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{ml}]$$

Anschließend wurde die Anfangskonzentration (C_0) bestimmt:

$$C_0: \frac{A_0 (\text{Probe}) - A_0 (\text{Probenblindwert})}{0,0436} \quad [\mu\text{mol}/\text{ml}]$$

A_0 (Probe): Absorption in der Probe zu Beginn der Messung ($t = 0$)

A_0 (Probenblindwert): Absorption des Probenblindwertes zu Beginn der Messung ($t = 0$)

Im Folgendem wurde die Geschwindigkeitskonstante k bestimmt.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Geschwindigkeitskonstante auf den Zellproteingehalt bezogen ($k/\text{mg Protein} [\text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}]$).

2.4.7 Bestimmung des Selengehalts in Seren mittels der Atomabsorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der Selenkonzentrationen in fötalem Rinderserum (FBS) und in Pferdeserum (Horse Serum, HS) wurde mittels der Graphitrohrofen Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS: Graphite Furnance Atomic Absorption Spectrometry) durchgeführt.

Grundlage bei dieser Methode ist die Tatsache, dass freie Atome Licht sowohl emittieren als auch absorbieren können. Das Licht, das durch ein angeregtes Atom emittiert wird, kann von einem nicht-angeregtem Atom desselben Elements absorbiert werden kann.

Für jedes Element gibt es Licht einer spezifischen Wellenlänge. Bei der Atomabsorptionsspektrometrie nutzt man dies, in dem man einen Lichtstrahl definierter Wellenlänge durch eine Atomwolke mit nicht-angeregten Atomen eines Elementes leitet. Die Atome des zu

untersuchenden Elementes absorbieren einen Teil des Lichtes und die Absorption kann durch die Bestimmung der Lichtintensität vor und hinter der Atomwolke, errechnet werden.

Dabei gilt das Lambert-Beer'sche-Gesetz. Die Absorption steigt proportional zu der Konzentration der Atome des untersuchten Elementes in der Atomwolke.

Bei der GF-AAS wird die zu untersuchende Probe mittels eines elektrisch beheizten Graphitrohr atomisiert. Zur Bestimmung von Selen wird Licht einer Wellenlänge von 196,0 nm eingesetzt. Die experimentelle Selenbestimmung orientierte sich an den Arbeitsanweisungen der Firma PerkinElmer (Einfache Bestimmung von Selen in Serum mit der Graphitrohrfurnen-AAS, Marcus Hasel, 2007).

Materialien und Lösungen:

Atomabsorptionsspektrometer AAnalyst 800	PerkinElmer
Selen-LED (N3050672)	PerkinElmer
Graphitrohr (Endkappenrohr B3000653)	PerkinElmer
Triton X -100	Sigma-Aldrich
ClinChek (Kontrollserum) (Mittelwert 56 µg Selen/l)	Recipe
CertiPUR (Selen-Stammlösung) (1000 µg Selen/l)	Merck

Pferdeserum (HS):

- Lot. 08448415 Sigma-Aldrich

Fötiales Rinderserum (FBS):

- Lot. 0410G Biochrom
- Lot. 0764H Biochrom
- Lot C367 c.c.pro

Matrixmodifizier (Pd(NO₃)₂/Mg(NO₃)₂): 1 ml der Pd(NO₃)₂-Lösung (10 g/l) und 0,1 ml Mg(NO₃)₂-Lösung (10 g/l) werden mit ultra pure H₂O auf 10 ml aufgefüllt.

Verdünnungslösung: 500µl Triton X -100 werden mit ultra pure H₂O auf 100ml aufgefüllt.

Selenstandardlösung:

- Selenstandardlösung für die Bestimmung des Selengehalts in Pferdeserum:
Selen-Stammlösung (1000 µg/l) mit Verdünnungslösung auf 50 µg/l verdünnen.
- Selenstandardlösung für die Bestimmung des Selengehalts in fötalem Rinderserum:
Selen-Stammlösung (1000 µg/l) mit Verdünnungslösung auf 5 µg/l verdünnen.

Am Versuchstag wurden alle Lösungen frisch angesetzt. Jeweils 2 ml der Selenstandardlösung, der Verdünnungslösung, des Modifier und des Kontrollserums bzw. der verdünnten Probe wurden nun einzeln in Plastikküvetten gefüllt und diese in die automatische Pipettiervorrichtung des Spektrometers eingesetzt. Der Modifier wird benötigt, um die Analyten in eine thermisch stabilere chemische Verbindung zu überführen.

Die Messung wurde mit Licht einer Wellenlänge von 196 nm, das von einer spezifischen Selen-LED ausging, und einer Spaltbreite von 2 nm durchgeführt.

Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

Die Messung verlief in folgenden Schritten:

1. Einsetzen des Probe, des Diluents, des Modifiers und ggf. der Standardlösung in das Graphitrohr
2. Trocknung der Probe für 50 Sekunden bei 120°C
3. Luftveraschung der Probe für 30 Sekunden bei 1100°C. Dabei werden die organischen Bestandteile der Proben verascht und entfernt.
4. Pyrolyse für 3 Sekunden bei 2200°C. Entfernung von Matrixbestandteilen, ohne dass das Selen (mittels des Modifiers stabilisiert) verdampft.
5. Atomisierung der Probe, 5 Sekunden bei 2600°C. In dieser Phase findet auch die Messung des Analytensignals statt.

Zur genaueren Bestimmung wurde eine Standardaddition durchgeführt. Durch die Standardaddition, bei der die Probe mit einer definierten Menge der Standardlösung versetzt wird, beeinflussen eventuelle Störungen die Messungen von Standards und Proben gleichermaßen und führen somit nicht zu falschen Ergebnissen.

Die Standardaddition erfolgt in vier Schritten. In einem ersten Schritt wird die Absorption der Probe, vermischt mit Verdünnungslösung und Modifier, gemessen. Anschließend wird der Probe zusätzlich zu Verdünnungslösung und Modifier, ein definiertes Volumen Standardlösung mit bekannter Selenkonzentration hinzugefügt und erneut die Absorption gemessen. Im Folgenden wird das Volumen der Selenstandardlösung schrittweise erhöht und jeweils die Absorption bestimmt.

Durch die Ergänzung von Standardlösung, mit bekannter Selenkonzentration, steigt die Selenkonzentration und dem entsprechend die gemessene Absorption bei jedem Messschritt an. Die Präzision der Standardaddition ist abhängig vom Konzentrationsbereich der hinzugefügten Standardlösung im Vergleich zur Konzentration in der Probe. Somit ist es sinnvoll, eine Selenkonzentration in der Standardlösung zu wählen, die der zu erwartenden Selenkonzentration in der Probe entspricht.

Für die Bestimmung des Selengehalts im Pferdeserum wurde eine Selenstandardlösung mit 50 µg/l gewählt. Das Pferdeserum wurde für die Messung 1:10 mit Verdünnungslösung verdünnt. Zur Selenbestimmung in fötalem Rinderserum wurde eine Selenstandardlösung mit 5 µg/l gewählt, das Serum 1:5 mit Verdünnungslösung verdünnt.

Die einzelnen Additionsschritte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Additionsschritte bei der Bestimmung des Selengehalts in tierischen Seren

Standardaddition	Pferdeserum (1:10 verdünnt)	Fötales Rinderserum (1:5 verdünnt)
1. Addition	10 µg/l	1 µg/l
2. Addition	20 µg/l	2 µg/l
3. Addition	40 µg/l	4 µg/l

Der Anstieg der Absorption wurde in einem Koordinatensystem aufgetragen. Beispielhaft ist ein solches Koordinatensystem in Abbildung 16 dargestellt. Auf der Abszissenachse sind die Selenkonzentrationen aufgetragen, auf der Ordinatenachse, die gemessenen Absorptionen. Die einzelnen Messpunkte werden durch eine Gerade miteinander verbunden, welche die Abszisse im negativen Bereich schneidet. Der Betrag des negativen Abszissen-Abschnittes entspricht der Selenkonzentration in der Probe.

Zur Kalibrierung der Messmethode wurde die Selenkonzentration in einem Kontrollserum bestimmt. Es war mit den oben genannten Einstellungen möglich, Selenkonzentrationen, die innerhalb des angegebenen Referenzbereichs lagen, zu bestimmen.

Nachdem somit die Genauigkeit der Methode nachgewiesen wurde, erfolgt eine dreifache Bestimmung des Selengehalts der einzelnen Proben. Die Ergebnisse wurden gemittelt, die Verdünnungsfaktoren miteinbezogen und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

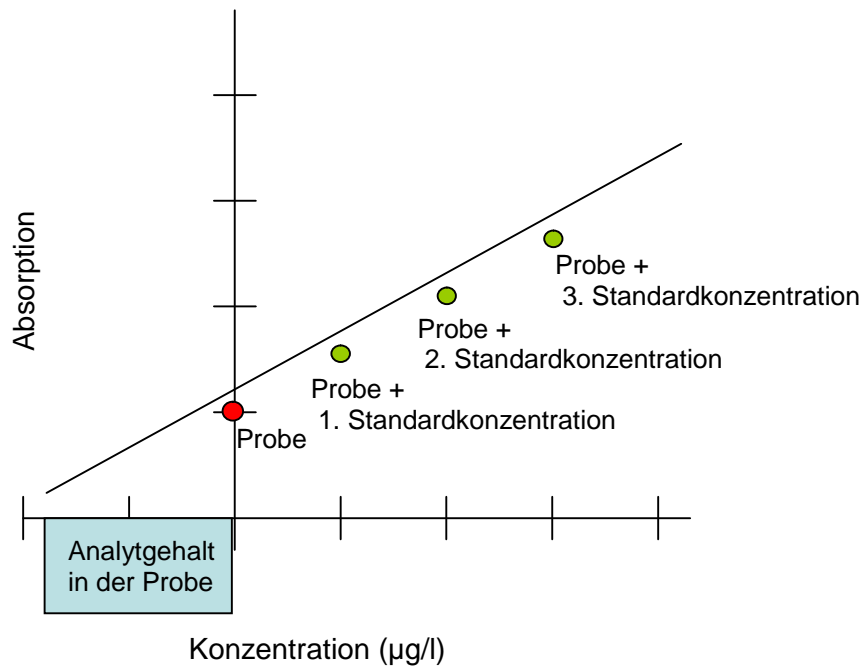


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Standardaddition

2.5 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse und die statistische Analyse erfolgten mittels des Computerprogramms GraphPad Prism 4. Die Anzahl der durchgeführten Versuche wird bei den jeweiligen Abbildung mit angegeben. Bei einer Versuchsanzahl ≥ 3 werden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwert (SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels des gepaarten, einseitigen t-Tests, wenn die Anzahl der Versuche ≥ 3 war. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz attestiert.

Zur Darstellung der zytotoxischen Wirkung von CHP, H_2O_2 sowie von Natriumselenit wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Bei diesen ist auf der Ordinate die zytotoxische Wirkung, als prozentuale Abnahme des Proteingehalts (Proteinbestimmung) bzw. die Abnahme der Vitalität (MTT-Test) bezogen auf die Kontrollen, dargestellt. Die zugehörigen Peroxid- bzw. Natriumselenit-Konzentrationen sind auf der Abszisse abgebildet.

Anhand des Kurvenverlaufs konnten die halbmaximal zytotoxischen Konzentrationen (EC_{50} -Werte), d. h. die Konzentrationen, die zu einem Abfall des Proteingehalts bzw. der Vitalität um 50 % führten, ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.1 3-Amino-1,2,4-triazol

3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) hemmt die Katalase durch irreversible Bindung an das aktive Zentrum (Halliwell & Gutteridge, 2007). Bei den im Folgenden dargestellten Versuchen wurden C6-Zellen über einen Zeitraum von 2 Stunden mit 10 mM 3AT in Wachstumsmedium vorinkubiert. Es zeigte sich dabei, dass 3AT über diesen kurzen Zeitraum hinweg keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der C6-Kulturen hatte. Der Proteingehalt der Kontrollkulturen, d. h. der nicht mit 3AT behandelten Kulturen, lag bei $16,2 \pm 3,2 \mu\text{g/Well}$ (96-Well-Mirkotiterplatten-Kulturen). Bei den mit 3AT vorinkubierten Kulturen lag der Proteingehalt bei $15,9 \pm 3,7 \mu\text{g/Well}$ (96-Well-Mirkotiterplatten-Kulturen).

3.1.1 Einfluss auf die Katalase-Aktivität

Das Ausmaß der durch 3AT ausgelösten Katalase-Hemmung wurde in drei unabhängigen Versuchen untersucht. Dazu wurde nach der Vorinkubationsphase die Katalase-Aktivität in den C6-Zellen bestimmt. Dargestellt wurde die Katalase-Aktivität durch die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung k (Abb. 18 A), bzw. als Katalase-Units bezogen auf den Proteingehalt (Abb. 18 B). Die Vorinkubation mit 10 mM 3AT führte in den C6-Zellen zu einer kompletten Hemmung der Katalase. In den Kontrollkulturen lag die Katalase-Aktivität bei $1,5 \pm 0,2 \text{ k/mg Zellprotein } [\text{min}^{-1}]$ bzw. $14,4 \pm 2,5 \text{ Units/mg Zellprotein}$.

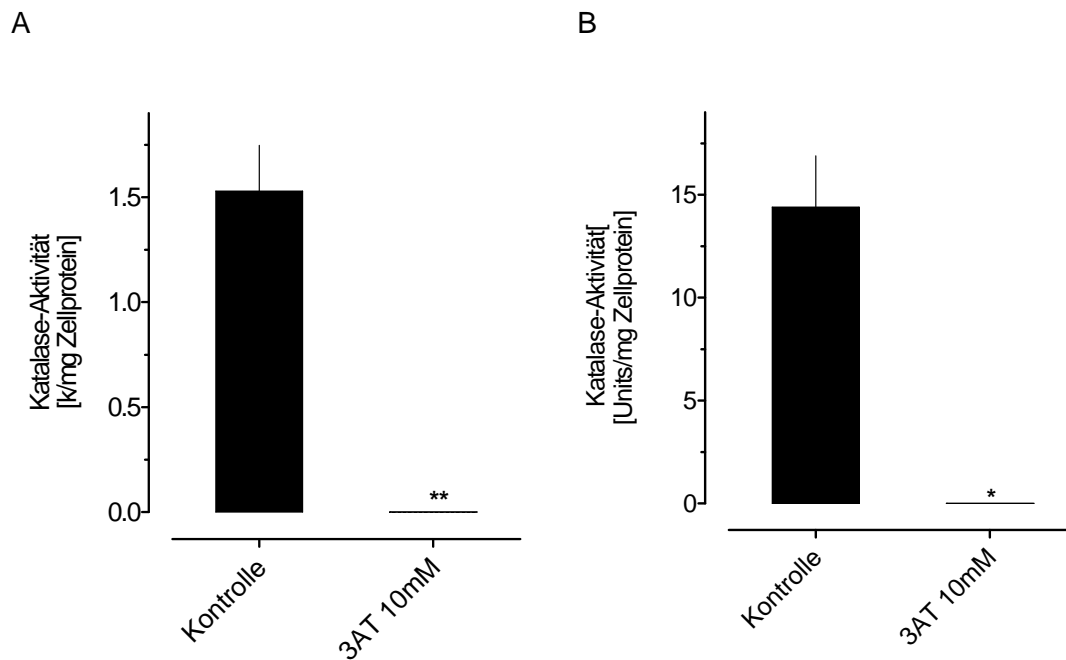


Abbildung 17: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die Katalase-Aktivität in C6-Zellen

In A) wird die Katalase-Aktivität pro mg Zellprotein durch die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung k [min^{-1}] angegeben, in B) in Units.

Eine Unit Katalase baut bei einer Startkonzentration von 10 mM H_2O_2 , 25°C und einem pH-Wert von 7,4 ein $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro Minute ab. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

** $p \leq 0,01$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den Mittelwerten der Katalase-Aktivität von Kontrollkulturen und mit 3AT vorinkubierten Kulturen.

* $p \leq 0,05$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den Mittelwerten der Katalase-Aktivität von Kontrollkulturen und mit 3AT vorinkubierten Kulturen.

3.1.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Zytotoxizität von CHP

Um den Einfluss einer Vorinkubation mit 3AT auf die zytotoxische Wirkung von CHP zu untersuchen, wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die daraus resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 18 A dargestellt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der mit 3AT vorinkubierten Kulturen zeigt, im Vergleich zu der Kurve der unbehandelten Kulturen, eine geringfügige Verschiebung in Richtung niedriger CHP-Konzentration. Dies bedeutet, dass die mit 3AT vorinkubierten C6-Zellen bereits bei niedrigeren CHP-Konzentrationen geschädigt wurden als die Zellen der

Kontrollkulturen. Diese erhöhte Empfindlichkeit der mit 3AT vorinkubierten Kulturen spiegelt sich auch in den niedrigeren EC_{50} -Werten (Abb. 19 B).

Der EC_{50} -Wert für die zytotoxische Wirkung von CHP lag in den mit 3AT vorinkubierten Kulturen bei $27,7 \pm 2,1 \mu\text{M}$ und bei $30,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$ in den Kontrollkulturen.

Bei der statistischen Analyse der gemessenen Unterschiede mittels eines gepaarten t-Test zeigte sich eine statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

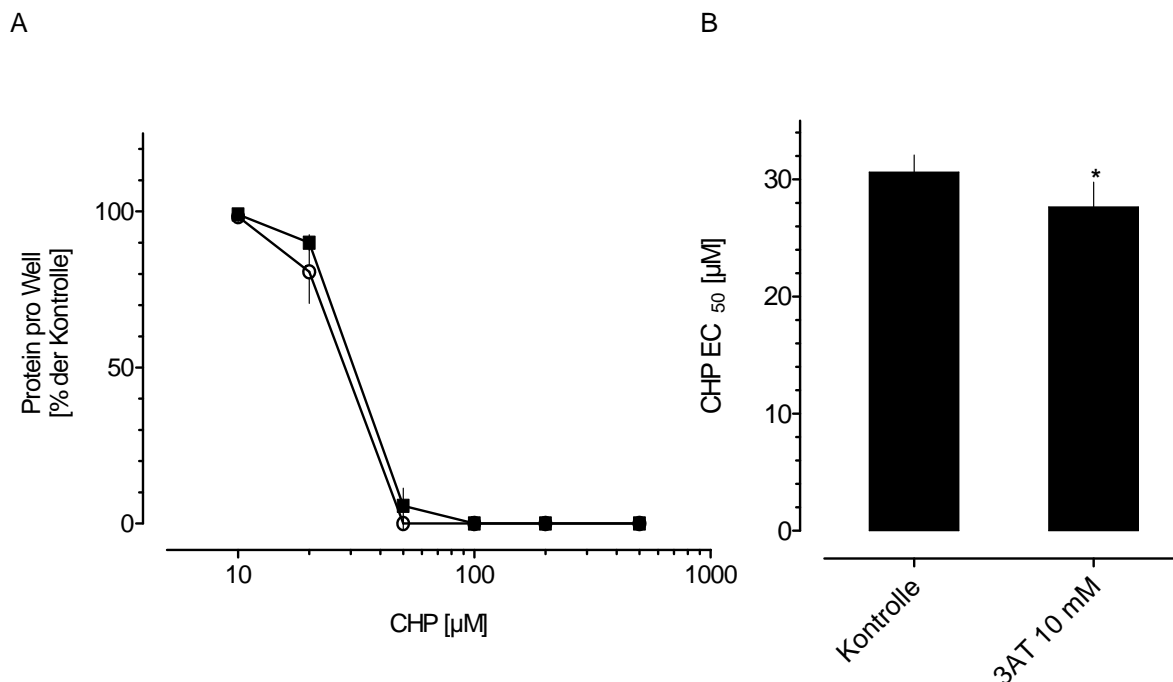


Abbildung 18: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von CHP in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 10 mM 3AT (○). Auf der Abzisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von CHP in unbehandelten und mit 10 mM 3AT behandelten C6-Zellkulturen. Die EC_{50} -Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

* $p \leq 0,05$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den EC_{50} -Werten der Kontrollkulturen und der mit 3AT vorinkubierten Kulturen.

Zytotoxizität von H_2O_2

Im Weiteren wurde auch der Einfluss von 3AT auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 in C6-Zellkulturen untersucht. In der Abbildung 19 A sind die aus drei unabhängigen Versuchen resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Zytotoxizität von H_2O_2 dargestellt. Die

Kurve für die mit 3AT vorinkubierten Kulturen weist im Vergleich zu der Kurve der Kontrollkulturen eine deutliche Linksverschiebung, in Richtung niedriger H_2O_2 -Konzentrationen, auf. Durch die Vorinkubation mit 3AT kommt es somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber H_2O_2 . Diese, durch 3AT ausgelöste, vermehrte Empfindlichkeit ist stärker ausgeprägt, als dies in den Versuchen mit CHP der Fall war. Diese Beobachtung wird durch den Vergleich der gemittelten EC_{50} -Werte von unbehandelten Kulturen ($140 \pm 31 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) und den vorinkubierten Kulturen ($56 \pm 8,8 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) unterstrichen (Abb. 20 B). Der EC_{50} -Wert in den vorinkubierten Kulturen war signifikant niedriger als in den unbehandelten Kulturen ($p \leq 0,05$).

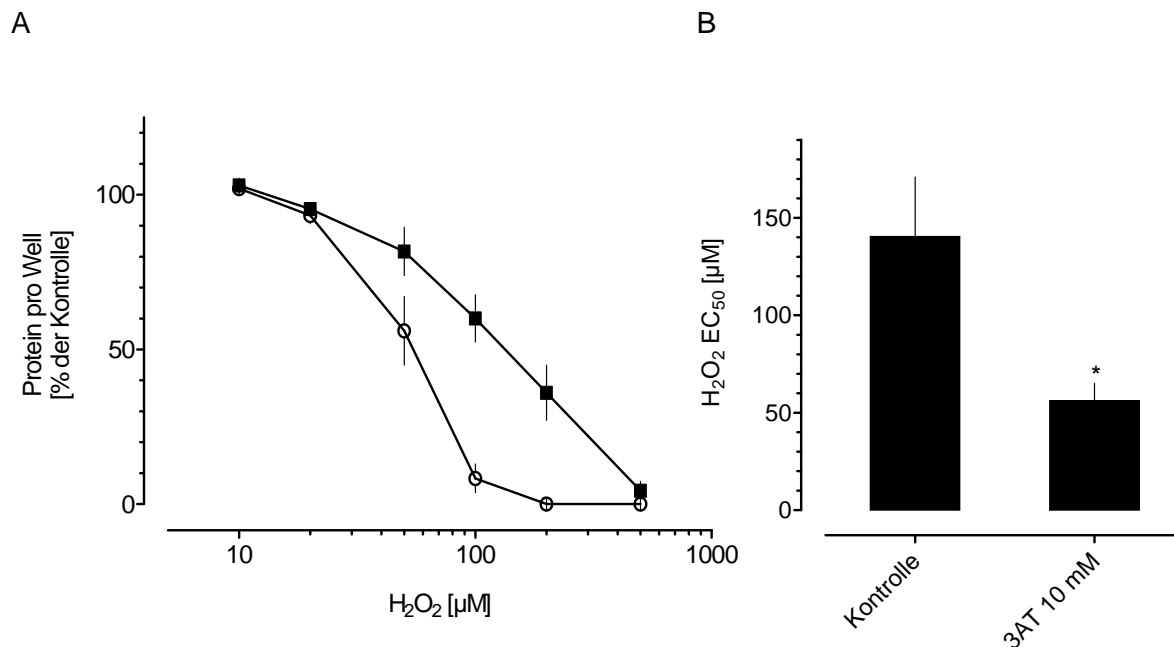


Abbildung 19: Einfluss von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 in C6-Zellkulturen

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 10 mM 3AT (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von H_2O_2 in unbehandelten und mit 10 mM 3AT behandelten C6-Zellkulturen. Die EC_{50} -Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

* $p \leq 0,05$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den EC_{50} -Werten der Kontrollkulturen und der mit 3AT vorinkubierten Kulturen.

3.2 Buthionin-Sulfoximin

Buthionin-Sulfoximin (BSO) vermindert die Glutathionsynthese durch Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthase. (Michiels & Remacle, 1988, Liddell et al., 2004). Für die vorliegenden Versuche wurden C6-Zellen für 24 Stunden mit 0,5 mM BSO in Wachstumsmedium behandelt. Durch die Vorinkubation mit BSO wurde das Wachstumsverhalten von C6-Zellen nicht beeinflusst. Der Proteingehalt der Kontrollkulturen (96-Well-Mikrotiterplatten) lag bei $17,3 \pm 1,6 \mu\text{g/Well}$ und bei den vorinkubierten Kulturen (96-Well-Mikrotiterplatten) bei $16,9 \pm 1,3 \mu\text{g/Well}$.

3.2.1 Einfluss auf den Glutathiongehalt

Es wurde eine Versuchsreihe zum Einfluss der Vorinkubation mit BSO auf den intrazellulären Glutathiongehalt durchgeführt (Abb. 21). Der bei drei Versuchen ermittelte mittlere Glutathiongehalt in den Kontrollkulturen lag bei $19,2 \pm 1,7 \text{ nmol GSH/mg Zellprotein}$. Durch eine 24-stündige Vorinkubation mit BSO wurde der GSH-Gehalt auf $2,2 \pm 0,6 \text{ nmol GSH/mg Zellprotein}$ signifikant reduziert ($p \leq 0,01$).

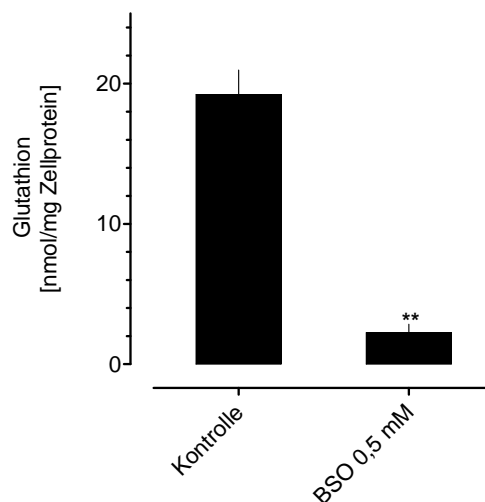


Abbildung 20: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf den Glutathiongehalt in C6-Zellen
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Glutathiongehalts [nmol GSH/mg Zellprotein] aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

** $p \leq 0,01$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den Mittelwerten des Glutathiongehalts von Kontrollkulturen und mit BSO vorinkubierten Kulturen.

3.2.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxide

Zytotoxizität von CHP

Bei den mit BSO vorinkubierten Zellen kam es schon bei niedrigeren Peroxidkonzentrationen zu einer zytotoxischen Wirkung von CHP als bei den Kontrollkulturen. Die Abbildungen 22 A und B zeigen, dass bei den vorinkubierten Zellen bereits eine CHP-Konzentration von 10µM eine Reduktion des Proteingehalts von > 50 % auslöste. In diesen Versuchen war es somit nicht möglich, einen genauen EC₅₀-Wert zu ermitteln. Es zeigte sich aber, dass der EC₅₀-Wert in den vorinkubierten Zellkulturen um einen Faktor von >1,5 (Abb. 22 A) bzw. > 2,4 (Abb. 22 B) niedriger als in den Kontrollkulturen liegen muss. Zur genaueren Bestimmung des Einfluss der Vorinkubation mit BSO auf die Zytotoxizität von CHP wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, bei denen zusätzlich niedrigere CHP-Konzentrationen eingesetzt wurden (Abb. 22 C und D). In diesen Versuchen zeigte sich ebenfalls, dass aus der Vorinkubation der C6-Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber CHP resultierte. Dies spiegelt sich in der Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der vorinkubierten C6-Kulturen im Vergleich zu der Kurve der Kontrollkulturen wieder.

Die Unterschiede zwischen den EC₅₀-Werten der vorinkubierten und der unbehandelten Kulturen der einzelnen Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt. Bei dem Vergleich der EC₅₀-Werte in den einzelnen Versuchen fällt auf, dass diese sehr stark voneinander abweichen.

Hier zeigt sich eine Abhängigkeit der EC₅₀-Werte von dem Proteingehalt der Kulturen.

In C6-Zellkulturen mit einem höheren Proteingehalt, im Vergleich zu Kulturen mit niedrigerem Proteingehalt, lagen die EC₅₀-Werte höher. Dies zeigt, dass Kulturen mit einem höheren Proteingehalt weniger empfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP sind. Es ist somit von einem Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der zytotoxischen Wirkung von CHP auszugehen.

Der beobachtete Effekt von BSO war dagegen unabhängig von der Höhe des Proteingehalts in allen Versuchen zu beobachten.

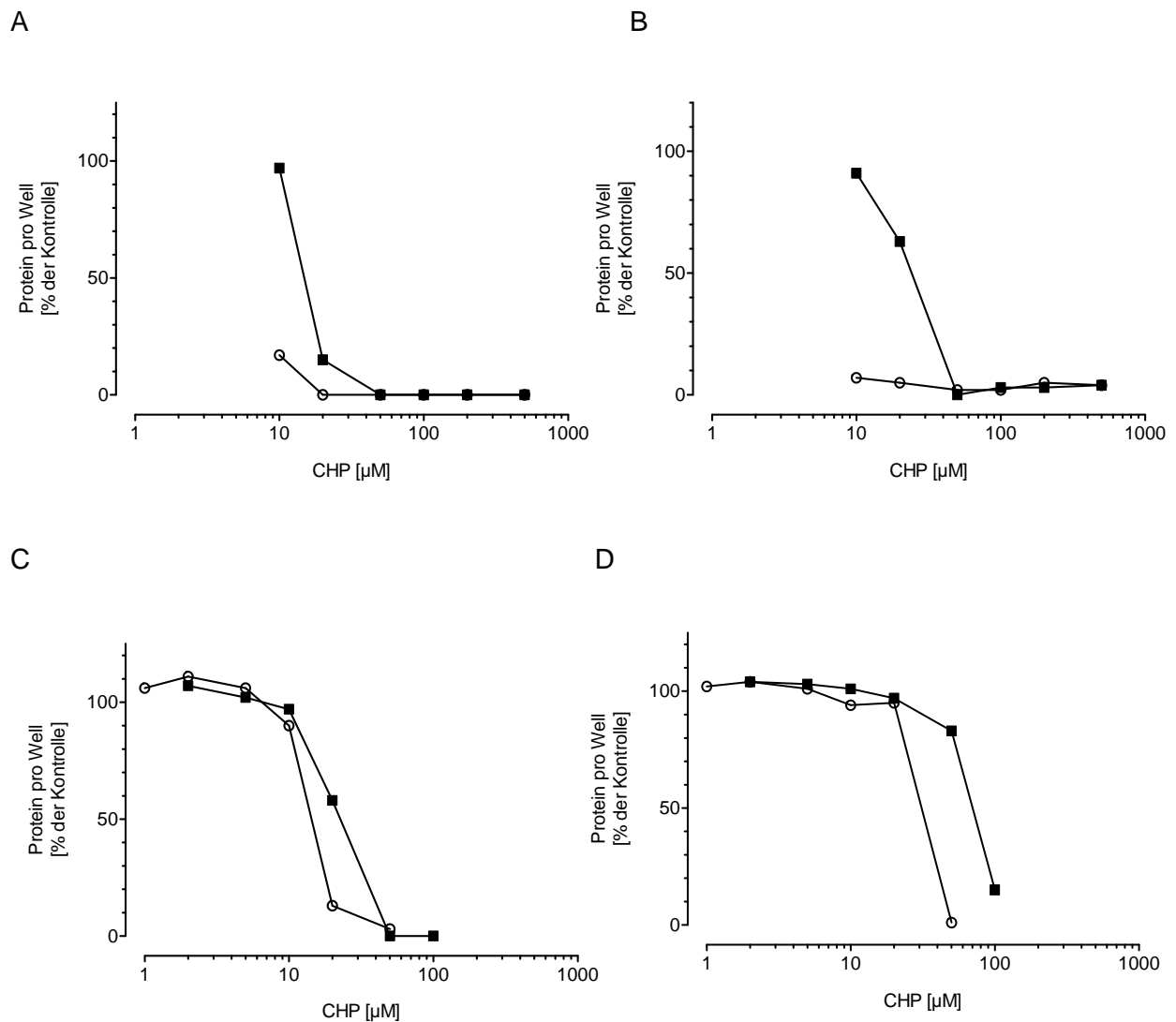


Abbildung 21: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen

Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von CHP in Kontrollkulturen(■) und nach Vorinkubation mit 0,5 mM BSO (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Well (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage. In A) ist der Versuch vom 16.05.08, in B) vom 23.05.08, in C) vom 30.05.08 und in D) vom 06.06.08 dargestellt.

Tabelle 6: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen

Versuch	Kontrollen		BSO-behandelt		Faktor $\frac{EC_{50 \text{ Kontrolle}}}{EC_{50 \text{ BSO}}}$
	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ CHP [μM]	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ CHP [μM]	
16.05.08	0,028	15	0,021	<10	> 1,5
23.05.08	0,080	24	0,073	<10	> 2,4
30.05.08	0,067	22	0,068	14	1,6
06.06.08	0,119	70	0,119	31	2,3

Zytotoxizität von H₂O₂

Die Abbildung 22 stellt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von drei unabhängigen Versuchen dar. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen ist erkennbar, dass bei den mit BSO vorinkubierten Kulturen niedrigere H₂O₂-Konzentrationen bereits zu einem Verlust an Zellprotein führten.

Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die EC₅₀-Werte, sowie den Proteingehalt, in den einzelnen Versuchen. Anhand der dargestellten Unterschiede zwischen den EC₅₀-Werten von vorinkubierten und unbehandelten Kulturen zeigt sich die höhere Empfindlichkeit von mit BSO behandelten Kulturen gegenüber H₂O₂.

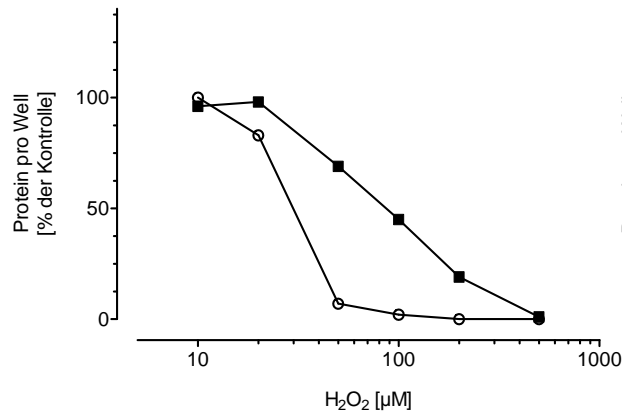
Dementsprechend kann die Aussage getroffen werden, dass BSO die Empfindlichkeit von C6-Zellkulturen gegenüber H₂O₂ erhöht.

Tabelle 7: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ in C6-Zellkulturen

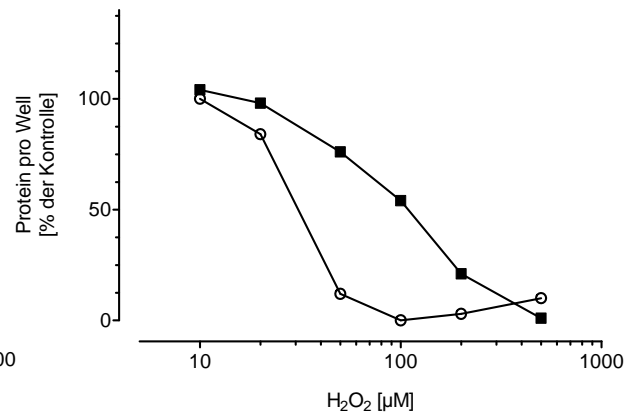
Versuch	Kontrollen		BSO-behandelt		Faktor $\frac{EC_{50 \text{ Kontrolle}}}{EC_{50 \text{ BSO}}}$
	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ H ₂ O ₂ [μM]	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ H ₂ O ₂ [μM]	
23.05.08	0,067	84	0,081	30	2,8
30.05.08	0,071	110	0,067	31	3,5
06.06.08	0,102	> 500	0,101	380	> 1,3

Erneut zeigte sich, dass bei höherem Zellproteingehalt die EC_{50} -Werte in Richtung höherer Konzentrationen verschoben wurden, so dass von einem Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 ausgegangen werden.

A



B



C

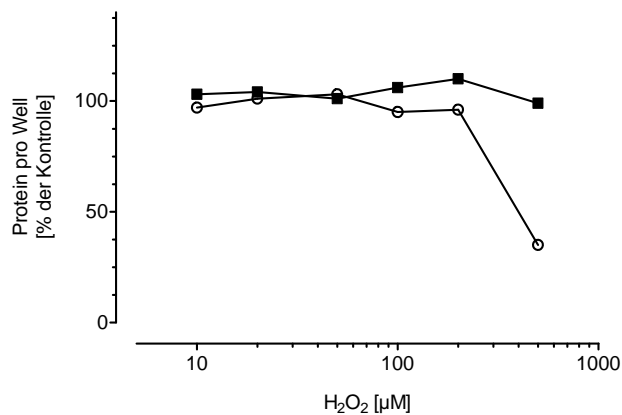


Abbildung 22: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 in C6-Zellkulturen

Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 0,5 mM BSO (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wells (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage. In A) ist der Versuch vom 23.05.08, in B) vom 30.05.08 und in C) vom 06.06.08 dargestellt.

3.3 Cystin

Cystin wird über den Cystin/Glutamat-Antiporter in C6-Zellen aufgenommen, in der Zelle zu Cystein reduziert und zur Synthese von Glutathion verwendet (Kato et al., 1992).

Das verwendete Basismedium DMEM enthält 0,2 mM Cystin. C6-Zellen wurden über die gesamte Wachstumsphase mit zusätzlich 0,5 mM Cystin in Wachstumsmedium behandelt. Dies hatte keine Veränderung des Wachstumsverhaltens zur Folge. Der mittlere Proteingehalt in den 96-Well-Mikrotiterplatten der Kontrollkulturen lag bei $18,1 \pm 3,1 \mu\text{g/Well}$ (96-Well-Mikrotiterplatten) und bei den vorinkubierten Kulturen bei $18,9 \pm 2,6 \mu\text{g/Well}$ (96-Well-Mikrotiterplatten).

3.3.1 Einfluss auf den Glutathiongehalt

Durch die Vorinkubation der C6-Zellkulturen mit 0,5 mM Cystin konnte keine signifikante Erhöhung des Glutathiongehalts erzielt werden. Der aus drei unabhängigen Versuchen ermittelte mittlere Gehalt an Glutathion (GSH) lag bei den Kontrollkulturen bei $28,1 \pm 3,5 \text{ nmol GSH/mg Zellprotein}$, bei den vorinkubierten Kulturen bei $27,4 \pm 6,4 \text{ nmol GSH/mg Zellprotein}$ (Abb. 24).

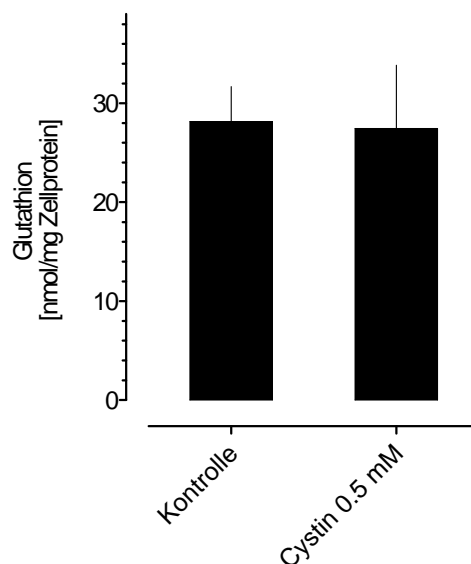


Abbildung 23: Einfluss von Cystin auf den Glutathiongehalt in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Glutathiongehalts [nmol GSH/mg Zellprotein] aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

3.3.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Zytotoxizität von CHP

Zur Beurteilung des Einfluss der Vorinkubation mit Cystin auf die zytotoxische Wirkung von CHP wurde ein einzelner Versuch durchgeführt.

Wie bereits dargestellt, kam es durch die Vorinkubation mit Cystin zu keiner Zunahme des GSH-Gehalts in C6-Zellen. Wie der unveränderte GSH-Gehalt vermuten ließ, zeigte sich auch keine veränderte Empfindlichkeit der vorinkubierten Kulturen gegenüber CHP.

Der EC_{50} -Wert in den vorinkubierten Kulturen lag bei $30,4 \mu\text{M}$, in den Kontrollkulturen bei $32,6 \mu\text{M}$ (Abb. 25).

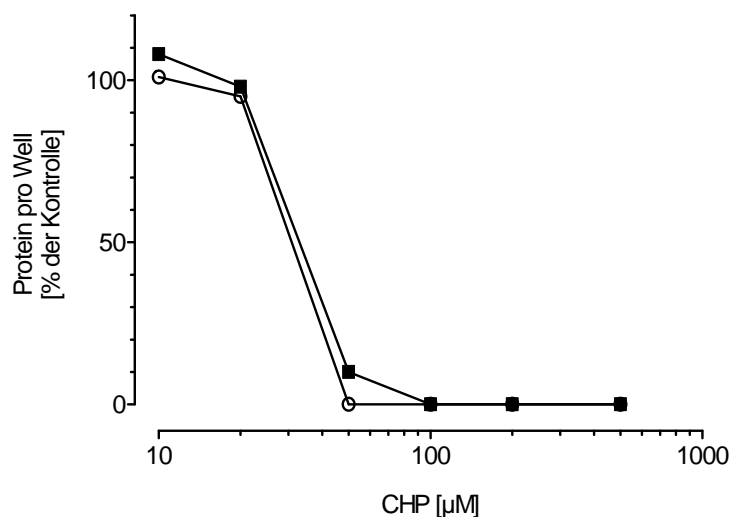


Abbildung 24: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen

Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von CHP in der Kontrollkultur (■) und nach Vorinkubation mit $0,5 \text{ mM}$ Cystin (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition).

Zytotoxizität H_2O_2

Bei den Versuchen zum Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 , zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Empfindlichkeit der vorinkubierten Kulturen. Der aus drei Versuchen bestimmte mittlere EC_{50} -Wert lag bei $140 \pm 55 \mu\text{M}$ in den Kontrollkulturen und bei $128 \pm 40 \mu\text{M}$ in den vorinkubierten Kulturen (Abb. 26 B).

Auffällig bei den in Abbildung 25 A dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven ist der große Standardfehler des Mittelwerts (SEM), abgebildet als vertikaler Strich. Der große SEM ist erklärbar mit dem unterschiedlichen Zellproteingehalt der Kulturen in den einzelnen Versuchen (Tabelle 8). Der Zellproteingehalt scheint die Empfindlichkeit der Kulturen gegenüber H_2O_2 beeinflusst zu haben. Es zeigt sich erneut, dass Zellkulturen mit höherem Zellproteingehalt resistenter gegenüber H_2O_2 waren, als Kulturen mit niedrigerem Zellproteingehalt.

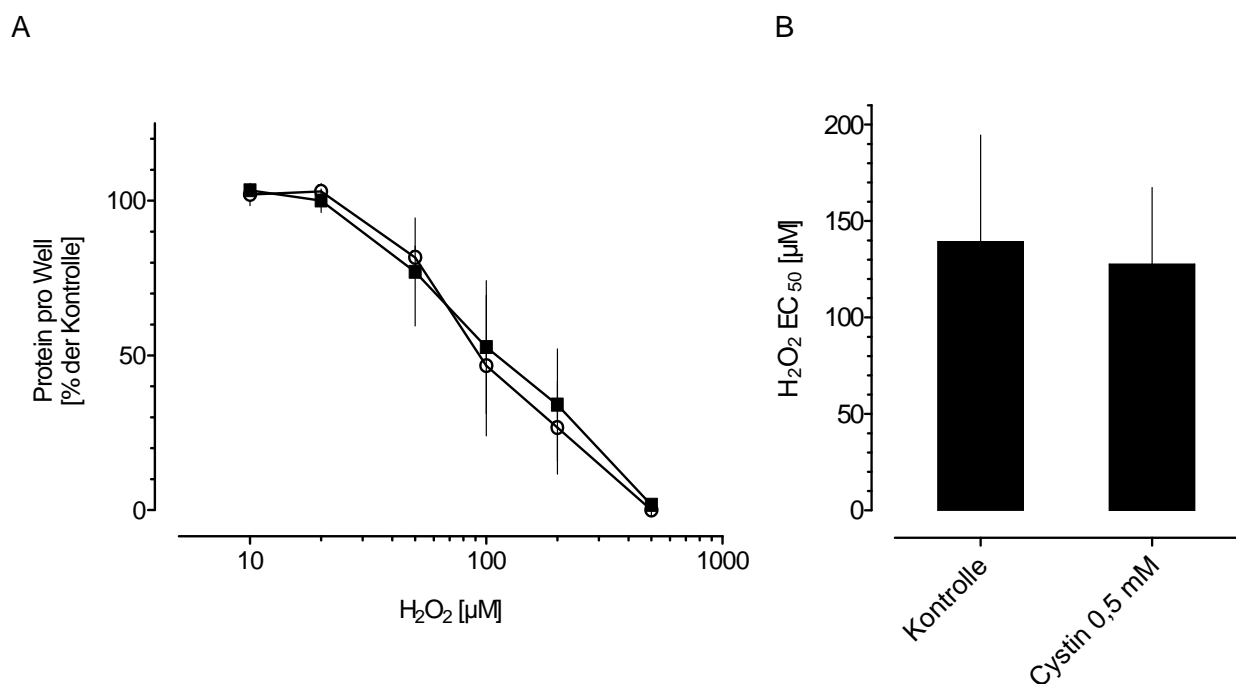


Abbildung 25: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 in C6-Zellkulturen

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 0,5 mM Cystin (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von H_2O_2 in unbehandelten und mit 0,5 mM Cystin behandelten C6-Zellkulturen. Die EC_{50} -Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Tabelle 8: Einfluss von Cystin auf die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ in C6-Zellkulturen

Versuch	Kontrollen		Cystin-behandelt		Faktor $\frac{EC_{50_Kontrolle}}{EC_{50_Cystin}}$
	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ H ₂ O ₂ [μM]	Zellprotein [mg/ml]	EC ₅₀ H ₂ O ₂ [μM]	
08.02.08	0,05	48	0,061	65	0,7
22.02.08	0,113	236	0,119	201	1,2
07.03.08	0,085	139	0,087	117	1,2
Mittelwert	0,083	141	0,089	128	1,1

3.4 Selen

Das Spurenelement Selen ist essentiell für die Biosynthese von Selenoproteinen, wie der Glutathionperoxidase (Brigelius-Flohé, 1999). Selen ist im verwendeten Basismedium DMEM nicht vorhanden und gelangt alleine durch den Zusatz von Tierserum in das Wachstumsmedium.

3.4.1 Selengehalt in fötalen Rinderseren und Pferdeserum

Mittels der Atomabsorptionsspektrometrie wurde der Selengehalt in verschiedenen tierischen Seren bestimmt. Dabei stellt sich ein großer Unterschied des Selengehalts in den Seren dar (Abb. 26). In der Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Selenmessung in den verschiedenen Seren als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus drei unabhängigen Messungen dargestellt. Der Selengehalt im Pferdeserum war wesentlich höher als in den fötalen Rinderseren. Im Vergleich zum Selengehalt im Pferdeserum lag der Selengehalt in dem durch Biochrom vertriebenem fötalem Rinderserum 20-fach niedriger. Um das 57-fache niedriger war die Selenkonzentration in dem von c.c.pro vertriebenem fötalem Rinderserum.

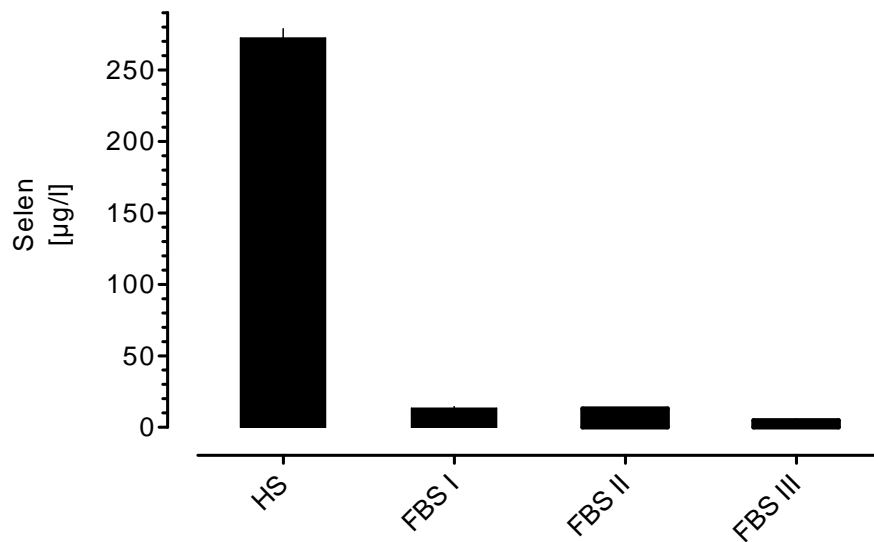


Abbildung 26: Selengehalt in tierischen Seren

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Selengehalts [$\mu\text{g/l}$] aus drei unabhängigen Messungen. HS (Horse Serum) bezeichnet das von Sigma-Aldrich vertriebene Pferdeserum (Lot. 0844841). FBS (Fetal Bovine Serum) steht für fötales Rinderserum, wobei die von Biochrom vertriebenen Seren als FBS I (Lot. 0410GI) und FBS II (Lot. 0764H) gekennzeichnet sind und FBS III für das von c.c.pro vertriebene Serum (Lot. C367) steht.

Tabelle 9: Selengehalt in tierischen Seren

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Selengehalts [$\mu\text{g/l}$] bzw. [μM] aus drei unabhängigen Messungen. HS: Pferdeserum (Horse Serum), FBS: Fötales Rinderserum (Fetal Bovine Serum).

Serum	Selengehalt [$\mu\text{g/l}$]	Selengehalt [μM]
HS (SIGMA Lot. 0844841)	272 \pm 6,5	3,4 \pm 0,08
FBS I (Biochrom Lot 0410GI)	13 \pm 1,2	0,16 \pm 0,02
FBS II (Biochrom Lot. 0764H)	13 \pm 0,3	0,16 \pm 0,004
FBS III (c.c.pro Lot. C367)	5 \pm 1	0,06 \pm 0,01

Selengehalt im Wachstumsmedium

Im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein wurden C6-Zellkulturen bis Ende 2005 in Ham's F-10-Medium, welchem 15 % Pferdeserum sowie 2,5 % fötales Rinderserum hinzugefügt wurden, kultiviert. Seit 2006 erfolgt die Kultivierung der C6-Kulturen in DMEM-Medium, welches mit 5 % fötalem Rinderserum versetzt wird.

Nach Angaben der Hersteller enthält sowohl Ham's F-10- als auch DMEM-Basismedium kein Selen.

In der nachfolgenden Tabelle 10 wird die, aus den gemessenen Selengehalten der Seren resultierende, Selenkonzentration in Ham's-F10-Wachstumsmedium sowie in dem aktuell verwendeten DMEM-Wachstumsmedium wiedergegeben.

Tabelle 10: Selengehalt in Wachstumsmedien

Wachstumsmedium	Selengehalt [μM]
Seit 2006 eingesetztes Wachstumsmedium: DMEM-Wachstumsmedium mit 5 % FBS	0,01
Vor 2006 eingesetztes Wachstumsmedium: Ham's F-10- Wachstumsmedium mit 15 % HS + 2,5 % FBS	0,51

HS: Pferdeserum (Horse Serum), FBS: Fötales Rinderserum (Fetal Bovine Serum).

Bei dem Vergleich der beiden Wachstumsmedien zeigt sich, dass die Selenkonzentration des aktuell verwendeten DMEM-Wachstumsmediums ca. 50fach niedriger ist, als in dem bis Ende 2006 eingesetztem Ham's F-10-Wachstumsmedium.

3.4.2 Zytotoxizität von Natriumselenit

Bevor der Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von Peroxiden untersucht wurde, wurde überprüft in welchem Maß Natriumselenit selbst zytotoxisch wirkt. Dabei wurde einzeln die zytotoxische Wirkung auf proliferierende C6-Zellen und wachstumsgehemmte C6-Zellen eruiert.

Bei proliferierenden Zellen lag der EC_{50} -Wert für die Zytotoxizität von Natriumselenit bei $39,4 \pm 6,8 \mu\text{M}$ (Abb. 27). Der zytotoxische Effekt auf wachstumsgehemmte Zellen war wesentlich geringer, der EC_{50} -Wert lag bei $840 \mu\text{M}$ (Range: 21). Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass Natriumselenit-Konzentrationen von $\leq 10 \mu\text{M}$ weder auf proliferierende noch auf wachstumsgehemmte C6-Zellen zytotoxisch wirkt. Für die im Folgenden dargestellten Versuche wurden somit zur Vorinkubation mit Natriumselenit nur Konzentration $\leq 10 \mu\text{M}$ eingesetzt.

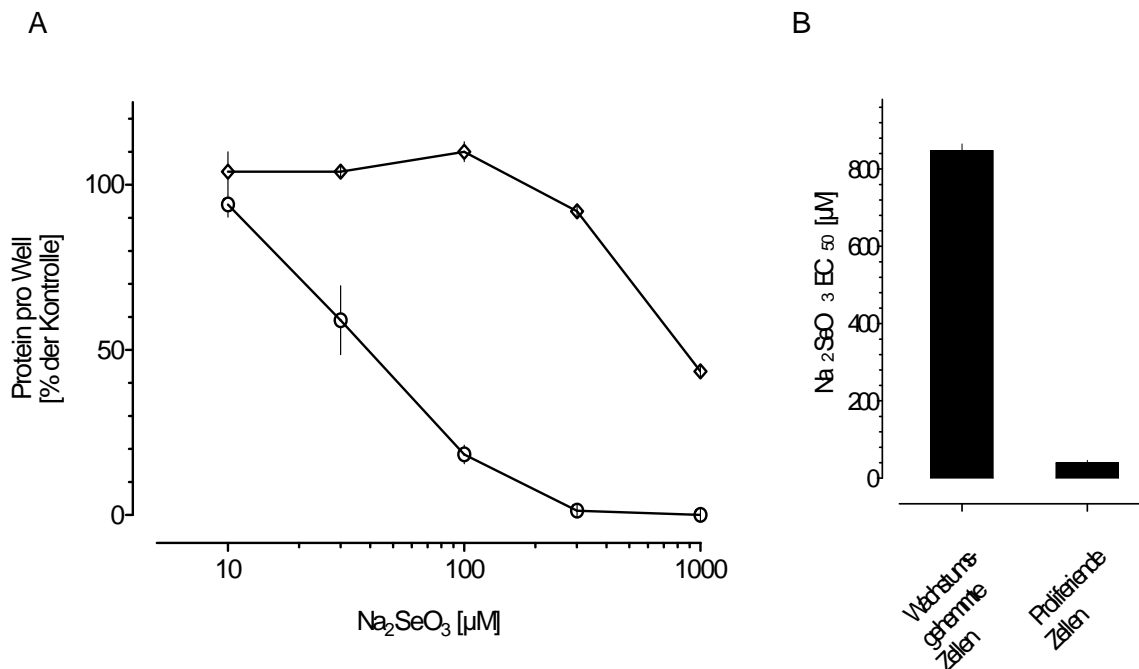


Abbildung 27: Zytotoxizität von Natriumselenit in C6-Zellkulturen

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von Natriumselenit auf proliferierenden (○) und wachstumsgehemmten (◇) C6-Zellkulturen. Auf der Abszisse sind die eingesetzten Natriumselenit-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Well (keine Natriumselenit-Exposition).

In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die proliferierenden C6-Kulturen sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage dargestellt. In der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die wachstumsgehemmten C6-Zellkulturen sind der Mittelwert ± Range aus zwei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage dargestellt.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC₅₀-Werte) von Natriumselenit in proliferierenden und wachstumsgehemmten C6-Zellkulturen. Die EC₅₀-Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (proliferierende Zellen) bzw. Mittelwert ± Range (wachstumsgehemmte Zellen).

3.4.3 Vorinkubation mit Natriumselenit

3.4.3.1 Einfluss auf die Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität erfolgte in drei unabhängigen Versuchen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit auf die Aktivität der Glutathionperoxidase in C6-Zellen hat (Abb. 29). Die mittlere Aktivität der Glutathionperoxidase in den Kontrollkulturen lag bei $5,4 \pm 1,2$ mUnits/mg Zellprotein. Durch Vorinkubation mit Natriumselenit konnte die Aktivität in etwa verdoppelt werden, sie lag bei $12,2 \pm 1,5$ mUnits/mg Zellprotein. Bei der statistischen Analyse mittels des einseitigen,

gepaarten T-Tests, konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der GPx-Aktivität in den Kontrollkulturen und den vorinkubierten Kulturen bestätigt werden.

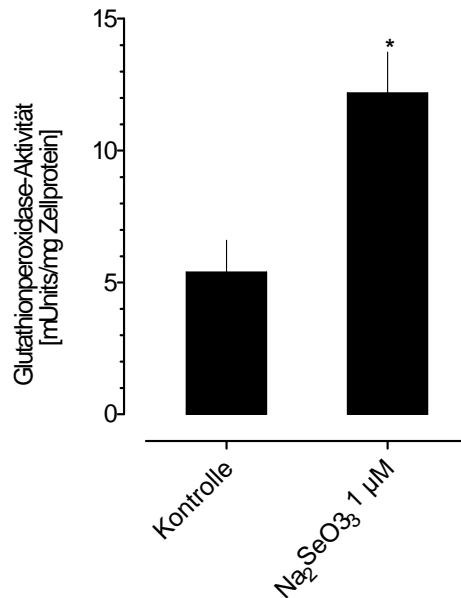


Abbildung 28: Einfluss von Natriumselenit auf die Glutathionperoxidase-Aktivität in C6-Zellen

Dargestellt ist die Aktivität der Glutathionperoxidase in mUnits pro mg Zellprotein. Eine Unit Glutathionperoxidase baut bei 25°C und einem pH von 7,4 1 µmol NADPH pro Minute ab. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage
 * $p \leq 0,05$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den Mittelwerten der Glutathionperoxidase-Aktivität von Kontrollkulturen und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen.

3.4.3.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Zytotoxizität von CHP

Zur Untersuchung eines Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von CHP wurde zunächst die Zytotoxizität von CHP mittels der Proteinbestimmung nach Lowry bestimmt. In einem Versuch wurden die C6-Zellen mit 1µM Natriumselenit vorinkubiert (Abb. 30 A). Diese Vorinkubation führte zu keiner Veränderung der zytotoxischen Wirkung von CHP in den C6-Zellkulturen. Um auszuschließen, dass die gewählte Konzentration von 1µM Natriumselenit zu niedrig war um einen protektiven Effekt auf die C6-Zellkulturen zu haben, wurden in einem weiteren Versuch die C6-Zellen mit 3 bzw. 10 µM Natriumselenit vorinkubiert (Abb. 30 B). Auch hier zeigte sich, dass die Vorinkubation mit Natriumselenit keinen Einfluss auf die zytotoxische Potenz von CHP hatte.

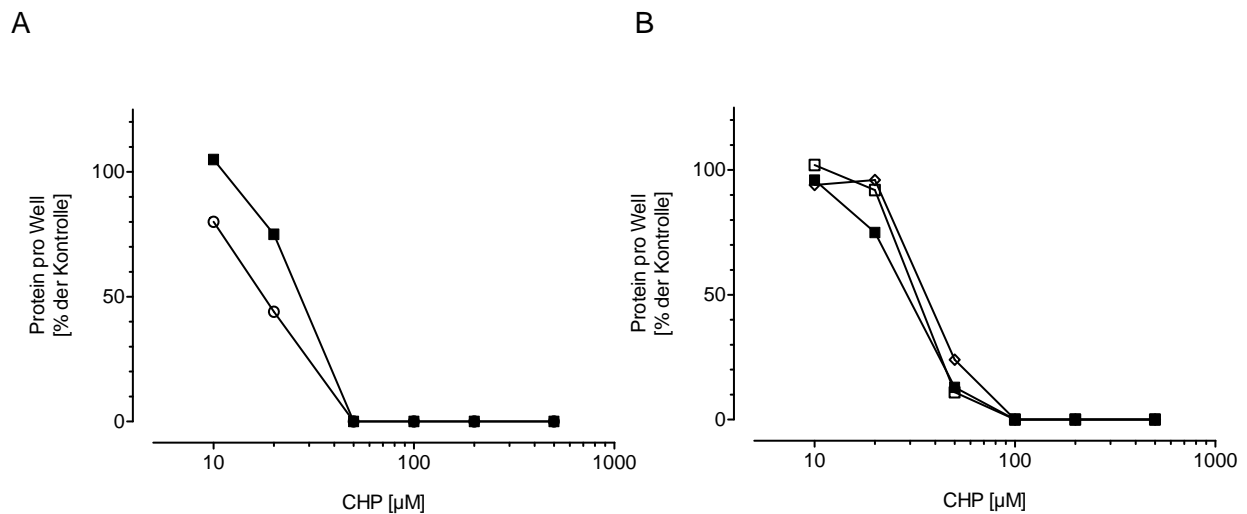


Abbildung 29: Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen (Endpunkt: Zellprotein/Well)

A) Dargestellt ist ein Versuch. Abgebildet sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von CHP, gemessen als Reduktion des Proteingehalts, in der Kontrollkultur (■) und nach Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit (○).

B) Dargestellt ist ein Versuch. Abgebildet sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von CHP, gemessen als Reduktion des Proteingehalts, in der Kontrollkultur (■) und nach Vorinkubation mit 3 µM Natriumselenit (◇) bzw. 10 µM Natriumselenit (□).

Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition) von einem Versuch.

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse durch die Methode der Zytotoxizitätsmessung mittels der Proteinbestimmung bedingt wurden, wurde zur weiteren Überprüfung des Einflusses von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP der MTT-Test verwendet. Mit Hilfe des MTT-Tests kann die Vitalität der Zellen bestimmt werden.

In vier unabhängigen Versuchen zeigte sich, dass die Vorinkubation mit Natriumselenit keinen signifikanten Einfluss auf die zytotoxische Potenz von CHP hatte (Abb. 31). Der EC_{50} -Wert, hier die Konzentration von CHP, bei dem die Vitalität der Zellen um 50 % der Vitalität der Kontrollen abfällt, lag in den unbehandelten Kulturen bei $31,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$, bei den mit 1 µM Selen vorinkubierten Kulturen bei $34,4 \pm 1,5 \mu\text{M}$.

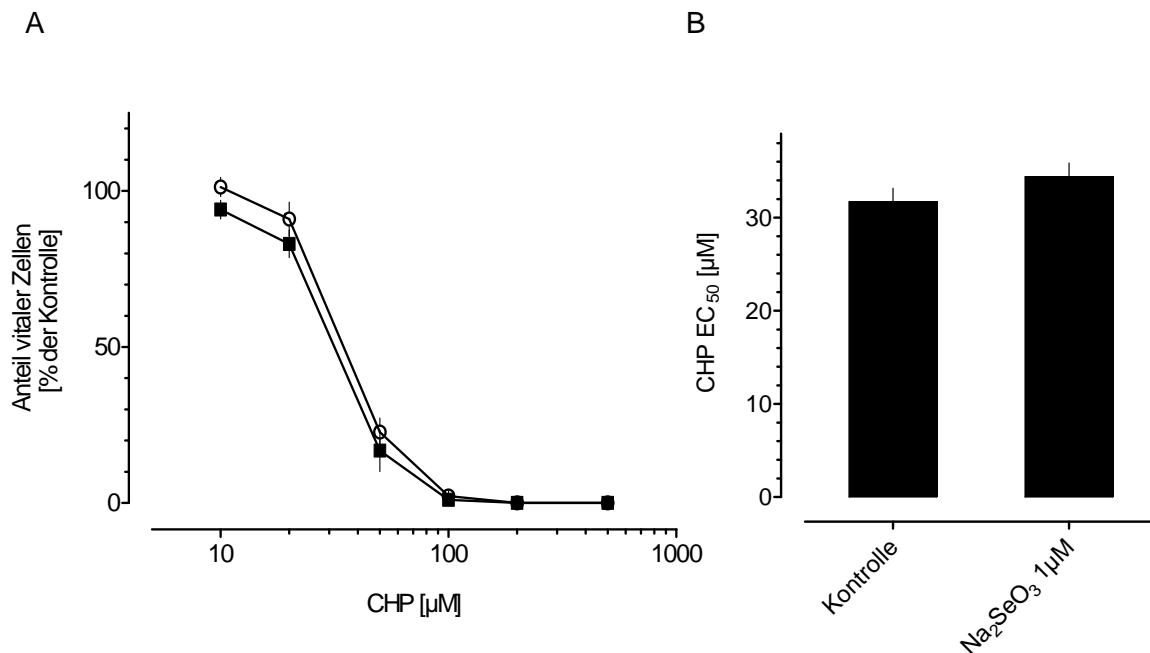


Abbildung 30: Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen (Endpunkt: Anteil vitaler Zellen)

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von CHP in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Anteil vitaler Zellen in Prozent der Kontroll-Wellen (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus vier unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC₅₀-Werte) von CHP in unbehandelten und mit 1 µM Natriumselenit behandelten C6-Zellkulturen. Die EC₅₀-Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Beide Verfahren zur Zytotoxizitätsmessung zeigten, dass die Vorinkubation mit Natriumselenit zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit von C6-Zellen führte.

Zudem zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Methoden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Methoden gleichwertig sind. Für die im Folgenden durchgeführten Versuche wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität die Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt.

Zytotoxizität von H₂O₂

Im Folgenden wurde auch der Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Potenz von H₂O₂ untersucht (Abb. 32). Bei diesen Versuchen wurde wieder die Proteinbestimmung nach Lowry als Zytotoxizitätstest eingesetzt. In drei unabhängigen Versuchen zeigte sich, dass es durch Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit zu keiner signifikanten Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve kommt.

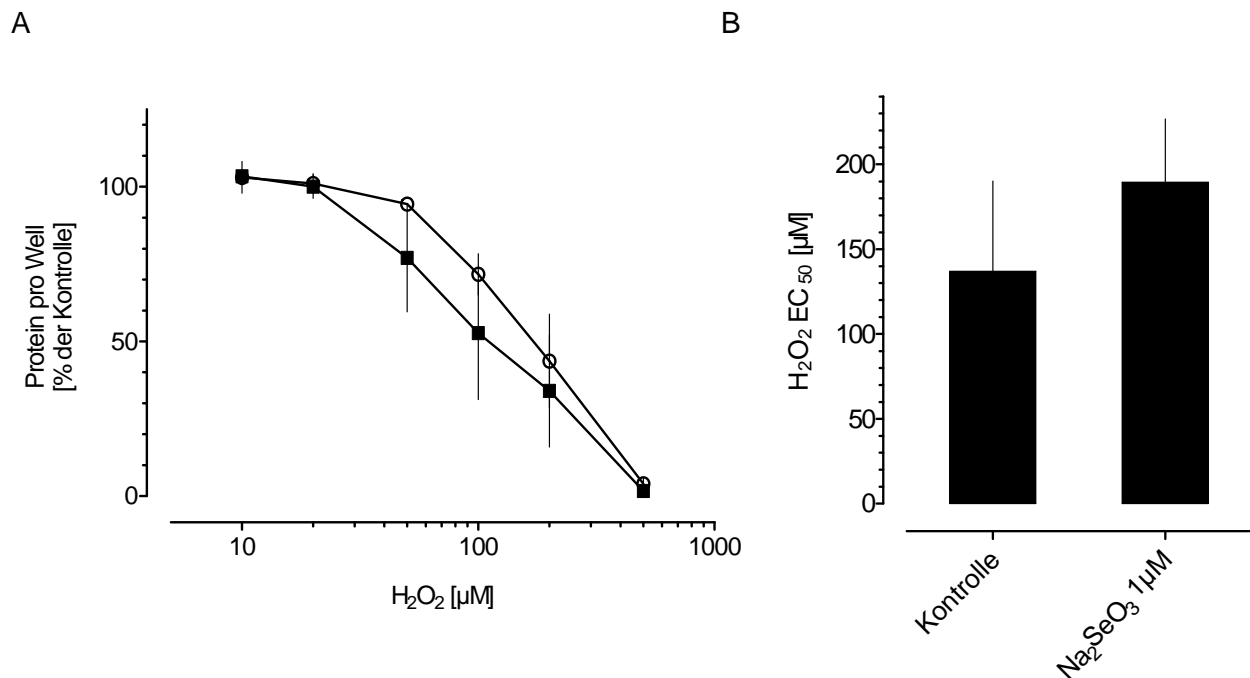


Abbildung 31: Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ in C6-Zellkulturen

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve der zytotoxischen Wirkung von H₂O₂ in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit (○). Auf der Abszisse sind die eingesetzten H₂O₂-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontrollwells (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

B) Halbmaximal zytotoxische Konzentrationen (EC₅₀-Werte) von H₂O₂ in unbehandelten und mit 1 µM Natriumselenit behandelten C6-Zellkulturen. Die EC₅₀-Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der in A) dargestellten Versuche ermittelt, dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Es kann somit die Aussage getroffen werden, dass die Vorinkubation mit 1 µM Natriumselenit keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber H₂O₂ hat. Die ermittelten EC₅₀-Werte lagen bei den unbehandelten Zellen bei 137 ± 53 µM, bei den vorinkubierten Zellen mit 189 ± 37 µM etwas höher.

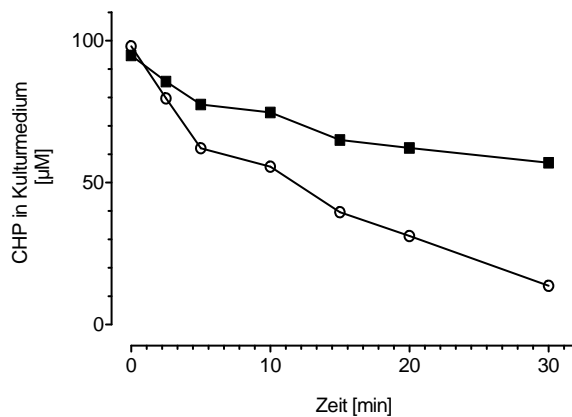
3.4.3.3 Einfluss auf die Elimination von Peroxiden

Wie oben gezeigt, erhöht die Vorinkubation von C6-Zellen mit Natriumselenit zwar die zelluläre Glutathionperoxidase-Aktivität, aber beeinflusst nicht deren Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden. Das ist ein so nicht erwartetes Ergebnis, da die Glutathionperoxidase (GPx) an der Elimination von H₂O₂ und CHP durch neuronale Zellen beteiligt ist (Dringen et al, 2005). Eine Erhöhung der GPx-Aktivität sollte zu einer beschleunigten Elimination der Peroxide und damit zu einer geringeren Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Peroxiden

führen. Das ist offensichtlich nicht der Fall. Es wurde deshalb untersucht, ob die Erhöhung der GPx-Aktivität in C6-Zellen durch Vorinkubation mit Natriumselenit überhaupt mit einem beschleunigtem Peroxid-Abbau einhergeht. Dazu wurde die Kinetik der Elimination von CHP bzw. H_2O_2 aus dem Medium von Natriumselenit vorinkubierten und unbehandelten C6-Zellkulturen gemessen.

Bei den Untersuchungen zur Elimination von Peroxiden zeigte sich, dass vor allem CHP von C6-Zellkulturen die mit Natriumselenit vorinkubiert wurden schneller aus dem Kulturmedium entfernt wird (Abb. 32 A). Ausgehend von einer Anfangskonzentration von $100 \mu\text{M}$ CHP im Medium, lag die CHP-Konzentration nach fünf Minuten bei den vorinkubierten Zellen bei $62 \mu\text{M}$, bei den Kontrollkulturen bei $78 \mu\text{M}$. Nach 15 Minuten war dieser Effekt noch stärker zu sehen, im Medium der vorinkubierten Zellkulturen war noch $40 \mu\text{M}$, bei den unbehandelten Zellen $65 \mu\text{M}$ CHP nachweisbar. Eine halbe Stunde nach der Exposition mit CHP war die CHP-Konzentration im Medium der vorinkubierten Kulturen auf $13,64 \mu\text{M}$ gesunken. Dagegen lag bei den Kontrollkulturen die CHP-Konzentration noch etwa vierfach höher, bei $57 \mu\text{M}$.

A



B

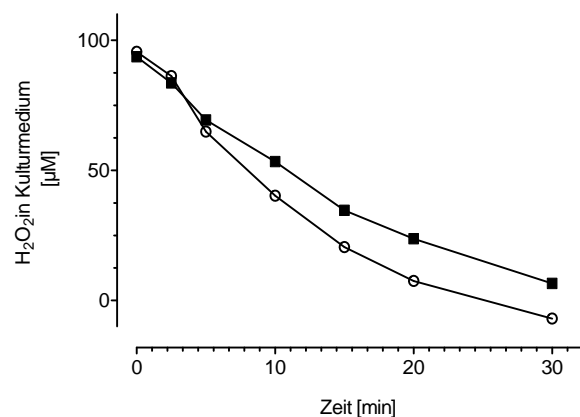


Abbildung 32: Einfluss von Natriumselenit auf die Elimination von CHP und H_2O_2 durch C6-Zellkulturen

A) Dargestellt ist ein Versuch. Abgebildet ist der Verlauf der CHP-Elimination in der Kontrollkultur (■) und nach Vorinkubation mit $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit (○).

B) Dargestellt ist ein Versuch. Abgebildet ist der Verlauf der H_2O_2 -Elimination in der Kontrollkultur (■) und nach Vorinkubation mit $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit (○).

Auf der Abszisse ist der Zeitraum der Untersuchung in Minuten aufgetragen, die Ordinate zeigt die gemessenen Peroxid-Konzentrationen.

Die H_2O_2 -Elimination wurde durch die Behandlung der Zellen mit Natriumselenit in geringerem Maß beeinflusst (Abb. 32 B). Zwar lagen die bestimmten H_2O_2 -Konzentrationen im Medium der vorinkubierten Zellkulturen auch bei diesem Versuch niedrigerer, allerdings war der Unterschied zu den unbehandelten Zellen nicht groß.

Bei der Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration nach fünf Minuten, lag die H_2O_2 -Konzentration der vorinkubierten Zellkulturen bei $65 \mu\text{M}$, bei den unbehandelten Zellen bei $70 \mu\text{M}$. Nach 15 Minuten lag die Konzentration bei den mit Natriumselenit behandelten Kulturen bei $21 \mu\text{M}$, nach 30 Minuten konnte kein H_2O_2 mehr nachgewiesen werden. In den Kontrollkulturen war nach 15 Minuten noch $35 \mu\text{M}$, nach 30 Minuten noch $7 \mu\text{M}$ nachweisbar.

Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die Vorinkubation mit $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit zu einer beschleunigten Elimination von CHP, im geringeren Ausmaß auch von H_2O_2 , führt.

3.4.3.4 Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung

Die zytotoxische Wirkung von Peroxiden wird durch Peroxid-induzierte Radikalbildung vermittelt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Vorinkubation mit Natriumselenit zu keiner Abnahme der Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber Peroxiden führt, obwohl die Elimination der Peroxide beschleunigt wird, stellte sich die Frage, ob das Ausmaß der Peroxid-induzierten Radikalbildung durch Natriumselenit beeinflusst wird.

In drei unabhängigen Versuchen wurde die Radikalbildung mittels des Dichlorfluorescein-Assay, bei dem Radikale zur Bildung einer photometrisch messbaren Fluoreszenz führen, bestimmt.

Es konnte gezeigt, dass die Vorinkubation von C6-Zellkulturen zu keiner Verminderung der Peroxid-induzierten Radikalbildung führt.

CHP führte in mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen im gleichen Ausmaß zu einer Radikalbildung wie in den Kontrollkulturen (Abb. 33 A).

Auch die Versuche mit H_2O_2 zeigten, dass eine Vorinkubation mit Natriumselenit zu keiner Reduktion der Peroxid-induzierten Radikalbildung führt (Abb. 33 B). Das Ausmaß der Radikalbildung war in den mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen und den Kontrollkulturen annähernd gleich stark ausgeprägt. Bei H_2O_2 -Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und $1000 \mu\text{M}$ war die Radikalbildung in den vorinkubierten Kulturen sogar geringfügig stärker ausgeprägt (jeweils $p \leq 0,5$).

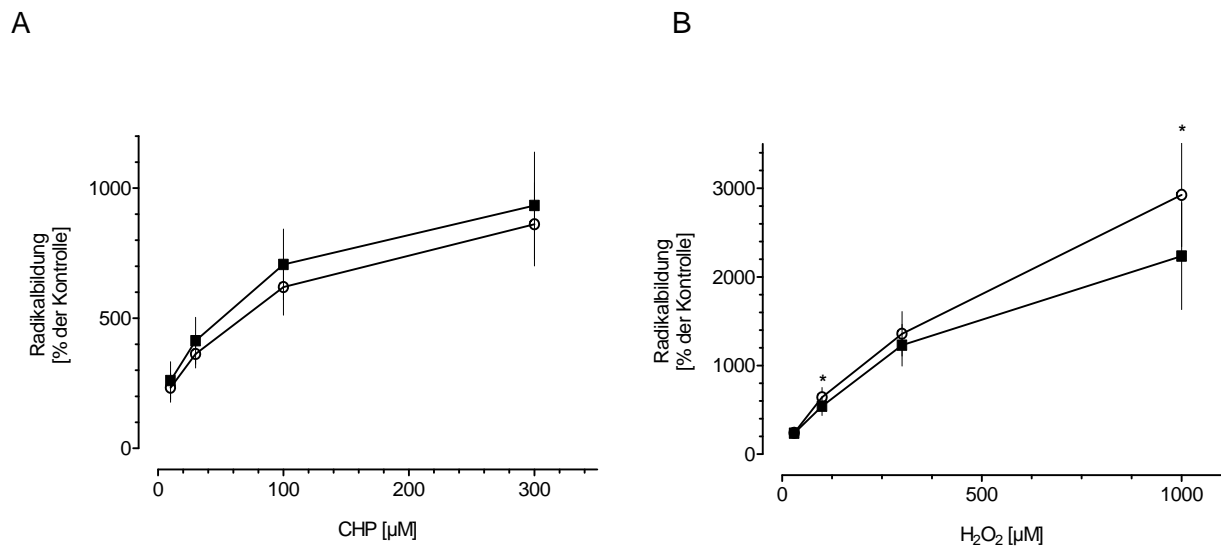


Abbildung 33: Einfluss von Natriumselenit auf die CHP- bzw. H₂O₂-induzierte Radikalbildung in C6-Zellkulturen

Dargestellt ist in A) die CHP-induzierte, in B) die H₂O₂-induzierte Radikalbildung in Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 1 μM Natriumselenit (○) 30 Minuten nach Beginn der Peroxid-Exposition. Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP- bzw. H₂O₂-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt Radikalbildung in Prozent der Kontroll-Wells (keine Peroxid-Exposition). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Passage.

* $p \leq 0,05$: signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test) zwischen den EC₅₀-Werten der Kontrollkulturen und der mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen.

3.4.3.5 Mikroskopische Beobachtungen des Einflusses auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Im Gegensatz zu den Versuchen zum Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von Peroxiden, bei denen die zytotoxische Wirkung mittels Proteinbestimmung, bzw. MTT-Test bestimmt wurde, konnte man bei der mikroskopische Beobachtung einen veränderte Reaktion von den mit Natriumselenit vorinkubierten Zellen auf die Peroxidexposition, vor allem von CHP, erkennen.

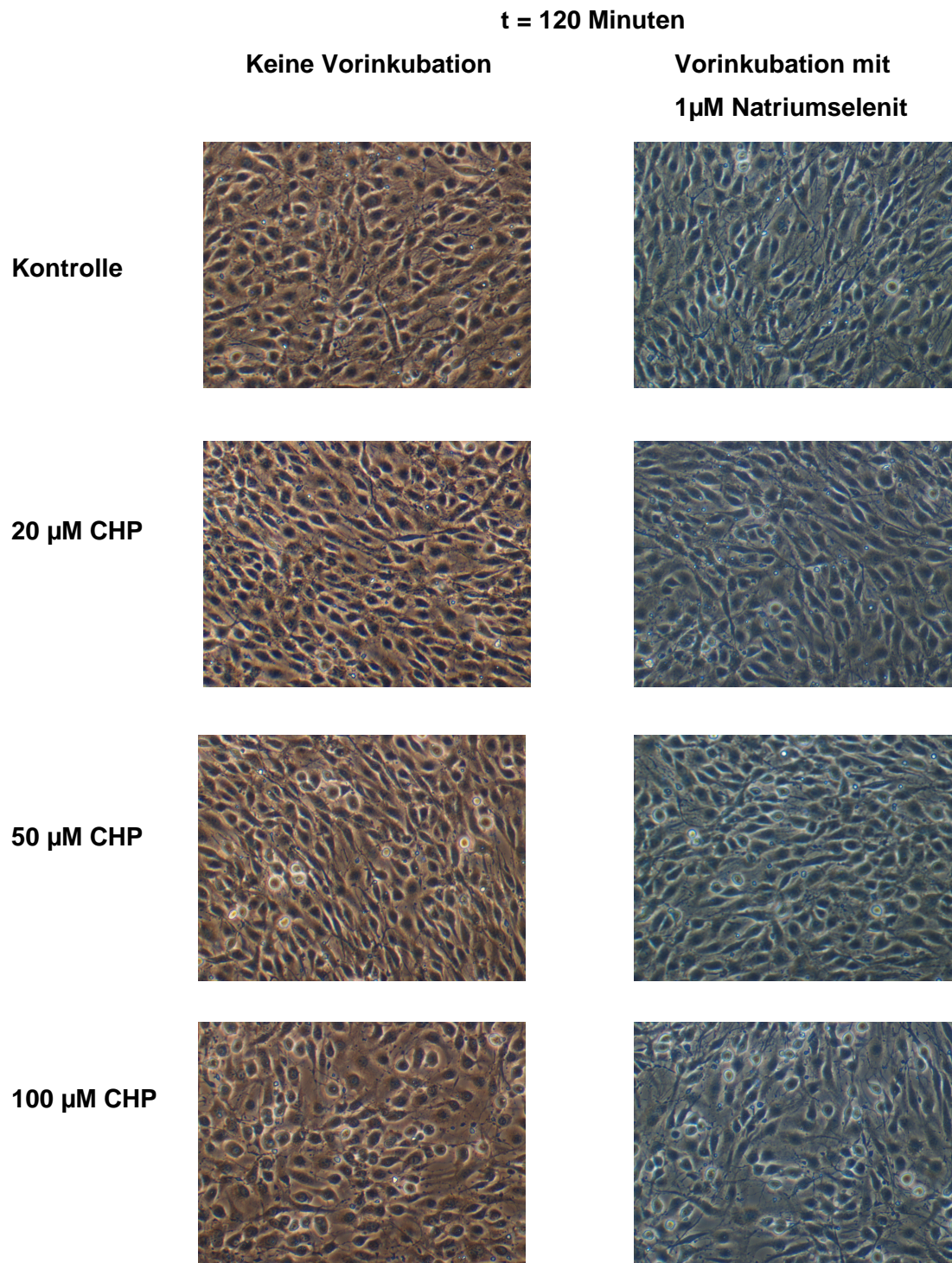
Nach der 72stündigen Wachstumsphase zeigte sich, dass die unbehandelten und mit Natriumselenit vorinkubierten Zellen in selbem Maß gewachsen waren und dieselben morphologischen Merkmale aufwiesen. Die Kulturen waren dicht gewachsen, in den 35mm-Schalen waren keine Freiräume zwischen den Zellen sichtbar. Die meisten Zellen hatten eine länglichen Zellkörper und zwischen zwei bis drei Zellausläufern pro Zelle, durch welche die Zellen untereinander verbunden waren. Nur ganz vereinzelt gab es Zellen, die nicht diesem Bild entsprachen. Dabei handelte es sich um Zellen, die keine Zellausläufer mehr zeigten und einen kleineren, eher rundlichen Zellkörper hatten.

Zytotoxizität von CHP

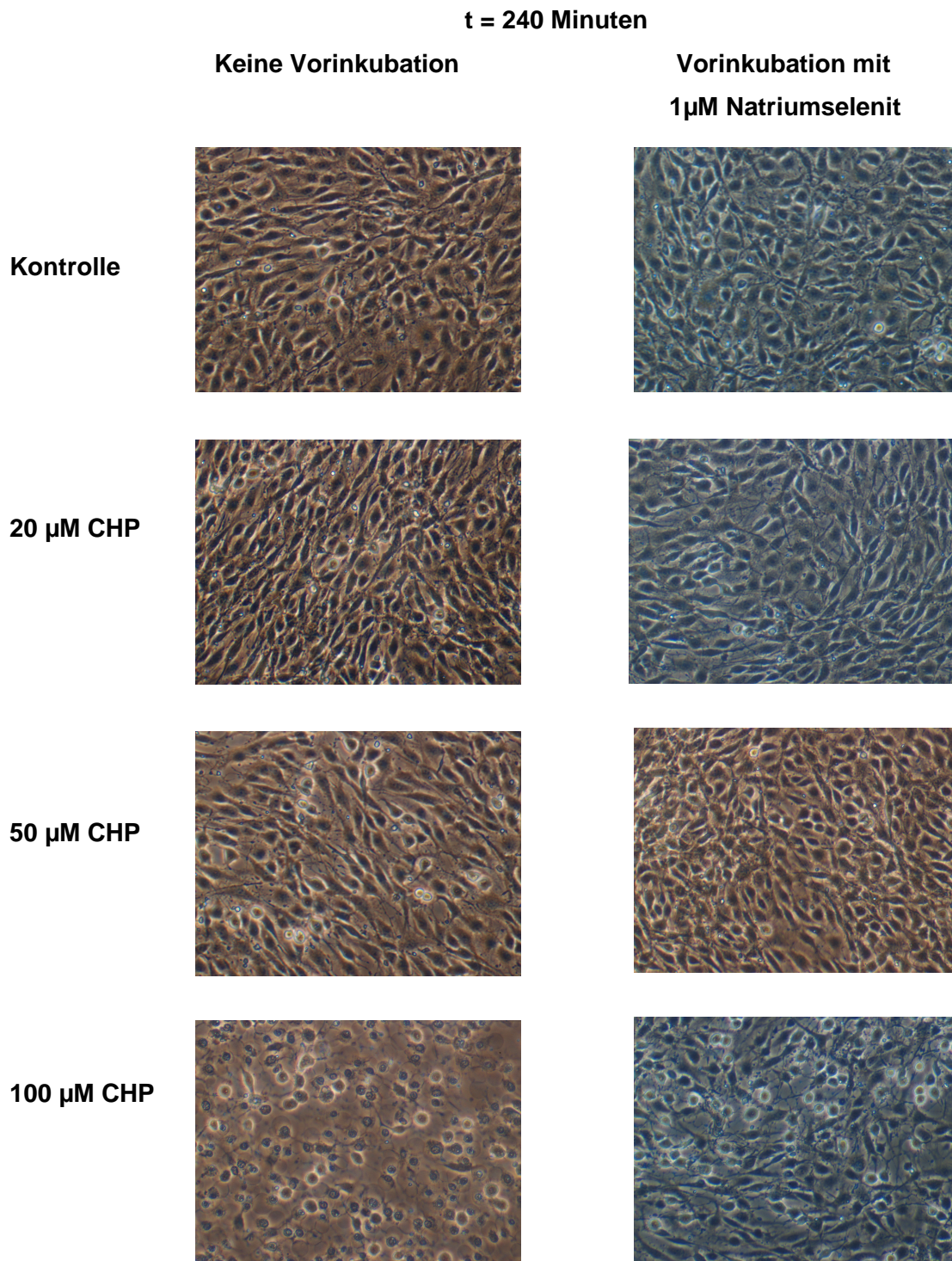
Zur mikroskopischen Beobachtung des Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von CHP erfolgte die Exposition mit 20 μM , 50 μM oder 100 μM CHP jeweils einer unbehandelten sowie einer im Vorfeld mit 1 μM Natriumselenit behandelten Kultur. Im Anschluss erfolgte die mikroskopische Beobachtung dieser Kulturen über einen Gesamtzeitraum von 22 Stunden. Es wurde zudem jeweils eine unbehandelte und eine mit Natriumselenit vorinkubierte Kontrollkultur angelegt.

Ohne CHP-Exposition (Kontrollkulturen) zeigten die unbehandelten und die mit Natriumselenit vorinkubierten Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 22 Stunden ein vergleichbares Bild. Die Zelldichte in den Kulturen war vergleichbar, was sich auch in der im Anschluss durchgeführten Proteinbestimmung widerspiegelt. In der unbehandelten Kultur lag der Proteingehalt bei 397 $\mu\text{g}/\text{Schale}$, bei der im Vorfeld mit Natriumselenit behandelten Kultur mit 453 $\mu\text{g}/\text{Schale}$ etwas höher.

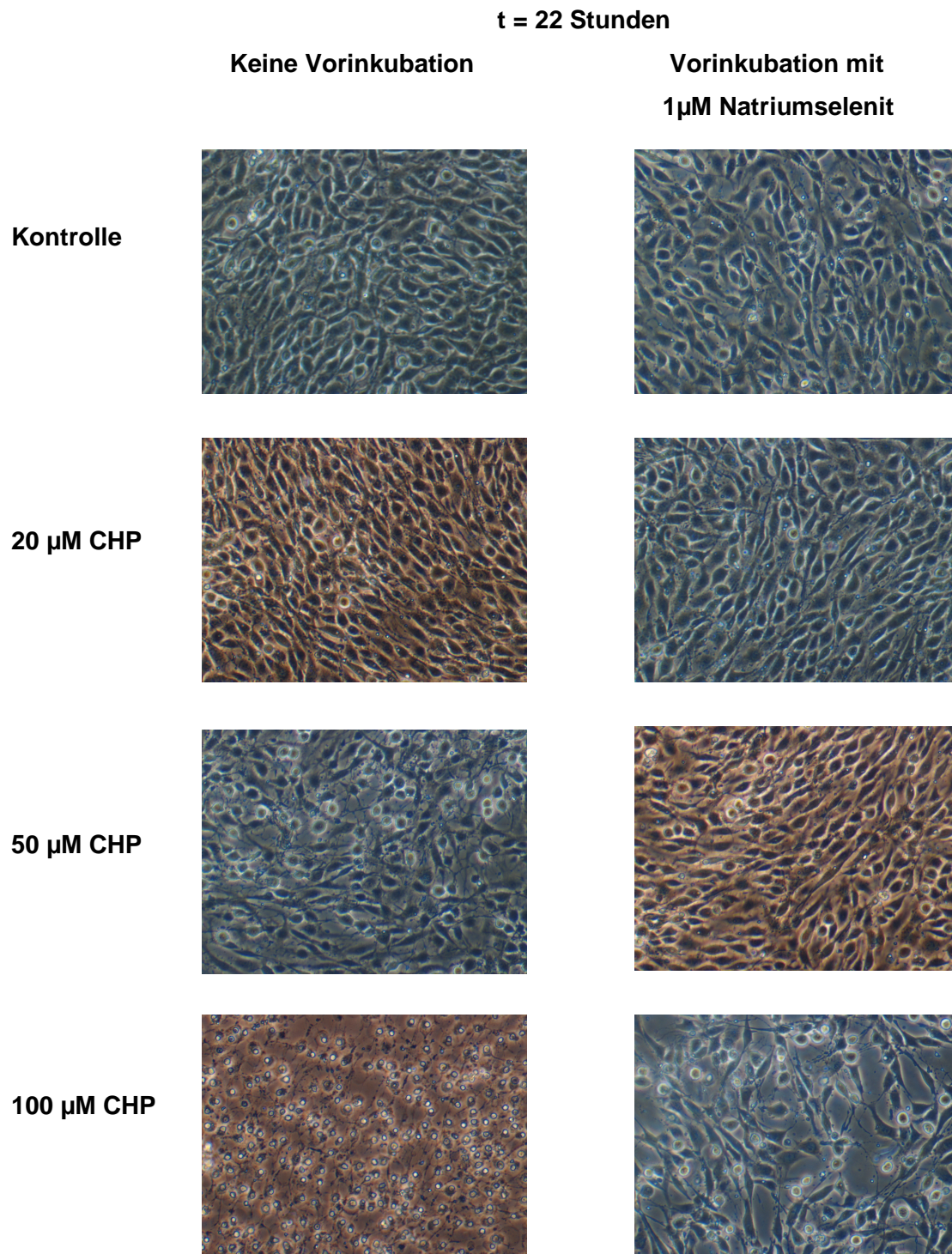
Die Abbildungen 34 – 36 zeigen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Kulturen zu den Zeitpunkten 120 Minuten, 240 Minuten sowie 22 Stunden nach Expositionsbeginn.



Abbildungen 34: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen
Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 120 Minuten nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen CHP-Konzentrationen



Abbildungen 35: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 240 Minuten nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen CHP-Konzentrationen.



Abbildungen 36: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellkulturen
Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 22 Stunden nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen CHP-Konzentrationen

Exposition mit 20 μM CHP

Die Exposition mit 20 μM CHP führte sowohl in den mit Natriumselenit vorinkubierten als auch in den unbehandelten Kulturen zu keinem Zeitpunkt zu einer Veränderung des Erscheinungsbildes der C6-Zellen (Abb. 34- Abb. 36). Es konnte somit mikroskopisch keine zytotoxische Wirkung von 20 μM CHP nachgewiesen werden.

Exposition mit 50 μM CHP

Auch bei der Exposition mit 50 μM CHP konnte in der ersten Stunde keine zytotoxische Wirkung beobachtet werden. Erstmals 120 Minuten nach Beginn der CHP-Exposition zeigten sich vereinzelte formveränderte Zellen (Abb. 34). Diese veränderten Zellen stellten sich als abgekugelte, rundliche Zellen dar, welche nicht mehr flach am Boden der Kulturschale hafteten. Die charakteristischen Zellfortsätze fehlten, so dass diese Zellen keine Zellkontakte mit den sie umgebenden Zellen eingingen.

In der photographischen Aufnahme fallen diese Zellen durch eine helle Umrandung auf. Diese, in der Phasenkontrastmikroskopie als Halo-Effekt beschriebene Beobachtung, lässt sich durch das Abkugeln der Zellen und somit einem, im Vergleich zu den flach am Boden haftenden Zellen, vergrößertem Zelldurchmesser erklären.

Zwischen der unbehandelten und der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur zeigte sich zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied.

Dagegen konnte 240 Minuten nach Expositionsbeginn erstmalig ein merkbarer Unterschied zwischen den mit Natriumselenit vorinkubierten und den unbehandelten Kulturen beobachtet werden (Abb. 35). Die Anzahl der veränderten Zellen hatte in der unbehandelten Kultur weiter zu genommen. Zudem stellte sich der Zellrasen nun deutlich aufgelockert dar.

Dagegen waren in der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur kaum veränderte Zellen erkennbar und die Dichte des Zellrasens entsprach dem der Kontrollkulturen.

Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen zum Endpunkt der Beobachtung, nach 22 Stunden der Exposition, sind in Abbildung 36 dargestellt.

Bis zu diesem Zeitpunkt führte 50 μM CHP in der unbehandelten Kultur weiterhin zu einer Zunahme der formveränderten, abgekugelten Zellen. Der Zellrasen zeigte sich deutlich aufgelockert, wenn sich auch die Mehrzahl der Zellen vital, mit dem charakteristischen länglichen Zellkörper und den multiplen Zellausläufern, darstellte.

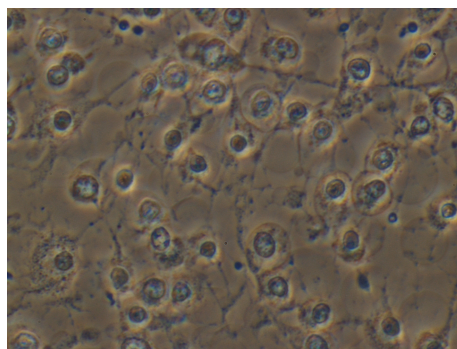
Die mit Natriumselenit vorinkubierte Kultur zeigte ein Bild entsprechend dem Bild der Kontrollkulturen (keine Peroxid-Exposition). Es waren kaum veränderte Zellen auffindbar, die Zelldichte war nach wie vor hoch.

Exposition mit 100 μM CHP

Ebenso wie die Exposition mit 50 μM CHP führte auch die Exposition mit 100 μM CHP erst nach 120 Minuten zu einem sichtbaren Effekt (Abb.34). Während aber in den mit 50 μM CHP behandelten Kulturen nur bei einzelnen Zellen die oben beschriebene Formveränderung auftrat, zeigte sie sich in den mit 100 μM CHP behandelten Kulturen bei einer Mehrheit der Zellen. Zu dem erschien der Zellrasen in diesen Kulturen weniger dicht, so dass Freiräume zwischen den einzelnen Zellen sichtbar waren. Im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen, war die Anzahl der veränderten Zellen in den mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen geringfügig niedriger. Wesentlich deutlicher erkennbar war der Unterschied der zytotoxischen Wirkung zwischen unbehandelten und vorinkubierten Zellen nach 240 Minuten erkennbar (Abb. 35). Die Zellen der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur zeigten sich in demselben Zustand wie 120 Minuten nach Beginn der CHP-Exposition. Nach wie vor war die Mehrheit der Zellen unverändert und somit vermutlich vital.

Im Gegensatz dazu waren in der unbehandelten Kultur nur noch die abgekugelten Zellen, mit der charakteristischen hellen Umrandung, sowie Zellen erkennbar, die als nicht mehr vital einzuordnen waren. Von diesen nicht mehr vitalen Zellen, waren nur noch die kondensierten Zellkerne innerhalb von „seifenblasenartigen“ Strukturen darstellbar. Die eigentlichen Zelleiber sind nicht mehr klar abgrenzbar, erschienen aufgetrieben, zum Teil aufgelöst.

Die Abbildung 37, zeigt solche, durch CHP veränderten Zellen, 360 Minuten nach Beginn der Peroxid-Exposition.



Abbildungen 37: Zellschädigung durch 100 μM CHP

Phasenkontrastmikroskopische Bilder (40-fache Objektivvergrößerung) einer C6-Zellkultur (keine Vorinkubation mit Natriumselenit) 360 Minuten nach Beginn der Exposition mit 100 μM CHP

Über den folgenden Zeitraum nahm die zytotoxische Wirkung von 100 μM CHP noch weiter zu. Ebenso trat der Unterschied zwischen der unbehandelten und der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur noch deutlicher hervor. Nach der 22-stündigen Expositionszeit (Abb.36) waren in der unbehandelten Kultur mikroskopisch keine vitalen Zellen mehr auffindbar. Sichtbar waren nun nur noch die sehr stark kondensierten Kerne, sowie schemenhaft im Hintergrund, die Reste des Zytoskeletts. Die zytotoxische Wirkung von 100 μM CHP fiel in den mit 1 μM Natriumselenit behandelten Kulturen wesentlich schwächer aus. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen fiel zwar auf, dass der Zellrasen deutlich aufgelockert und einige Zellen abgekugelt waren, aber die Mehrheit der Zellen stellte sich als vitale Zellen dar. Letale Zellen, wie sie in der unbehandelten Kultur sichtbar waren, waren nicht nachweisbar.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die Vorinkubation mit Natriumselenit die Zytotoxizität von 50 μM geringfügig, die Zytotoxizität von 100 μM ausgeprägt reduziert. Diese, auf die mikroskopische Beobachtung der 35 mm-Kulturen gestützte Aussage wird durch die Ergebnisse der im Anschluss an den Beobachtungszeitraum durchgeführten Proteinbestimmung bestätigt (Abb. 38).

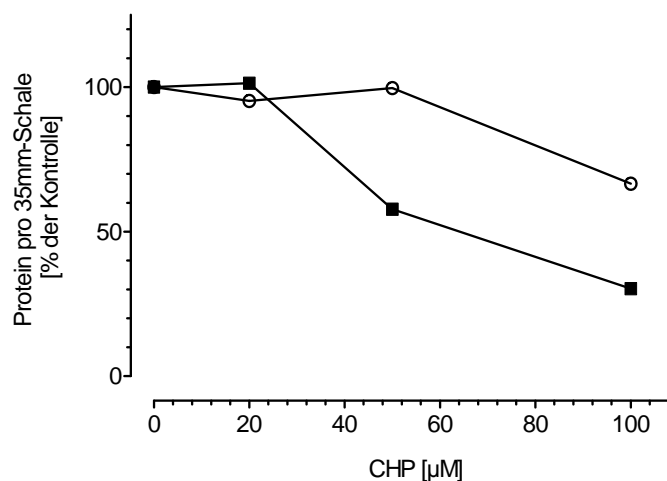


Abbildung 38: Einfluss von Natriumselenit auf die zytotoxische Wirkung von CHP in C6-Zellkulturen

A) Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von CHP in den Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit 1 μM Natriumselenit (○), welche nach der mikroskopischen Beobachtung über 22 Stunden aus den 35mm-Schalen ermittelt wurden. Auf der Abszisse sind die eingesetzten CHP-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Schalen (keine Peroxid-Exposition).

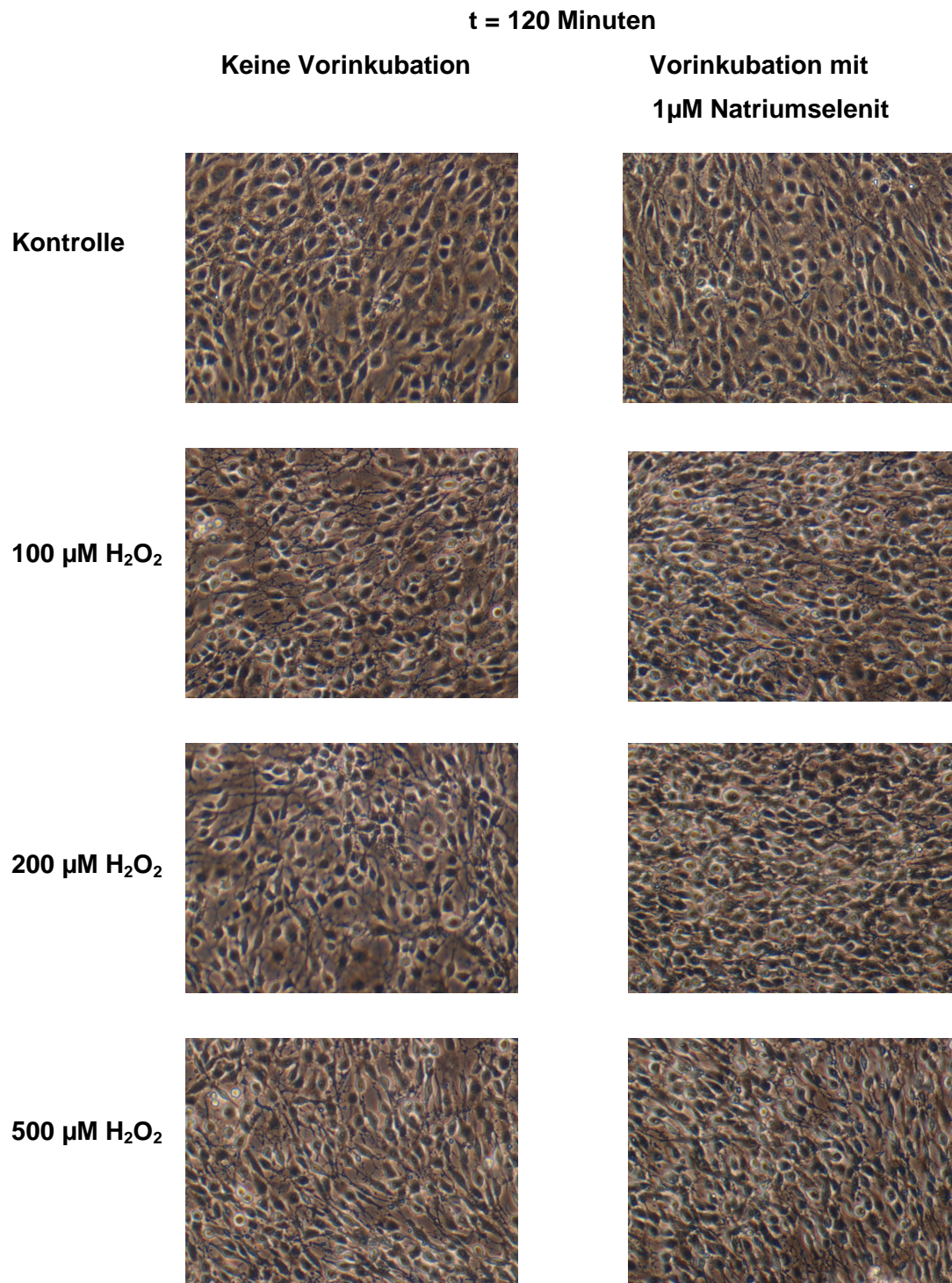
Es zeigte sich, dass die Exposition mit 20 μM CHP weder in der unbehandelten noch in der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur zu einer Reduktion des Proteingehalts führte. Dagegen führte die Exposition mit 50 μM CHP in der unbehandelten Kultur zu einer deutlichen Reduktion des Proteingehalts (56 % bezogen auf die Kontrollkultur), in der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur zeigte sich kein Abfall des Proteingehalts.

100 μM CHP führte in der unbehandelten Kultur zu einer Reduktion des Proteingehalts auf 30 % des Proteingehalts der Kontrollkultur. Der Proteingehalt der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur lag mit 65 % mehr als doppelt so hoch.

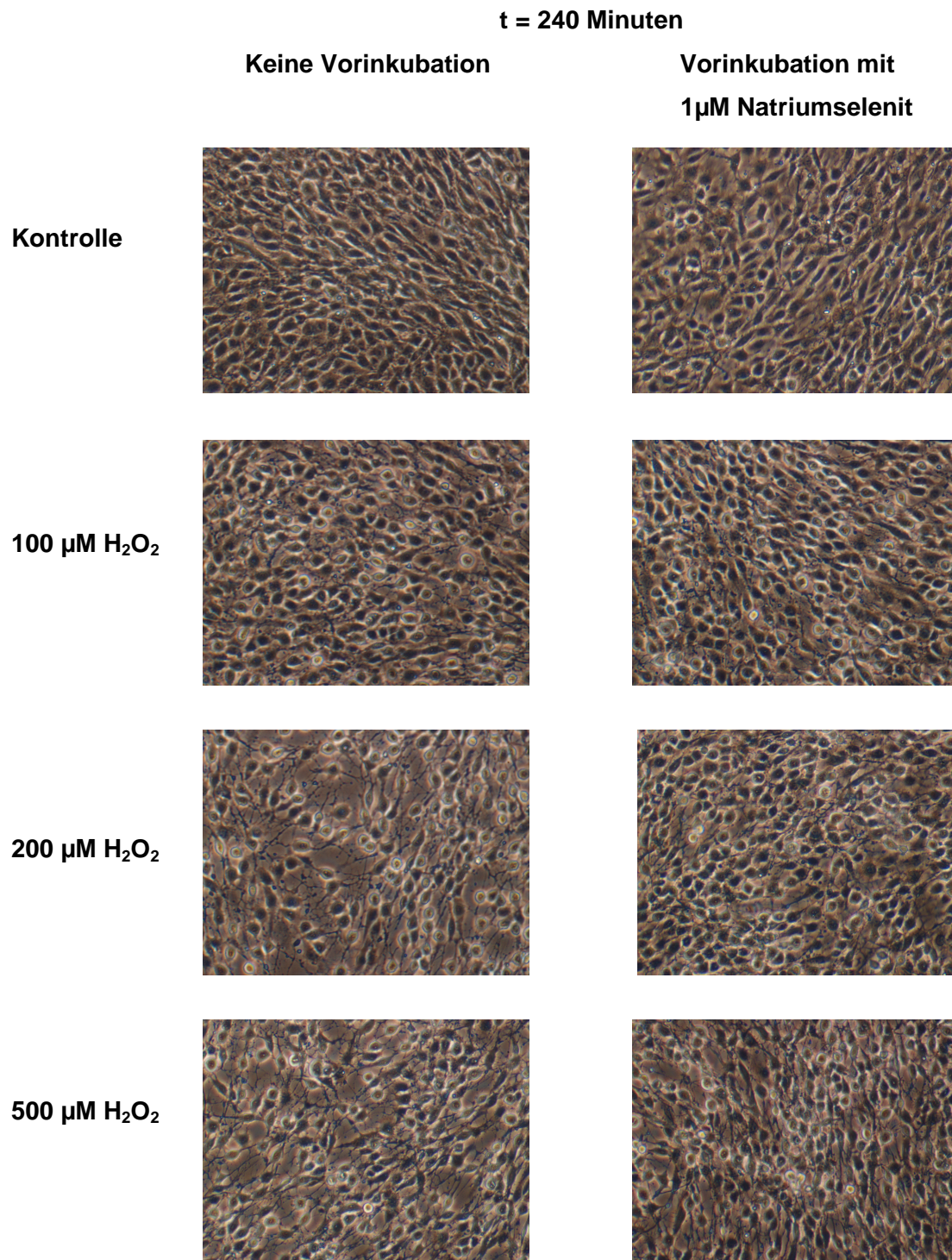
Zytotoxizität von H_2O_2

Auch in der Versuchsreihe zu H_2O_2 zeigten sowohl die unbehandelten als auch die mit Natriumselenit vorinkubierten Kontrollkulturen (keine H_2O_2 -Exposition), über den gesamten Beobachtungszeitraum ein vergleichbares Bild. Die Zellen waren in dieser Versuchsreihe sehr dicht gewachsen. Dies spiegelt sich auch in den bestimmten Proteinmengen wieder, in den unbehandelten Kulturen lag der Proteingehalt bei 609 $\mu\text{g}/\text{Schale}$, bei den vorinkubierten Zellen bei 535 $\mu\text{g}/\text{Schale}$.

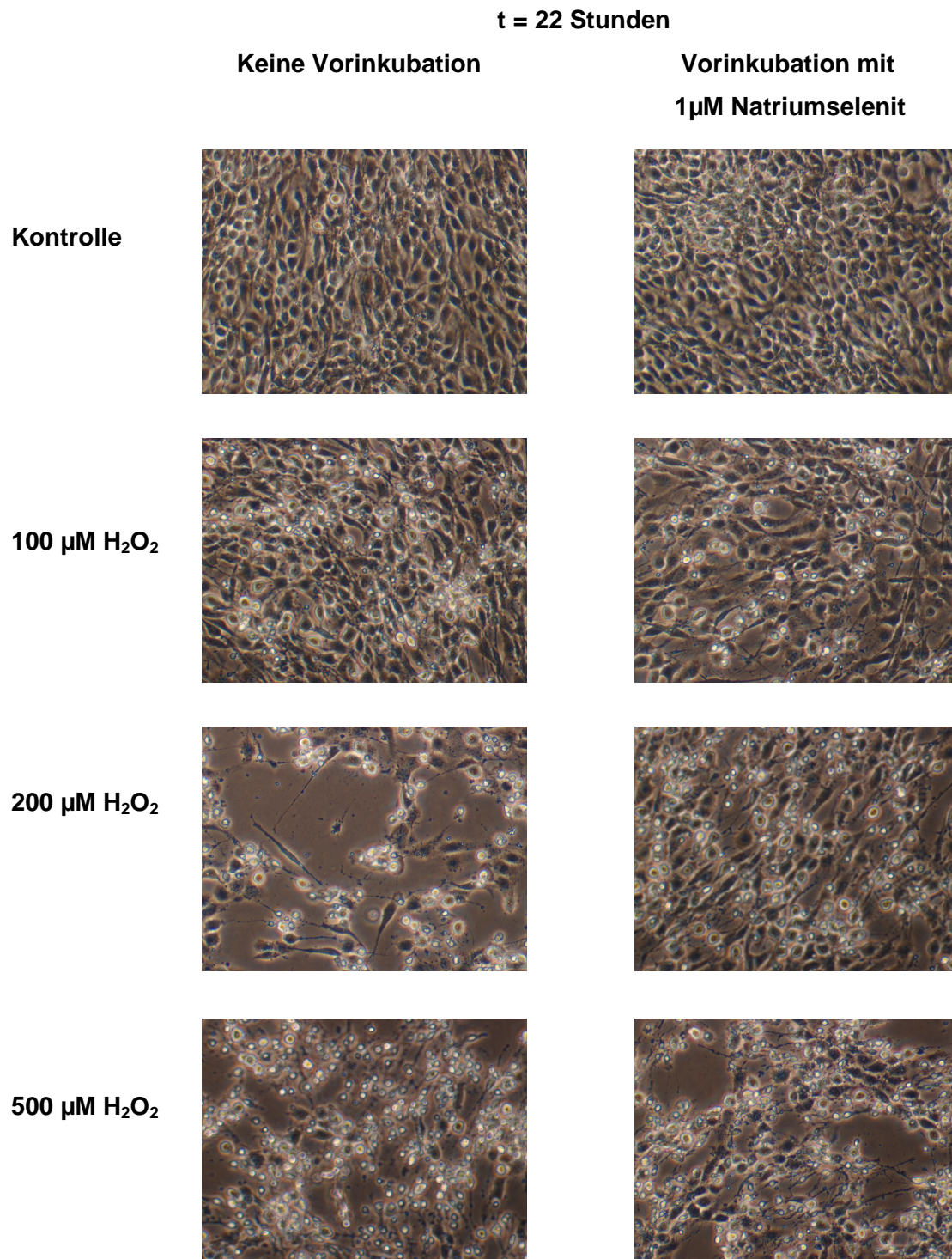
Die C6-Zellkulturen, je eine unbehandelte sowie eine mit Natriumselenit vorinkubierte, wurden mit 100 μM , 200 μM und 500 μM H_2O_2 behandelt und über einen Zeitraum von 22 Stunden mikroskopisch beobachtet. Die Abbildungen 39 – 41 zeigen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Kulturen zu den Zeitpunkten 120 Minuten, 240 Minuten sowie 22 Stunden nach Expositionsbeginn.



Abbildungen 39: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H₂O₂ in C6-Zellkulturen Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 120 Minuten nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen.



Abbildungen 40: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H₂O₂ in C6-Zellkulturen
Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 240 Minuten nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen.



Abbildungen 41: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H₂O₂ in C6-Zellkulturen Phasenkontrastmikroskopische Bilder (20-fache Objektivvergrößerung) von Kontrollkulturen (links) und mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen (rechts). 22 Stunden nach Beginn der Exposition gegenüber unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen.

Exposition mit 100 μM H_2O_2

Bereits innerhalb der ersten Stunde der Exposition konnte bei allen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung des Peroxids mikroskopisch beobachtet werden.

So konnte auch bei den Kulturen die mit nur 100 μM H_2O_2 , der niedrigsten eingesetzten H_2O_2 -Konzentration, behandelt wurden, eine Formveränderung der Zellen beobachtet werden. Anfangs fielen diese veränderten Zellen nur vereinzelt auf. Nach 120 Minuten der Exposition erschienen aber in etwa die Hälfte der Zellen, sowohl der mit Natriumselenit vorinkubierten als auch der unbehandelten Kultur, verändert (Abb.39). Die Zellen hatten sich abgekugelt und die charakteristischen Zellausläufer fehlten. Wiederum zeigte sich im phasenkontrastmikroskopischen Bild die helle Umrandung der Zellen, die nun nicht mehr flach am Boden der Kulturschale hafteten. Das Ausmaß der veränderten Zellen war in der unbehandelten und der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur gleich. Die restlichen Zellen erschienen als vitale Zellen, mit dem länglichen bis sternenförmigen Zellkörpern und den multiplen Zellausläufern. Auch die Dichte des Zellrasens war in etwa gleich und entsprach dem Bild der Kontrollkulturen.

Über den folgenden Beobachtungszeitraum blieb die Anzahl der abgekugelten Zellen konstant. Die Abbildung 40 zeigt die Aufnahmen der Zellen 240 Minuten nach Beginn der Exposition. Das Zellbild der Kulturen entspricht dem Bild, dass sich schon nach 120 Minuten beobachten ließ.

Im weiteren Verlauf der Beobachtung, konnte beobachtet werden, dass es bei den abgekugelten Zellen zu einer starken Kondensation des Zellkernes kam. Auffällig war hierbei, dass die betroffenen Zellen andere morphologische Charakteristika zeigten, als durch CHP geschädigten Zellen. Durch CHP geschädigten Zellen fallen sowohl durch die Kondensation des Zellkernes als auch durch die „seifenblasenartige“ Struktur die den Kern umgibt auf (Vgl. Abb. 37). Dagegen steht bei den durch H_2O_2 geschädigten Zellen die Kondensation des Zellkerns im Vordergrund. Die Zellkerne kondensieren sehr stark, nur noch sehr kleine „Zellkerntrümmer“ sind erkennbar. Die Zellkörper scheinen komplett aufgelöst zu sein.

Nach 22 Stunden konnte in den mit 100 μM H_2O_2 behandelten Kulturen eine Vielzahl solch unterschiedlich stark kondensierter Zellkerne beobachtet werden (Abb. 41). Dennoch war das Erscheinungsbild der Kultur vor allem durch vitale Zellen geprägt. Die Zelldichte erschien nur unwesentlich geringer als in den Kontrollkulturen. Auch zeigte sich zwischen den mit Natriumselenit und den unbehandelten Kulturen kein Unterschied im Ausmaß der Zellschädigung.

Exposition mit 200 μM H_2O_2

Anfangs zeigten die mit 200 μM H_2O_2 behandelten Kulturen ein Bild entsprechend den mit 100 μM H_2O_2 behandelten Kulturen. Wie in der Abbildung 39 erkennbar, fielen auch hier die wie oben beschriebenen, formveränderten Zellen auf. Der Umfang der Veränderung war in der unbehandelten und mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur gleich. Im Gegensatz zu den mit 100 μM H_2O_2 behandelten Kulturen nahm im Weiteren aber die Anzahl der mikroskopisch als geschädigten Zellen einzuordnenden Zellen zu. Dieser Effekt war vor allem in den unbehandelten Kulturen nachweisbar. Nach 240 Minuten (Abb. 40) zeigten sich in der unbehandelten Kultur kleine Freiräume zwischen den Zellen. Die Zelldichte der mit Natriumselenit behandelten Kultur erschien etwas höher.

In den folgenden Stunden konnte bei den geschädigten Zellen beider Kulturen die fortschreitende Kondensation der Zellkerne beobachtet werden. Zum Endpunkt der Beobachtung (Abb. 41) zeigten sich in beiden Kulturen eine Vielzahl an stark kondensierten Zellkernen und kleinste Zellkernbruchstücke. Die Anzahl der vitalen Zellen war in beiden Kulturen merklich reduziert und Freiräume zwischen den einzelnen Zellen deutlich erkennbar. Im Vergleich zu der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur war das Ausmaß der Schädigung in den unbehandelten Kulturen geringfügig stärker.

Exposition mit 500 μM H_2O_2

Die Exposition mit 500 μM H_2O_2 zeigte anfänglich keinen großen Unterschied zu dem Effekt der anderen H_2O_2 -Konzentrationen. Es zeigten sich auch hier, sowohl in der unbehandelten als auch in der mit Natriumselenit behandelten Kultur, die wie oben beschriebenen, formveränderten Zellen. Nach 120 Minuten (Abb. 39) waren in etwa genauso viele Zellen geschädigt wie in den mit 100 und 200 μM H_2O_2 behandelten Kulturen.

Über die nächsten Stunden nahm die Anzahl an mikroskopisch erkennbaren, geschädigten Zellen in beiden Kulturen zu. Erneut zeigte sich, dass das Ausmaß der Schädigung in der unbehandelten Kultur geringfügig stärker ausgeprägt war. Nach 240 Minuten stellte sich der Zellrasen in der unbehandelten Kultur aufgelockert dar, wogegen der Zellrasen in der mit Natriumselenit vorinkubierten Kultur eine Dichte entsprechend der Kontrollkultur aufwies. Über den folgenden Zeitraum zeigten die geschädigten Zellen beider Kulturen eine zunehmende Kondensation der Zellkerne. Nach 22 Stunden (Abb. 41) war die Mehrzahl der Zellen nicht mehr vital. Hier zeigten sich im mikroskopischen Bild wiederum nur noch die

Zellkerne bzw. Zellkernreste. In der unbehandelten Kultur waren nur noch ganz vereinzelt vitale Zellen, erkennbar an der charakteristischen Form des Zellkörper und der Zellfortsätze, auffindbar. Die Zelldichte in der Kultur war auffällig reduziert. Die mit Natriumselenit behandelte Kultur wies eine etwas höhere Anzahl von vitalen Zellen auf. Allerdings war auch in dieser Kultur die Mehrheit der Zellen stark geschädigt und/oder nicht mehr als Zellen zu erkennen.

Bei der mikroskopischen Beobachtung konnte demnach eine veränderte Reaktion von den mit Natriumselenit vorinkubierten Zellen auf die H_2O_2 -Exposition nachgewiesen werden. Allerdings war diese zum einem nur bei den höheren Konzentrationen und zum anderem auch nur sehr schwach nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich mit der im Anschluss durchgeführten Proteinbestimmung (Abb. 42). Die Exposition mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 führte zu einem nahe zu identischem Abfall des Zellproteins in der unbehandelten und der im Vorfeld mit Natriumselenit behandelten Kultur. Bei den höheren Konzentrationen war der Proteinverlust in den unbehandelten Kulturen etwas ausgeprägter, als es in den mit Natriumselenit vorinkubierten Kulturen der Fall war. Insgesamt war dieser Effekt aber weniger stark ausgeprägt als es bei der Exposition mit CHP.

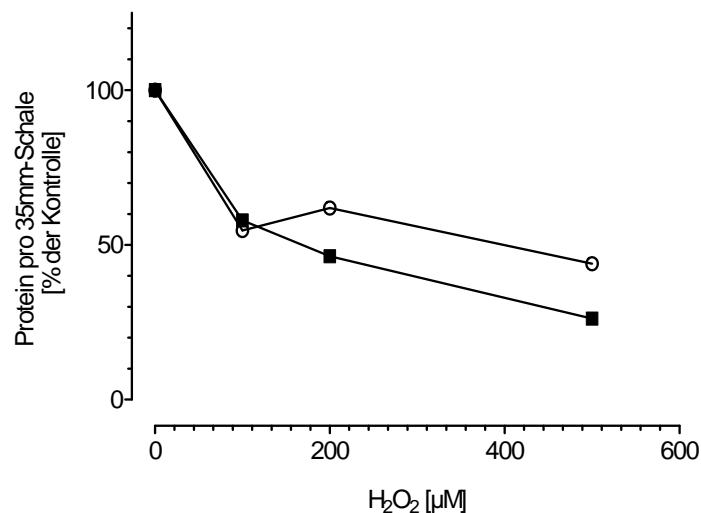


Abbildung 42: Einfluss von Natriumselenit auf die Zytotoxizität von H_2O_2 in C6-Zellkulturen

A) Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 in den Kontrollkulturen (■) und nach Vorinkubation mit $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit (○), welche nach der mikroskopischen Beobachtung über 22 Stunden aus den 35mm-Schalen ermittelt wurden.

Auf der Abszisse sind die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate zeigt den Proteingehalt in Prozent der Kontroll-Schalen (keine H_2O_2 -Exposition).

4. Diskussion

4.1. Hintergrund und Fragestellung

Zellkulturen werden für in vitro Untersuchungen zu oxidativen Stress verwendet. Für diese Untersuchungen wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelllinien eingesetzt, die sich zum Teil erheblich in der Aktivität ihrer Schutzsysteme voneinander unterscheiden (Makino et al., 2008, Yang et al. 2006, Dringen et al., 2005). Zu dem beeinflussen auch die Kultivierungsbedingungen, wie unter anderem die Wahl des Kulturmediums, die Menge an eingesetztem tierischen Serum und die eingesetzte Zellzahl, die Aktivität der Schutzsysteme und somit zuletzt die Empfindlichkeit der Kulturen gegenüber oxidativem Stress (Brenner et al., 2010). Durch Änderungen der Kultivierungsbedingungen kann somit nachhaltig das Verhalten der Kulturen gegenüber oxidativen Stressoren beeinflusst werden (Brenner et al., 2010).

Es stellt sich demnach die Frage nach der generellen Vergleichbarkeit von Studienergebnisse zu oxidativen Stress, wenn diese anhand von unterschiedlichen Zelllinien und/oder unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gewonnen werden. Um diese Frage ausreichend beantworten zu können, ist es von entscheidender Wichtigkeit, die Bedeutung der physiologischen Schutzsysteme für die Zytotoxizität von Peroxiden weitergehend zu ermitteln.

Sowohl anorganische wie auch organische Peroxide vermitteln ihre zytotoxische Wirkung in Zellen über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Zur Vermeidung der ROS-vermittelten Schäden stehen Zellen unterschiedliche Schutzsysteme zur Verfügung. Eine zentrale Stellung innerhalb der Schutzsysteme nimmt das Glutathion-System ein (siehe Abschnitt 1.1.2). Brenner et al. (2010) konnten zeigen, dass der Gehalt an Glutathion (GSH) sowie die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen unterschiedlich hoch sind.

Während anorganische Peroxide wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowohl über die Katalase als auch das Glutathion-System abgebaut werden, ist für die Entgiftung organischer Peroxide wie Cumolhydroperoxid (CHP) vorwiegend das Glutathion-System verantwortlich (vergleiche Abschnitt 1.1.2)

In der vorliegenden Arbeit wurde an Hand von C6-Astrogloma-Zellkulturen untersucht, in wie fern eine gezielte Beeinflussung der physiologischen Schutzsysteme durch Vorinkubation mit

- dem Katalase-Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT)
- dem Inhibitor der Glutathionsynthese Buthionin-Sulfoximin (BSO)
- dem Glutathion-Prekursor Cystin
- dem Glutathionperoxidase-Prekursor Selen (Natriumselenit)

möglich ist und welche Auswirkungen solch eine Manipulation auf die zytotoxische Potenz von Peroxiden hat.

4.2 3-Amino-1,2,4-triazol

3-Amino-1,2,4-triazol (3AT), welches zur Gruppe der Triazole gehört, wird kommerziell hauptsächlich in der Landwirtschaft als Herbizid eingesetzt, wobei es in Deutschland keine Zulassung für 3AT als Pflanzenschutzmittel gibt. In Tierversuchen konnte eine karzinogene Wirkung von 3AT nachgewiesen werden (National Library of Medicine, Hazardous Substances Data Base, 08.05.2010). In vitro wird 3AT zur Hemmung der Katalase eingesetzt. Dabei kommt es durch die Bindung von 3AT am aktiven Zentrum der Katalase zur irreversiblen Hemmung des Enzyms (Halliwell & Gutteridge, 2007).

In den eingesetzten Konzentrationen wirkt 3AT selbst nicht zytotoxisch. Eine zweistündige Vorinkubation der C6-Kulturen mit 10 mM 3AT führte zu keinem relevanten Proteinverlust. Auch in anderen Arbeiten (Smith et al., 2007, Liddell et al., 2004) zeigte sich, dass eine Behandlung mit 10 mM keinen zytotoxischen Effekt hat.

4.2.1 Einfluss auf die Katalase-Aktivität

In C6-Kulturen, die mit 10 mM 3AT vorinkubiert wurden, konnte eine komplette Hemmung der Katalase-Aktivität beobachtet werden. Die Aktivität in den Kontrollkulturen lag bei $1,5 \pm 0,2$ k/mg Zellprotein [min^{-1}] bzw. $14,4 \pm 2,5$ Units/mg Zellprotein.

Diese aktuell bestimmten Werte stimmen mit den von Brenner et al. (2010) in C6-Astrogliazellen gemessenen Aktivitäten überein. Bei C6-Astrogliazellen, welche in DMEM-Medium (5 % FBS) kultiviert wurden, also unter denselben Kultivierungsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit, lag die Aktivität der Katalase bei $1,2 \pm 0,3$ k/mg Zellprotein [min^{-1}] bzw. $10,9 \pm 2,4$ Units/mg Zellprotein. In einem ähnlichen Bereich liegt mit $1,31 \pm 0,04$

k/mg Zellprotein [min^{-1}] auch die von Dringen und Hamprecht (1997) in primären Ratten-Astrozyten bestimmte Katalase-Aktivität.

Smith et al. (2007) konnten allerdings zeigen, dass die Katalase-Aktivität in Ratten-Gliomzelllinien (C6, 36B10, RG2, RT2) generell höher liegt als in primären Ratten-Astrozyten. Hierbei wird davon ausgegangen, dass durch die höhere antioxidative Aktivität diese Tumorzellen besonders resistent sind.

Die Inhibition der Katalase erfolgt dosisabhängig (Smith et al, 2007, Michiels & Remacle, 1988), wobei 10mM 3AT, wie aktuell in C6-Zellkulturen eingesetzt, auch in primär kultivierten Ratten-Astrozyten zu einer kompletten Hemmung der Katalase führt (Dringen et al. 1997, Liddle et al. 2004).

In anderen Zellen, wie humanen Fibrozyten (Zelllinie WI-38, MICHIELS & REMACLE, 1988) und Ratten-Gliomzellen (Zelllinie 36B10, Smith et al. 2007), konnte ebenfalls die Aktivität der Katalase durch die Vorinkubation mit 3AT stark reduziert werden.

4.2.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

C6-Zellkulturen die mit 3AT vorbehandelt wurden, zeigten sich empfindlicher gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Peroxiden, vor allem von H_2O_2 .

Während in den unbehandelten Zellen eine EC_{50} -Wert von $140 \pm 31 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ erreicht wurde, lag dieser in den mit 3AT vorbehandelten Zellen mit $56 \pm 8,8 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ signifikant niedriger (siehe Abb. 19).

Auch die zytotoxische Wirkung von CHP wurde durch die Vorinkubation mit 3AT verstärkt, wenn auch nur in geringerem Ausmaß. Durch die Vorbehandlung mit 3AT wurde der EC_{50} -Wert auf $27,7 \pm 2,1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ gesenkt, wogegen der EC_{50} -Wert in den Kontrollkulturen bei $30,6 \pm 1,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ lag.

H_2O_2 wird sowohl über das Glutathion-System als auch über die Katalase abgebaut (Dringen et al., 2005, Halliwell & Gutteridge, 2007). Besonders bei hohen Konzentrationen von H_2O_2 , wird dieses maßgeblich von der diffusionsgesteuerten Katalase abgebaut (Aebi, 1984, Dringen et al., 2005). Es ist daher nicht erstaunlich, dass durch den kompletten Wegfall der Katalase-Aktivität, die zytotoxische H_2O_2 -Wirkung verstärkt wird. Auch Smith et al. (2007) konnten eine mehr als zweifache Steigerung der Zytotoxizität von H_2O_2 in 36B10-Rattengliomzellen nach der Vorbehandlung mit 3AT beobachten.

Die verstärkte zytotoxische Wirkung von H_2O_2 nach Behandlung mit 3AT, geht mit einer reduzierten Entgiftungskapazität der Zellen einher. Jess et al. (2007) konnten für C6-Zellen eine signifikante Abnahme der H_2O_2 -Eliminationsgeschwindigkeit nach Behandlung mit 10

mM 3AT nachweisen. Die Reduktion in der Elimination von H_2O_2 konnte auch für andere Zellen, wie primären Ratten-Astrozyten, nachgewiesen werden (Dringen et al., 1997, Liddell et al., 2004).

Dennoch wird ein Teil der Entgiftung, durch die unbeeinflusste Funktion des Glutathion-Systems, aufrecht erhalten. Durch eine zusätzliche Hemmung des Glutathion-Systems, wie bei DRINGEN et al. (1997) mittels Mercaptosuccinat, welches die GPx hemmt, konnte eine weitere Abnahme der H_2O_2 -Eliminationsrate beobachtet werden. Auch in dieser Beobachtung bestätigt sich die Annahme, dass H_2O_2 über zwei voneinander unabhängigen Systemen abgebaut wird.

Dagegen wird postuliert, dass der Abbau von organischen Peroxiden, wie CHP, wesentlich über das Glutathion-System erfolgt (Young & Woodside, 2001). Somit war zunächst die Beobachtung eines, wenn auch nur leicht, erhöhten zytotoxischen Effekts von CHP überraschend. In der Literatur finden sich keine Aussagen zum Einfluss von 3AT auf die zytotoxische Wirkung von organischen Peroxiden. Untersuchungen zur Elimination von organischen Peroxiden, zeigen allerdings keine Abnahme der Eliminationsrate nach Vorbehandlung mit 3AT (Kusmaul et al., 1999, Liddell et al. 2006). Allerdings zeigten Jess et al. (2007), dass die Elimination von CHP in C6-Astrogliazellen durch eine Vorinkubation mit 3AT leicht gesenkt wird.

Offen bleibt hierbei die Frage, ob es sich bei diesen Beobachtungen um einen durch die Hemmung der Katalase hervorgerufenen Effekt handelt. Neben den beschriebenen Systemen spielen auch noch weitere antioxidativ wirksame Enzyme, wie die Gruppe der cysteinhaltigen Peroxiredoxine, eine wichtige Rolle sowohl für den Abbau anorganischer als auch organischer Peroxide (Kalinina et al., 2008). Untersuchungen zu einem etwaigen Einfluss von 3AT auf diese Schutzsysteme stehen bisher noch aus.

4.3 Buthionin-Sulfoximin

Buthionin-Sulfoximin (BSO), eine synthetische Aminosäure, verhindert den ersten Schritt der Glutathionsynthese, bei dem Glutamat mit Cystein verknüpft wird, durch Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase. Die Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase durch BSO ist sehr spezifisch und irreversibel (Anderson, 1998, Michiels & Remacle, 1988, Liddell et al., 2004)

Bei alleiniger Vorinkubation mit 0,5 mM BSO über 24 Stunden, zeigte sich für BSO in C6-Zellen keine zytotoxische Wirkung.

4.3.1 Einfluss auf den Glutathiongehalt

BSO reduziert in C6-Zellen deutlich den GSH-Gehalt (von $19,2 \pm 1,7$ nmol GSH/mg Zellprotein auf 0,5mM BSO: $2,2 \pm 0,6$ nmol GSH/mg Zellprotein (siehe Abb. 20).

Eine BSO-vermittelte Reduktion des Glutathiongehalts konnte auch in verschiedenen anderen Zelllinien nachgewiesen werden. In humanen Fibrozyten führte die Vorinkubation mit 10 μ M BSO zu einer Reduktion des GSH-Gehalts von über 50 %, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen (Michiels & Remacle, 1988). In humanen Neuroblastoma-Zellen konnte mittels 1mM BSO, der GSH-Gehalt sogar unterhalb der Nachweisgrenze gesenkt werden (Marengo et al., 2008). Eine konzentrationsabhängige Wirkung von BSO liegt anhand dieser Werte nahe. Auch bei in-vivo Versuchen an Nagern, konnte durch die Applikation von BSO der GSH-Gehalt um über 80 %, bezogen auf die Kontrollen, gesenkt werden (Anderson, 1998).

Erwähnenswert ist, dass auch der in den Kontrollkulturen bestimmte GSH-Gehalt mit 19,2 nmol GSH/mg Zellprotein im Vergleich mit in der Literatur zu findenden Werten niedrig liegt (siehe Tabelle 11, Brenner, 2009).

4.3.2 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Sowohl für CHP als auch für H_2O_2 konnte nachgewiesen werden, dass die Vorinkubation mit BSO und die damit einhergehende GSH-Depletion, zu einer gesteigerten Zytotoxizität führt (siehe Abb. 22 und 23).

Aufgrund von sehr unterschiedlichen Proteingehalten in den Zellkulturen dieser Versuchsreihe, die auf sehr unterschiedliche Zellzahlen hinweisen, zeigten die ermittelten EC_{50} -Werte eine große Spannbreite auf. Die zytotoxische Wirkung von Peroxiden ist unter anderem auch abhängig von der Zellanzahl (Gülden et al., 2010). Mit Anstieg des Proteingehalts kann so ebenfalls ein Anstieg der EC_{50} -Werte beobachtet werden (siehe Tabelle 6 und 7).

Davon unabhängig stellte sich aber eine BSO-abhängige gesteigerte Zytotoxizität der Peroxide dar. Diese Zunahme der Zytotoxizität ist auch für andere Zelllinien berichtet worden. An primären Ratten-Astrozyten konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation mit BSO sowohl zu einer verminderten Elimination von CHP führt als auch zu einer verstärkten zytotoxischen Wirkung führt (Kussmaul et al. 1999, Liddell et al., 2006). So konnten Kussmaul et al. (1999) zeigen, dass sich bei Vorinkubation mit 0,5 mM BSO die Halbwertszeit

von CHP im Medium mehr als verfünffacht (Kontrollen: 10,6 Minuten, 0,5mM BSO: 58,7 Minuten)

Auch für H_2O_2 konnte gezeigt werden, dass BSO zu einer verminderten Elimination und einer gesteigerten Zytotoxizität führt (Dringen et al. 1997, Liddell et al. 2004). Während allerdings diese Effekte für CHP sehr deutlich ausfallen, sind sie bezüglich H_2O_2 schwächer ausgeprägt. So zeigten Liddell et al. (2004), dass die Halbwertszeit für H_2O_2 in primären Rattenastrozyten-Kulturen durch die Vorinkubation mit BSO lediglich von 4 Minuten auf 5 Minuten gesteigert wird.

Die Beobachtung durch BSO veränderter Eliminationsraten wurde auch für C6-Astrogliazellen gemacht. Die Vorinkubation von C6-Astrogliazellen mit BSO führt vor allem zu einer verlangsamten Elimination von CHP, in geringerem Maß auch von H_2O_2 (Jess et al., 2007). Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus den bereits oben beschriebenen, unterschiedlichen Beiträgen die die Katalase und das Glutathion-Systems an der Entgiftung von organischen und anorganischen Peroxiden leisten.

4.4 Cystin

Die Syntheserate von Glutathion ist abhängig von der intrazellulären Verfügbarkeit von Glutamat, Glycin und Cystein. Für die meisten Zelltypen stellt dabei die begrenzte Verfügbarkeit der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein den limitierenden Faktor der Glutathionsynthese dar (Dringen & Hirrlinger, 2003, Anderson, 1998, Kranich et al., 1996). Cystin, das Oxidationsprodukt von zwei Cysteinresten, kann über einen Cystin/Glutamat-Antiporter in Zellen aufgenommen werden und intrazellulär zu Cystein reduziert werden (Kato et al., 1992). Cystein kann im Folgenden für die Synthese von Glutathion genutzt werden.

4.4.1 Einfluss auf den Glutathiongehalt und die Zytotoxizität von Peroxiden

Eine Vorinkubation mit Cystin, als Prekursor von Glutathion, wurde in Erwartung einer möglichen Steigerung der GSH-Konzentration durchgeführt. Sagara et al. (1996) konnten durch eine Vorinkubation mit 0,5 mM Cystin eine leichte Erhöhung des GSH-Gehalts in primären Ratten-Astrozyten erzielen.

Dagegen führte eine Vorinkubation von C6-Astrogliazellen mit 0,5 mM Cystin über 72 Stunden zu keiner Veränderung des GSH-Gehalts und zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber Peroxiden. Als Erklärung für diese Beobachtung kommen verschiedenen Ansätze in Betracht.

Zu einem ist es möglich, dass die Zellen unter den aktuellen Kultivierungsbedingungen ausreichend mit Cystin versorgt werden. DMEM-Medium enthält, nach Aussage des Herstellers c.c.pro, 0,2 mM Cystin (62,57 mg/l) (c.c.pro: Dulbecco's Mod. Eagle Medium, <http://www.c-c-pro.com/pulvmed/pm13.pdf>, Stand: 12.12.2010). Menschliches Plasma enthält dagegen nur ca. 40-50 µM Cystin. Genau Angaben zu Cystin-Normwerten in Ratten-Plasma lassen sich in der Literatur bisher nicht finden, so dass hier keine genaue Einordnung des Versorgungsstatus von C6-Zellen mit Cystin gemacht werden kann.

Weiterhin ist auch zu berücksichtigen, dass nicht sichergestellt ist, in wie fern das zusätzlich applizierte Cystin überhaupt in die C6-Zellen aufgenommen wird. Die Aufnahmefähigkeit für Cystin variiert zwischen unterschiedlichen Zellarten (Kranich et al., 1996)

Für Zellkulturen mit primär kultivierten Ratten-Neuronen, konnte gezeigt werden, dass diese nicht in der Lage sind, Cystin in dem Maße aufzunehmen, wie es für eine maximale GSH-Syntheserate notwendig ist. Dagegen scheint es primäre Astrozyten wesentlich leichter zu fallen, Cystin aufzunehmen (Kranich et al., 1996). In C6-Astrogliazellen wird Cystin mit Hilfe eines Cystin-Glutamat-Antiporters aufgenommen (Kato et al., 1992)

Die Transportfähigkeit über den Cystin-Glutamat-Antiporter ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Beispielsweise wurde gezeigt, dass sie unter der Einwirkung von ROS verstärkt ist (Sagara et al., 1996), wogegen eine hohe extrazelluläre Konzentration von Glutamat die Aufnahme von Cystin hemmt (Kato et al., 1992). Eine Aussage über die unter den aktuellen Kulturbedingungen vorliegende Transportfähigkeit der C6-Zellen kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht getroffen werden. Somit ist es unklar, inwiefern das zusätzlich hinzugefügte Cystin wirklich in die Zellen gelangt und somit zur Synthese von GSH zu Verfügung steht.

Letztlich ist es auch so, dass die GSH-Synthese nicht alleinig über das Vorhandensein von Cystin, bzw. Cystein, reguliert ist. So muss auch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit den Aminosäuren Glutamat und Glycin gesichert sein.

Während für die meisten Zellarten davon ausgegangen wird, dass das begrenzte Vorhandensein von Cystein den limitierenden Faktor der GSH- Synthese darstellt, limitiert in Astroglia-reichen Zellkulturen Glutamat die GSH-Synthese (KRANICH, 1996).

Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zelllinie handelt es sich um eine Astrogliazelllinie, welche aus einem primären Rattenhirntumor gewonnen wurden. Wenn

auch es sich hierbei um dysplastisch veränderte Zellen handelt, besteht die Nähe zu den ursprünglichen Gliazellen. Auch bei C6-Zellen ist es somit möglich, dass das Angebot an Glutamat nicht ausreicht, um eine Erhöhung von GSH zu zulassen.

Überdies sind sowohl die γ -Glutamylcystein-Synthetase als auch die Glutathion-Synthase, welche die GSH-Bildung katalysieren, ATP-abhängige Enzyme und damit abhängig von einer suffizienten Energieversorgung der Zellen.

Der Aktivitätsgrad beider Enzyme wird darüber hinaus über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert (Anderson, 1998, Dringen et al., 2000). Dies bedeutet, dass hohe Konzentrationen von GSH zu einer verminderten Syntheserate führen. Entsprechend ist es möglich, dass die in den C6-Astrogliazellen vorhandenen GSH-Spiegel eine maximale Auslastung der Syntheseleistung nicht zu lassen.

4.5 Selen

Selen gehört in tierischen Organismen zu den essentiellen Spurenelementen. Dies bedeutet, dass Selen für den Organismus lebensnotwendig ist und über die Nahrung dem Organismus zugefügt werden muss.

In tierischen Geweben kommt Selen vor allem als Bestandteil von Proteinen vor, in denen es in Form der Aminosäuren Selenomethionin (SeMet) und Selenocystein (Sec) beinhaltet ist. SeMet wird unspezifisch anstelle von Methionin in Proteinen eingebaut und hat keinen bekannten Einfluss auf die Funktion der betroffenen Proteine. Dagegen wird Sec, welches auch als 21. proteinogene Aminosäure bezeichnet wird, gezielt in Proteine eingebaut. Bei der Synthese dieser Selenoproteine wird Sec durch das Codon UGA codiert, welches ansonsten als Stop-Codon fungiert. Die mRNA von Selenoproteinen enthält eine Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS), die eine Unterscheidung von Stop-UGA und Sec-codierenden UGA ermöglicht (Low & Berry, 1996, Hatfield & Glasyshev, 2002).

In Form von Sec ist Selen Bestandteil von den als Selenoproteinen bezeichneten Proteinen. 1973 wurde mit der zytosolischen Glutathionperoxidase (cGPx) das erste Selenoprotein entdeckt. Seitdem wurden eine Reihe weitere Selenoproteinen identifiziert, wobei die Funktion einiger Proteine weiterhin unklar bleibt. Mittlerweile sind über 25 verschiedene Selenoproteine beschrieben worden (Selenius et al., 2008). Wichtige Selenoproteine stellen neben der Gruppe der Glutathionperoxidasen, Deiodasen und Thioredoxin-Reduktasen dar. Selenhaltige Deiodasen spielen bei der Aktivierung und Inaktivierung von

Schilddrüsenhormonen eine Rolle, Thioredoxin-Reduktasen bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung (Hattfield & Gladyshev, 1999, Kryukov et al., 2003).

Der wichtigen Rolle von Selen bei der Funktion diverser Enzyme entsprechend, wird ein Selenmangel mit unterschiedlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Bei verschiedenen Säugetieren konnten unter einer Selenmangelernährung Muskelerkrankungen und Fertilitätsstörungen beobachtet werden. Beim Menschen sind bekannte Selenmangelkrankungen die Keshan-Krankheit, eine vor allem in extrem selenarmen Regionen Chinas auftretende Kardiomyopathie sowie eine als Kaschin-Beck-Krankheit bezeichnete nutritive Gelenkknorpeldegeneration. Zu dem wird eine niedrige Selenkonzentration mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. So wurden niedrige Selenplasmakonzentrationen unter anderem bei AIDS- und Morbus Crohn-Patienten beobachtet. Des Weiteren wird ein Selenmangel auch mit einer erhöhten Krebsinzidenz in Verbindung gebracht (Bedwal et al, 1993).

Die Beobachtung eines Selenmangels in Zusammenhang mit diversen Erkrankungen sowie der vermutete Einfluss von Selenoproteinen auf den oxidativen Status des Organismus hat in den letzten Jahren zu vermehrten Untersuchungen zur Auswirkung einer Selensupplementierung geführt. Hierzu wurden sowohl eine Reihe klinischer als auch zellexperimenteller Studien durchgeführt. Die Bedeutung von Selen bei der Prävention von Krebserkrankungen wurde in verschiedenen Studien untersucht. In Tiermodellen konnte durch Selensupplementation eine Krebsprävention erreicht werden (Patrick, 2004). Clark et al. (1996) konnten in einer großangelegten Studie mit menschlichen Probanden zeigen, dass die Inzidenz und Mortalität von Bronchial-, Kolorektal- und Prostatakarzinomen durch Selensupplementierung reduziert wurde. Allerdings konnten die Ergebnisse bezüglich der Inzidenz und Sterblichkeit von Prostatakarzinomen, sowie das Gesamtaufreten von Krebserkrankungen in der von Lipmann et al. durchgeführten SELECT-Studie (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) nicht bestätigt werden. Die Studie mit über 35.000 Probanden wurde im Jahr 2008 vorzeitig abgebrochen, da sich abzeichnete, dass die tägliche Gabe von Selen und/oder Vitamin E keinen Einfluss auf die Krebsinzidenz hatte. Der protektive Effekt einer Selensupplementierung in vivo bleibt so bisher ungeklärt.

In vitro sind ebenfalls zahlreiche Studien zur präventiven Wirkung von Selen gegenüber einer Tumorentstehung durchgeführt worden. Zusätzlich wird an Hand von Zellkulturen auch die antiproliferative und zytotoxische Wirkung von Selen untersucht (VALDIGLESIAS et al., 2010, KRÁLOVÁ et al., 2009). Hierbei wird unter anderem der Fragestellung nach einem möglichen Einsatz von Selen in der Behandlung von Krebserkrankungen nachgegangen (SELENIUS et al., 2008).

4.5.1 Selengehalt in Kulturmedien

Ein zentraler Drehpunkt im Glutathion-System ist die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx), welche den Abbau von Peroxiden vermittelt. Glutathion wird bei diesem Prozess als Cofaktor benötigt. Zur Synthese der GPx wird Selen benötigt.

Die in der Zellkultur häufig verwendeten Basismedien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Ham's F-10 enthalten selber kein Selen. Die Zellkulturen werden somit alleinig über die den Wachstumsmedien hinzugefügten tierischen Seren mit Selen versorgt. In den letzten Jahren kam der Verdacht auf, dass konventionelle Kulturmedien die Zellen nicht ausreichend mit Selen versorgen und somit die antioxidative Abwehr dieser Zellen unphysiologisch vermindert ist (Leist et al., 1996).

Veränderungen in den Kultivierungsbedingungen, vor allem eine Reduktion des Anteils an tierischen Seren in den Kulturmedien, haben zum Teil erhebliche Auswirkungen auf den oxidativen Status von C6-Zellen und der Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Peroxiden (Brenner et al., 2010). Anlässlich dieser Beobachtungen besteht der Verdacht, dass die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden auf dem Boden einer Selenunterversorgung entsteht.

Um diese vermutete Unterversorgung der Zellen zu quantifizieren, wurde der Selengehalt in den eingesetzten tierischen Seren bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass der Selengehalt von fötalem Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) in dem von c.c.pro vertriebenen Produkt bei 0,06 μM Selen und bei den von Biochrom vertriebenen Produkten bei 0,16 μM Selen liegt. Somit kann festgehalten werden, dass in den von verschiedenen Anbietern vertriebenen FBS der Selengehalt stark voneinander abweicht. Auch in der Literatur finden sich Daten, die zeigen, dass der Selengehalt in FBS stark variieren kann. Leist et al. (1996) ermittelten in den von unterschiedlichen Anbietern bezogenen fötalen Rinderseren deutlich voneinander abweichende Selenkonzentrationen zwischen 0,067 und 0,45 μM Selen.

Es zeigte sich ebenfalls, dass der Selengehalt in FBS deutlich unter 1 μM liegt. Auch Sandström et al. (1987) stellte einen vergleichbar niedrigen Selengehalt in FBS fest, welcher im Mittel bei 0,28 μM Selen lag.

Eine Untersuchung des Selengehalts in Pferdeserum (Horse Serum, HS) ist bisher nicht dokumentiert. Überraschender Weise liegt der gemessene mittlere Selengehalt in Pferdeserum mit 3,4 μM deutlich über den dokumentierten Selengehalten in FBS.

Bezogen auf die spezielle Fragestellung, inwiefern Veränderungen bei Wachstumsmedien, wie die Umstellung im Jahr 2006 in der Abteilung für Zellkultur im Institut für Toxikologie und

Pharmakologie für Naturwissenschaftler Kiel (siehe Abschnitt 1.2), einen Selenmangel hervorgerufen hat, ließ sich zeigen, dass der Selengehalt in den Wachstumsmedien bis zum Jahr 2006 (Ham's F-10, 2,5 % FBS, 15 % HS) bei 0,51 μM Selen und unter den neu eingeführten Bedingungen (DMEM, 5 % FBS von Biochrom) bei nur noch 0,01 μM liegt.

Allerdings ist die Einordnung, inwiefern es sich bei diesen niedrigen Konzentrationen um eine wirkliche Selenunterversorgung handelt oder diese als Normvarianten anzusehen sind, nicht eindeutig möglich. Bisher gibt es keine übereinstimmende Meinung zu den als physiologisch zu betrachtenden Serumselengehalten in Labortieren (Leist et al, 1996).

Kabirov et al. (2007) ermittelten Selenkonzentrationen im Plasma von Ratten. Dabei lag der Selengehalt bei 8 μM Selen (656 ng/ml). Genauere Daten zu dem Selengehalt im Serum von Ratten finden sich bisher nicht.

Üblicherweise erfolgt die Einordnung anhand der bekannten humanen Serumselenkonzentrationen, welche im Mittel bei 1,6 μM Selen (125,7 $\mu\text{g/l}$) liegen (Bleys et al., 2008). Auch im Rahmen der von Leist et al. (1996) veröffentlichten Arbeit erfolgte die Einordnung der bestimmten Selenkonzentrationen als Selenmangel anhand von humanen Serumselenkonzentrationen.

Anhand einer solchen Einordnung lässt sich festhalten, dass sowohl unter den aktuellen Kulturbedingungen wie auch unter den bis 2006 eingesetzten Kulturbedingungen ein ausgeprägter Selenmangel vorliegt. Zudem muss auch darauf hingewiesen werden, dass der bestimmte Selengehalt in den tierischen Seren keine Aussage über die Form und die Verfügbarkeit des Selens ermöglicht und somit der Gehalt an freiverfügbarem Selen in den Seren möglicherweise noch niedriger liegt.

4.5.2 Zytotoxizität von Selen

Proliferierende, in serumhaltigem Wachstumsmedium kultivierte C6-Zellen wurden über 72 Stunden und wachstumsgehemmte, in serumfreien Medium kultivierte C6-Zellen über 24 Stunden mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen inkubiert. Die zytotoxische Wirkung von Selen wurde als Verminderung des Proteingehaltes der Kulturen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, gemessen. Proliferierende Zellen reagierten wesentlich empfindlicher auf Selen ($\text{EC}_{50} = 39 \mu\text{M}$) als wachstumsgehemmte Zellen ($\text{EC}_{50} = 849 \mu\text{M}$). Bei wachstumsgehemmten Zellen zeigte eine Verminderung des Proteingehaltes einen Verlust vitaler Zellen an (direkt zytotoxische Wirkung), bei proliferierenden Zellen ein vermindertes Wachstum (antiproliferative Wirkung).

Sowohl ein antiproliferativer Effekt als auch eine zytotoxische Wirkung von Selen sind bekannt. Anhand von verschiedenen Zelllinien konnte eine antiproliferative Wirkung von Selen nachgewiesen werden. LeBoeuf et al. (1985) beobachteten nach Inkubation mit Selen eine dosisabhängige Abnahme des Wachstums von H4-Zellen (Ratten-Hepatoblasten) sowie von NIH-3T3-Zellen (Mäuse-Fibroblasten). Dieser Effekt kommt durch eine Beeinflussung des Zellzyklus zu Stande. Durch eine Selenbehandlung verbleiben die Zellen für längere Zeit in der Interphase, der Übergang in die Mitose scheint erschwert. Die genaue Phase (G1, G0, S, G2) in welcher die Zellen verbleiben, scheint dabei abhängig von der speziellen Zellart zu sein (Valdiglesias et al., 2010). Für die humane Kolorektale-Karzinomzelllinie HCT-116 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Selenkonzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ die Proliferation deutlich hemmen und die Zellen sich vermehrt in der G1-Phase des Zellzyklus befinden (Králová et al., 2009). Möglicherweise kommt dieser antiproliferative Effekt von Selen über eine veränderte Aktivität der Selenoproteingruppe der Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) zustande. Von den TrxR ist bekannt, dass sie beispielsweise über die Modulation von Transkriptionsfaktoren, Einfluss auf den Zellzyklus nehmen (Selenius et al., 2008).

Selen wirkt darüber hinaus auch direkt zytotoxisch. Die Zellschädigung durch Selen kann über verschiedene Wirkweisen erklärt werden. Von Selen ist bekannt, dass es DNA-Schäden hervorrufen kann, selbst oxidativen Stress generiert und hierdurch die Lipidperoxidation erhöht ist (Valdiglesias et al., 2010). Das Ausmaß der zytotoxischen Wirkung ist allerdings wiederum unterschiedlich in verschiedenen Zelllinien. Dies hängt unter anderem von dem Expressionsmuster spezifischer Enzymen innerhalb der Zellen ab. Die bereits erwähnte TrxR scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Zytotoxizität von Selen zu haben. So sind Zellen mit hohem TrxR-Gehalt besonders empfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Selen (Selenius et al., 2008).

Auf Grund der gemessenen zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung von Selenkonzentrationen über $10 \mu\text{M}$, wurden für die weiter durchgeführten Versuche stets Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ eingesetzt.

4.5.3 Einfluss auf die Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase (GPx) liegt in Zellkulturen die mit höheren FBS-Gehalten kultiviert wurden höher. Sowohl Sandström (1987) als auch Müller und Pallauf (2003) konnten eine Steigerung der Aktivität der GPx in Abhängigkeit von zunehmenden FBS-Gehalten nachweisen.

Vergleicht man die GPx-Aktivität in C6-Zellen die in Wachstumsmedium kultiviert werden, welches 15 % Pferdeserum und 2,5 % FBS enthält, mit C6-Zellen, die mit nur 5 % FBS kultiviert werden, so zeigt sich, dass erstere eine mehr als doppelt so hohe Aktivität aufweisen (Brenner et al., 2010).

In Anbetracht des nachgewiesenen Selenmangels stellte sich die Frage, inwiefern eine Aktivitätssteigerung der Glutathionperoxidase (GPx) durch die gezielte Supplementierung der Kulturmedien mit Selen erzielt werden kann.

Eine 72-stündige Vorinkubation der C6-Zellkulturen mit 1µM Selen führte zur Zunahme der Aktivität um etwa 50 %. Während in den unbehandelten Kulturen die Aktivität der GPx bei $5,4 \pm 1,2$ mUnits/mg Zellprotein lag, konnte durch hinzufügen von 1µM Selen die Aktivität auf 12,2 mUnits/mg Zellprotein gesteigert werden.

Ein solcher Effekt ist auch von Leist et al. (1996) beobachtet worden. Durch die Supplementierung von 50 nM Selen konnte in der Fibroblasten-Linie L929 die Aktivität der GPx von 11 auf 67 mU/10⁷ Zellen gesteigert werden. Ebenso wurde dies in den Zelllinien D10N (murine T-Helfer-Zellen, Typ II), ECV-304 (humane Umbilicalvenen-Endothelzellen), Hep G2 (humane Hepatozelluläre-Karzinom-Zellen) und THP-1 (humane monozytische Leukämie-Zellen) nachgewiesen. Helmy et al. (2000) konnten ebenfalls eine signifikante Zunahme der GPx-Aktivität nach Selen-Supplementierung in der Zelllinie Hep G2, nachweisen. Auch Sandström et al. (1987) konnten anhand von fünf humanen Zelllinien eine Steigerung der GPx-Aktivität durch eine Selensupplementierung nachweisen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Aktivität der GPx in unterschiedlichen Zelllinien, sowie generell in verschiedenen Geweben, unterschiedliche stark ausgeprägt ist. In den von Leist et al. (1996) veröffentlichten Daten variiert die Aktivität der GPx in den Kontrollkulturen zwischen 11 mU/10⁷ Zellen (L929) und 147,2 mU/10⁷ Zellen (THP-1).

Die aktuell gemessene Aktivität der GPx in C6-Zellen liegt im unteren Bereich im Vergleich zu veröffentlichten Literaturwerten (siehe Tabelle 11, Brenner, 2009). Auch im Vergleich zu den von Sibylle Brenner im Rahmen ihrer Masterarbeit 2009 in C6-Astrogloma-Zellkulturen bestimmten GPx-Aktivitäten liegt die aktuell bestimmte Aktivität in den Kontrollkulturen ($5,4 \pm 1,2$ ml/mg Zellprotein) niedriger. Unter gleichen Kultivierungsbedingungen lag die von Sibylle Brenner bestimmte GPx-Aktivität von C6-Zellen bei 9,51 mUnits/mg Zellprotein.

Ursächlich hierfür können unterschiedliche Selenkonzentrationen in den verschiedenen Chargen des eingesetzten FBS sein. Selen wird vorwiegend über die Nahrung aufgenommen. Der Selengehalt von Nahrung und Tierfutter ist abhängig von den regional stark variierenden Selengehalt der Böden (Scientific Committee on Food, 2000). Somit ist es

möglich, dass in Abhängigkeit von dem eingesetztem Tierfutter, selbst in den verschiedenen FBS-Chargen eines Anbieters, die Selengehalte deutlich voneinander abweichen.

Unabhängig von der niedrigen Ausgangsaktivität konnte aber eine signifikante Steigerung der GPx-Aktivität nach Selen-Supplementierung nachgewiesen werden.

4.5.4 Einfluss auf die Zytotoxizität von Peroxiden

Der Nachweis einer durch Vorinkubation mit Selen gesteigerten GPx-Aktivität legte nahe, dass auch die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber Peroxiden gesenkt werden kann. Durch eine gesteigerte Aktivität sollten Zellen in der Lage sein, Peroxide effizienter abzubauen und sich somit auch besser gegenüber der zytotoxischen Wirkung schützen zu können. Es zeigte sich aber, dass die Vorinkubation mit Selen weder auf die Zytotoxizität von H_2O_2 noch von CHP einen signifikanten Einfluss hatte, wenn diese mittels Zytotoxizitätstest wie der Proteinbestimmung nach Lowry oder dem MTT-Assay bestimmt wurde.

Die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 , dargestellt anhand der EC_{50} -Werte, unterschieden sich zwischen den vorinkubierten Kulturen ($189 \pm 37 \mu\text{M}$) und den unbehandelten Kulturen ($137 \pm 53 \mu\text{M}$) nur unwesentlich (Abb. 31).

Anorganische Peroxide wie H_2O_2 werden sowohl über das Glutathion-System als auch über die Katalase abgebaut (siehe Abschnitt 1.1.2). Eine Vorbehandlung von Zellkulturen mit Selen hat allerdings nur Einfluss auf die GPx-Aktivität, die Katalase-Aktivität bleibt davon unbeeinflusst (Helmy et al., 2000). Da aber besonders in hohen Konzentrationen H_2O_2 maßgeblich durch die diffusions-gesteuerte Katalase abgebaut wird (Aebi, 1984, Dringen et al., 2005), ist es somit möglich, dass im Rahmen der eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen die Entgiftung vorwiegend über die Katalase erfolgt, während die GPx von untergeordneter Rolle ist. Dringen und Hamprecht (1997) zeigten zudem, dass beide Enzyme, die GPx und die Katalase, bei der Blockade des jeweils anderen Enzyms in der Lage sind, den Funktionsausfall des entsprechenden Enzyms über weite Strecken zu kompensieren. Dem entsprechend ist es möglich, dass auch in einer Selenmangel-Situation die Detoxifikation von H_2O_2 ausreichend sicher gestellt ist und eine Vorinkubation mit Selen somit keinen zusätzlichen Nutzen zeigt.

Andererseits kann nach Applikation von H_2O_2 eine rasche Oxidation von GSH beobachtet werden, was für eine bedeutende Rolle des Glutathion-Systems beim Abbau von H_2O_2 von sprechen kann (Dringen et al. 2000). In der Literatur sind des Weiteren auch Ergebnisse beschrieben, die zeigen, dass durch eine Vorinkubation mit Selen die Zytotoxizität von H_2O_2

abgeschwächt werden kann. So zeigten Leist et al. (1996), dass die Vorinkubation von L929-Fibroblasten mit 50 nM Selen zu einer signifikanten Reduktion der H₂O₂-Zytotoxizität führt.

Welcher Abbauweg überwiegend zur Entgiftung von H₂O₂ beiträgt ist abhängig von der Zellart. Desagher et al. (1996) zeigten, dass in Astrozyten von Mäusen für den H₂O₂-Abbau vorwiegend die Katalase verantwortlich ist, während in Neuronen der GPx eine dominante Rolle zu kommt. Hierbei sei erneut auf die Nähe der eingesetzten Zelllinie C6 zu Astrogliazellen hingewiesen. Somit besteht auch hier die Möglichkeit, dass der Abbau bei dieser Zelllinie überwiegend über die Katalase erfolgt und somit über eine Vorinkubation mit Selen kein Einfluss auf die Entgiftung genommen werden kann.

Letztendlich ist es auch möglich, dass weitere Enzyme, wie Peroxiredoxin, am Abbau von Peroxiden beteiligt sind, wobei der Einfluss dieser Enzyme als gering eingeschätzt wird (Makino et al., 2008).

Der EC₅₀-Wert für die Zytotoxizität von CHP lag in den unbehandelten Kulturen bei 31,7 ± 1,5 µM, bei den mit 1µM Selen vorinkubierten Kulturen bei 34,4 ± 1,5 µM (MTT-Assay, Abb. 30). Der Abbau von organischen Peroxiden, wie CHP, erfolgt alleinig über das Glutathion-System (Dringen et al. 2000, Kussmaul et al., 1999).

Die Beobachtung, dass trotz nachweislich gesteigerter GPx-Aktivität die Empfindlichkeit von C6-Zellen gegenüber CHP unverändert bleibt, stellt ein so nicht erwartetes Ergebnis dar.

Um sicher zu stellen, dass dieses Ergebnis weder durch den eingesetzten Toxizitätstest (Proteinbestimmung nach Lowry) noch durch eine zu niedrige Selenkonzentration bedingt ist, wurden im Verlauf die Selenkonzentrationen variiert (1, 3, 10 µM Selen) sowie ein weiterer Zytotoxizitätstest (MTT-Assay) eingesetzt. Es bestätigte sich dabei, dass die Vorinkubation mit Selen zu keiner Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber CHP führt.

Hinsichtlich der Wirkung einer Selen-Vorinkubation auf die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber organischen Peroxiden finden sich kaum Berichte in der Literatur. Brenner et al. (2010) konnten allerdings zeigen, dass unter Kultivierungsbedingungen, die mit einem höheren Anteil an fötalen Rinderserum sowie dem Einsatz von Pferdeserum und somit einem erhöhtem Selenangebot einhergehen, C6-Zellen weniger empfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von CHP sind. Unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen können neben den höheren Selengehalt aber auch andere Faktoren wie u. a. ein erhöhter α-Tocopherolspiegel, die reduzierte Zytotoxizität von CHP bedingen. Zu dem konnte in den entsprechenden Kulturen ein höherer zellulärer Glutathion (GSH)-Gehalt nachgewiesen werden.

Es ist möglich, dass nicht die Aktivität der GPx der bestimmende Faktor der Entgiftung ist. Für die Entgiftung von Peroxiden wird GSH als Cofaktor benötigt (Abschnitt 1.1.2). Darüber

hinaus kann GSH auch selbständig mit Peroxiden interagieren und so zur Entgiftung beitragen. Der zelluläre GSH-Gehalt ist unter anderem abhängig von der Syntheseleistung der γ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthase, dem ausreichenden Vorkommen der Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin und der hinlänglichen Funktion der Glutathionreduktase (GR) (Dringen & Hirrlinger, 2003). Die GR, ein NADPH⁺-abhängiges Enzym, vermittelt die Regeneration von GSH aus Glutathion-Disulfid (GSSG).

Um genügend intrazelluläres GSH für die Entgiftung von Peroxiden parat zu haben, ist somit das kontinuierliche Vorhandensein von NADPH⁺ eine Voraussetzung (DRINGEN et al., 2005). NADPH⁺ wird intrazellulär bei verschiedenen Prozessen durch NADPH⁺-regenerierende Enzyme (NADPH-regenerating enzymes, NRE), zu denen unter anderen die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges zählen, produziert, bzw. regeneriert. Die Aktivität der NREs, sowie das suffiziente Vorhandensein von Energieträgern wie Glucose, stellen somit weitere Faktoren dar, die für eine kompetente Entgiftung von Peroxiden notwendig sind (Young & Woodside, 2001). Des Weiteren sei auch hier erwähnt, dass die Entgiftung von Peroxiden und der Schutz vor ROS intrazellulär auch durch weitere Enzymen wie unter anderen den Peroxiredoxinen und den Thioredoxine, gewährleistet wird (Kalinina et al., 2008).

Während sich somit mittels Zytotoxizitätstest kein protektiver Effekt einer Vorinkubation mit Selen nachweisen lässt, stellt sich dies bei der mikroskopischen Beobachtung anders dar. Vor allem bei höheren CHP-Konzentrationen (50 μ M, 100 μ M) zeigte sich, dass mit Selen vorbehandelte Kulturen widerstandsfähiger waren. Während in der anfänglichen Phase nach der Peroxid-Exposition sowohl in den vorbehandelten als auch den Kontroll-Kulturen sich einzelne geschädigte Zellen zeigten, nahmen die Anzahl dieser nur in den Kontrollkulturen über die Zeit weiter zu. Die mikroskopisch beobachtbare zytotoxische Wirkung von CHP fiel in den mit Selen vorbehandelten Zellen deutlich geringfügiger aus, auffällig vor allem am Endpunkt der Beobachtung nach 22 Stunden.

Weniger eindrucksvoll war dieser Effekt nach Exposition mit H₂O₂. Zwar zeigten sich hier auch Unterschiede zwischen den Kulturen, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß.

Als mögliche Erklärungen für die divergenten Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen kommen verschiedene Ursachen in Betracht.

Zunächst ist festzuhalten, dass es sich bei der mikroskopischen Beobachtung um eine sehr subjektive Methode handelt. Die abgebildeten Photographien stellen ebenfalls nur die Momentaufnahme eines begrenzten Ausschnitts der Kultur dar, auch wenn darauf geachtet worden ist, einen möglichst repräsentativen Ausschnitt zu wählen.

Für die Korrektheit der gemachten Beobachtungen spricht hierbei allerdings, dass sie sich auch anhand des im Anschluss durchgeführten, standardisierten Zytotoxizitätstest nach Lowry widerspiegeln.

Weiterhin kann die Zellzahl in den Kulturen einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung haben. Während für die Zytotoxizitätstest 96-Well-Mikrotiterplatten eingesetzt wurden, erfolgte die Kultivierung für die mikroskopische Beobachtung in 35mm-Schalen. Hierdurch ergibt sich, dass letzter Kulturen mit einer höheren absoluten Zellzahl einhergehen.

Für Astrozyten ist bekannt, dass sie mit weiteren cerebralen Zellen, wie Neuronen, in Kontakt stehen und diese Zellen auch in ihrer antioxidativen Abwehr unterstützen. In Anwesenheit von Astrozyten, die einen hohen GSH-Gehalt aufweisen, sind so beispielsweise Neuronen gegenüber höheren Konzentrationen von H_2O_2 geschützt (Dringen et al., 2000). Möglich ist demnach auch, dass Astrogliazellen untereinander in Kontakt stehen und sich in der antioxidativen Abwehr unterstützen. Dies könnte dafür sprechen, dass eine hohe Zellzahl für die antioxidative Abwehr von Vorteil ist. Eventuell bildet sich eine Stärkung des antioxidativen Systems bei einer höheren Zellzahl dadurch besser ab.

4.5.5 Einfluss auf die Elimination von Peroxiden

Die Beobachtung, dass durch Selen zwar die Aktivität der GPx deutlich erhöht werden konnte, dies aber keinen eindeutig interpretierbaren Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Peroxiden hat, warf die Frage auf, ob eine erhöhte Aktivität der GPx tatsächlich zu einer effizienteren Elimination von Peroxiden führt.

Besonders in Anbetracht der Vielzahl an Faktoren, die Einfluss auf den Abbau von Peroxiden in C6-Zellen haben (siehe Abschnitt 4.5.4), war es zunächst unklar, ob die alleinige Vorinkubation mit Selen zu einer Zunahme der Eliminationsrate führt.

Gleichwohl konnte eindeutig gezeigt werden, dass mit Selen vorbehandelte Zellen Peroxide schneller eliminieren. Diese Beobachtung traf vor allem auf die Elimination von CHP zu, in deutlichem geringerem Ausmaß auch auf H_2O_2 . An dieser Stelle sei erneut auf die unterschiedlichen Abbauewege von CHP und H_2O_2 verwiesen (siehe Abschnitt 1.1.2).

Dies bestätigte die von Jess et al. 2007 veröffentlichten Daten, die eine Zunahme der Elimination von Peroxiden aus den Medium nach Selen-Vorinkubation durch C6-Zellen nachwiesen.

4.5.6 Einfluss auf die Peroxid-induzierte Radikalbildung

Die zytotoxische Wirkung von Peroxiden wird über die Entstehung von ROS vermittelt (siehe Abschnitt 1.1.1). Da trotz gesteigerter Peroxid-Elimination, die Zytotoxizität der Peroxide unbeeinflusst blieb, wurde auch die Peroxid-induzierte Radikalbildung, unter Selen Einfluss, untersucht. Erstaunlicherweise zeigte sich hierbei, dass eine Selen-Vorinkubation keinerlei Auswirkung auf die ROS-Bildung hat.

Wenn auch diese Beobachtung erstaunlich ist, so liefert sie eine Erklärung für das Ausbleiben einer protektiven Wirkung gegenüber Peroxiden. Gemeinhin wird häufig die Eliminationsfähigkeit von Zellen gegenüber Peroxiden benutzt um eine Aussage über die Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden zu treffen. Dabei wird davon ausgegangen, dass Zellen, die Peroxide schneller entgiften, weniger von der zytotoxischen Wirkung dieser betroffen sind.

Tatsächlich wurde von Leist et al. (1996) in L929-Mausfibroblasten nach viertägiger Inkubation mit Selen (50 nM Natriumselenit) sowohl eine erhöhte Aktivität der GPx als auch eine erhöhte Resistenz gegen H_2O_2 festgestellt. Nach der Selen-Vorinkubation war der EC_{50} -Wert für die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 mit 412 μM etwa dreifach höher als ohne Selen-Vorinkubation (EC_{50} -Wert = 135 μM). Die Aktivität der GPx wurde durch die Selen-Vorinkubation um das sechsfache, von 11 auf 67 $mU/10^7$ Zellen gesteigert. Das entspricht bei einem Proteingehalt der L929-Zellen von 0,24 $mg/10^6$ einer Steigerung der GPx-Aktivität von 4,2 auf 29 mU/mg Zellprotein. Im Unterschied dazu wurde die GPx-Aktivität der C6-Zellen nur um den Faktor 2,3 von 5,4 auf 12,2 mU/mg Zellprotein erhöht.

Dies mag eine Erklärung sein dafür, dass im einen Fall (Leist et al., 1996) eine Selen-Vorinkubation zur Erhöhung der H_2O_2 –Resistenz führt, im anderen Fall nicht (diese Arbeit). Die Selen-Vorinkubation führte in den C6-Zellen auch nur zu einer minimalen Beschleunigung der H_2O_2 –Elimination (siehe Abb. 32 und Jess et al., 2007) und damit einer minimalen Verminderung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration. Dies spiegelt die geringere Bedeutung des GPx-Pfades für die Elimination von H_2O_2 wieder und könnte den fehlenden Einfluss der Selen-Vorinkubation auf die H_2O_2 -induzierte Radikalbildung und Zytotoxizität erklären.

Im Fall von CHP hat der GPx-Pfad eine wesentlich höhere Bedeutung für die Elimination. Darauf deuten die von Jess et al., (2007) beschriebene geringe Beeinflussung der CHP-Elimination von C6-Zellen durch Hemmung der Katalase mit 3AT und (b) die im Vergleich mit der H_2O_2 –Elimination stärkere Beeinflussung der CHP-Elimination durch Senkung des GSH-Spiegels (durch BSO) bzw. Steigerung der GPx-Aktivität (durch Selen) hin. Die

Verminderung des GSH-Spiegels durch Vorinkubation mit BSO verlangsamte die Elimination und verstärkte die Zytotoxizität von CHP in C6-Zellen. Da GSH nicht nur Co-Substrat der GPx ist, sondern auch Co-Substrat der Glutathion-S-Transferasen, die hohen Anteil am Schutz der Zellen gegen reaktive Verbindungen haben, und GSH zu dem noch direkt als Radikal-Scavenger wirkt, kann die erhöhte Zytotoxizität von CHP bei vermindertem GSH-Spiegel zahlreiche Ursachen haben, es muss nicht (ausschließlich) durch die verlangsamte Elimination von CHP bedingt sein. Warum allerdings eine beschleunigte Elimination von CHP nicht zu einer verminderten Radikalbildung und Zytotoxizität führt, lässt sich nicht erklären.

5. Zusammenfassung

Oxidativer Stress gilt als ursächlich für eine Vielzahl von pathologischen Prozessen. Um die Auswirkungen von oxidativem Stress zu untersuchen, werden in vitro-Testsysteme, unter anderem in Form von Zellkulturen, eingesetzt. Zur Generierung von oxidativen Stress in Zellkulturen werden Peroxide eingesetzt, welche die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) initiieren. Zellen besitzen enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Schutzsysteme mit deren Hilfe sie Peroxide eliminieren und ROS abfangen können. Diese Schutzsysteme sind auf das Vorhandensein von exogenen Antioxidantien sowie von Substanzen, die für die Funktion der endogenen Schutzsysteme notwendig sind, angewiesen. Über die Kultivierungsbedingungen wird somit unweigerlich Einfluss auf die Aktivität der Schutzsysteme ausgeübt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Glutathion-Systems und der Katalase für die Zytotoxizität von H_2O_2 und CHP in C6-Astrogliazellen untersucht. Ein Schwerpunkt der Arbeit wurde auf den Einfluss des essentiellen Spurenelements Selen, welches für die Funktion der Glutathionperoxidase (GPx) unerlässlich ist, gesetzt.

Selen wird C6-Zellkulturen nur über die, den Basis-Medien hinzugefügten tierischen Seren, angeboten. Eine Bestimmung der Selenkonzentration in fötalem Rinderserum (FBS) und Pferdeserum mittels Atomabsorptionsspektrometrie zeigte große Unterschiede in den Selengehalten (FBS: 0,06 - 0,16 μM HS: 3,4 μM Selen). Unter den aktuellen Kultivierungsbedingungen stehen C6-Zellen nur 0,01 μM Selen im Wachstumsmedium zur Verfügung.

Um den Einfluss der Katalase und des Glutathion-Systems auf die zytotoxische Wirkung von Peroxiden zu untersuchen, wurden C6-Zellen mit dem Katalase-Hemmstoff 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT), dem Hemmstoff der γ -Glutamylcystein-Synthetase Buthionin-Sulfoximin (BSO), dem Glutathion-(GSH)-Prekursor Cystin bzw. dem GPx-Prekursor Selen (als Natriumselenit) vorinkubiert. Danach wurde die zelluläre Aktivität der Katalase und der Glutathionperoxidase gemessen, der Glutathiongehalt erfasst und die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 und CHP bestimmt. Die zytotoxische Wirkung wurde als Verminderung des Zellproteingehaltes (Lowry-Methode) bzw. der Zellvitalität (MTT-Assay) in Mikrotiterplattenkulturen von C6-Zellen gemessen.

Die Vorinkubation mit 3AT führte zur kompletten Hemmung der Katalase sowie zu einer Zunahme der Empfindlichkeit der C6-Zellen gegenüber H_2O_2 , aber nicht gegenüber CHP. Die Vorinkubation mit BSO führte zu einer starken Reduktion des zellulären GSH-Gehaltes

von 19,2 auf 2,2 mmol GSH/mg Zellprotein. Dies führte zu einer Zunahme der Empfindlichkeit der C6-Zellen sowohl gegenüber H_2O_2 als auch gegenüber CHP. Die Vorinkubation mit Cystin hatte keinen Einfluss auf den GSH-Gehalt der C6-Zellen und dementsprechend zeigten sich auch keine Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber den Peroxiden.

Durch die Vorinkubation mit Selen wurde die Aktivität der GPx deutlich gesteigert, von 5,4 auf 12,2 mU/mg Zellprotein. Erstaunlicherweise konnte aber mittels Zytotoxizitätstests keine verminderte Zytotoxizität beider Peroxide in den Mikrotiterplattenkulturen nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich bei einer mikroskopischen Beobachtung von mit Selen vorbehandelten 35-mm-Schalen-Kulturen, dass die Zytotoxizität von CHP deutlich, die von H_2O_2 kaum herabgesetzt war. Auf Grund dieses so nicht zu erwartenden Ergebnisses, wurde zusätzlich die Fähigkeit der C6-Zellen Peroxide zu eliminieren mit Hilfe des FOX-Assays untersucht. Mit Selen vorbehandelte Kulturen wiesen hierbei eine erhöhte Eliminationsgeschwindigkeit für CHP, in geringerem Ausmaß auch für H_2O_2 , auf.

Weiterhin wurde die durch H_2O_2 bzw. CHP induzierte zelluläre Radikalbildung mit Hilfe des DCF-Assay untersucht. Obwohl die Eliminationsgeschwindigkeit für beide Peroxide erhöht war, konnte keine Abnahme der ROS-Bildung nachgewiesen werden.

Trotz dieses Widerspruchs kann anhand der Ergebnisse gefolgert werden, dass die Aktivität der Glutathionperoxidase und damit die Geschwindigkeit dieses Eliminationspfades für Peroxide vom Selengehalt des Kulturmediums abhängig ist, und dass unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen ein Selenmangel herrscht. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass für den Schutz gegenüber der toxischen Wirkung von H_2O_2 sowohl die Katalase als auch das Glutathion-System von Bedeutung sind, für den Schutz gegenüber CHP vorwiegend Letzteres. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass für die Zytoprotektion der Glutathiongehalt von größerer Bedeutung ist als die Aktivität der Glutathionperoxidase.

Literaturverzeichnis

Aebi, H. E. (1983): Catalase. In: **Bergeyer**, H.U., **Bergmeyer**, J. und **Graßl**, M. (Hg.): Methods of Enzymatic Analysis. 3. Aufl., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, S. 273-286

Anderson, M. E. (1998): Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112, S. 1-4.

Andrae, U., **Singh**, J. und **Ziegler-Skylakakis**, K. (1985): Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicology Letters* Nr. 28, S. 93-98.

Bedwal, R. S., **Nair**, N., **Sharma**, M. P. und **Mathur**, R. S. (1993): Selenium – Its Biological Perspectives. *Medical Hypotheses*, 41, S. 150-159.

Benda, P., **Lightbody**, J., **Sato**, G. **Levine**, L. und **Sweet**, W. (1968): Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science*, 161, S. 370-371.

Bley, J., **Navas-Acien**, A., **Stranges**, S., **Menke**, A., **Miller III**, E. und **Guallar**, E. (2008): Serum selenium and serum lipids in US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, S. 416-423.

Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Methode for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytic Biochemistry*, 72, S. 248-254.

Brenner, S. (2009): Einfluss der Kulturbedingungen auf die Empfindlichkeit von C6 Gliomzellen für oxidative Stressoren. Masterarbeit im Studiengang Ökotoxikologie, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Brenner, S., **Gülden**, M., **Maser**, E. und **Seibert**, H. (2010): Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress. In: *Toxicology Vitro*, 8, S. 2090-2096.

Brigelius-Flohé, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidises. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, S. 951-965.

Brigelius-Flohé, R. (2006): Glutathion peroxidises and redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry*, 387, S. 1329-1335.

Clark, L. C., Combs, G. F. Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G.F., Gross, E. G., Krongrad, A., Lesher, J.L. Jr., Park, H.K., Sanders, B. B. Jr., Smith, C.L. und Taylor, J.R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *The Journal of the American Medical Association*, 276, S. 1957-1963.

Compton, S. J. und Jones, C. G. (1985): Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Analytic Biochemistry*, 151, S. 369-374

Desagher, S., Glowinski, J. und Permont, J. (1996): Astrocytes Protect Neurons from Hydrogen Peroxide Toxicity. *The Journal of Neuroscience*, 16, S. 2553-2562.

Dringen, R. und Hamprecht, B. (1997): Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Research*, 759, S. 67-75.

Dringen, R., Gutterer, J. M. und Hirrlinger, J. (2000): Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*, 267, S. 4912-4916.

Dringen, R. (2000): Metabolism and function of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62, S. 649-671.

Dringen, R. und Hirrlinger, J. (2003): Glutathion Pathways in the Brain. *Biological Chemistry*, 384, S. 505-516.

Dringen, R. (2005): Oxidative and Antioxidative Potential of Brian Microglial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, S.1223-1233.

Dringen, R., Pawlowski, P. G. und Hirrlinger, J. (2005): Peroxide Detoxification by Brain Cells. *Journal of Neuroscience Research*, 79, S. 157-165.

Finkel, T. und Holbrook N. J., (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, S. 239-247.

Forman, H. J. und Torres, M. (2002): Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, S. 4-8.

Gaetani, G. F., Kirkman, H. N., Magerini, R. und Ferraris A. M. (1994): Importance of Catalase in the Disposal of Hydrogen Peroxide Within Human Erythrocytes. *Blood*, 84, S. 325-330.

Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E. und Seibert, H. (2010): Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, S. 1298-1305.

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, S. 1-14.

Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. Aufl., Oxford University Press.

Hasel, M. (2007): Einfache Bestimmung von Selen in Serum mit der Graphitrohrfen-AAS, PerkinElmer Life and Analytic Sciences, Rodgau-Jügesheim

Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (2002): How Selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and Cellular Biology* 22, S. 3565-3576.

Helmy, M. H., Ismail, S. S., Fayed, H. und 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, S. 57-61.

Jess, A., Gülden, M., Maser, E. und Seibert, H. (2007): Clearance of exogeneous peroxides by C6 astroglioma cells in vitro. Poster. 25. Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology, Salzau, 19.-22.09.2007.

Jiang, Z.-Y., Woollard, A. C. S. und Wolff, S. P. (1990): Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. Federation of European Biochemical Societies, 268, S. 69-71.

Kabirov, K. K., Kapetanovic, I. M. Und Lyubimov, A.V. (2007): Direct determination of selenium in rat blood plasma by Zeeman atomic absorption spectrometry. Chemico-Biological Interactions, 171, S.152-158

Kalinina, E.V., Cherniv, N. N. und Saprin, A. N. (2008): Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes. Biochemistry (Moscow), 73, S. 1493-1510.

Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K. und Kuo, C. H. (1992): A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. Neuroscience, 48, S. 903-914.

Kondo, T., Hirose, M. und Kageyama, K. (2009): Roles of Oxidative Stress and Redox Regulation in Atherosclerosis. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 16, S. 532-537.

Králova, V., Brigulová, K., Červinka, M. und Rudolf, E. (2009): Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. Toxicology in Vitro, 23, S. 1497-1503.

Kranich, O., Hamprecht, B. und Dringen, R. (1996): Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. Neuroscience Letters, 219, S. 211-214.

Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R. und Gladyshev, V. N. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. Science, 300, S. 1439-1443.

Kussmaul, L., Hamprecht, B. und Dringen, R. (1999): The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability of NADPH. *Journal of Neurochemistry.*, 73, S. 1246-1253.

LeBoeuf, R. A., Laishes, B. A. und Hoekstra, W., G. (1985): Effects of Selenium on Cell Proliferation in Rat Liver and Mammalian Cells as Indicated by Cytokinetic and Biochemical Analysis. *Cancer Research*, 45, S. 5496-5504.

Leist, M., Raab, B., Maurer, S., Rösick, U. und Brigelius-Flohé, R. (1996): Conventional cell culture media does not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 21, S. 297-306.

Liddell, J. R., Robinson, S. R. und Dringen, R. (2004): Endogenous glutathione and catalase protect cultured rat astrocytes from iron-mediated toxicity of hydrogen peroxide. *Neuroscience Letters*, 364, S. 164-167.

Liddell, J. R., Dringen, R., Crack, P. J. und Robinson, S. R. (2006): Glutathione Peroxidase 1 and a High Cellular Glutathione Concentration are Essential for Effective Organic Hydroperoxide Detoxification in Astrocytes. *Glia*, 54, S. 873-879.

Linden, A., Gülden, M., Martin, H.-J., Maser, E. und Seibert, H. (2008): Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicology in Vitro*, 22, S. 1371-1376.

Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden, J.D. 3rd., Crawford, E. D., Goodman, G. E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E. D., Karp, D. D., Walther, P., Lieber, M. M., Kristal, A. R., Darke, A. K., Arnold, K. B., Ganz, P. A., Santella, R. M., Albanes, D., Taylor, P. R., Probstfield, J. L., Jagpal, T. J., Crowley, J. J., Meyskens, F. L. Jr., Baker, L. H. und Coltman, C. A. Jr. (2009): Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *The Journal of the American Medical Association*, 301, S. 39-51.

Lovell, M. A. und Markesbery, W. R. (2007): Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research*, 35, S. 7497-7504.

Low, S. C. und Berry, M. J. (1996): Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, S. 203-208.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biochemical Chemistry*, 193, S.265-274.

Makino, N., Mise, T. und Sagara, J. (2008): Kinetics of hydrogen peroxide elimination by astrocytes and C6 glioma cells analysis based on a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, S. 927-936.

Marengo, B., De Ciucis, C., Verzola, D., Pistoia, V., Raffaghello, L., Patriarca, S., Balbis, E., Traverso, N., Cottalasso, D., Pronzato, M. A., Marinari, U. M. und Domenicotti, C. (2008): Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, S. 474-482.

Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C. und Bohr, V. A. (2009): Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30, S. 2-10.

Mc Cord, J. M. (2000): The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*, 108, S. 652-659.

Mc Cord, J. M. (2008): Superoxide Dismutase, Lipid Peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose-Response*, 6, S. 223-238.

Michiels, C. und Remacle J. (1988): Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *European Journal of Biochemistry*, 177, S. 435-441.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, S. 55-63.

Müller, A. (2008): Akkumulation von Vitamin E in C6-Rattenastrogliazellen und zytoprotektive Wirkung gegen oxidativen Stress. Medizinische Dissertation, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Müller, A. und **Pallauf, J.** (2003): Effect of increasing selenite concentrations, vitamin E supplementation and different fetal calf serum content on GPx1 activity in primary cultured rabbit hepatocytes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 17, S. 182-192.

Ogura, Y. und **Yamazaki, I.** (1983): Steady-State Kinetics of the Catalase Reaction in the Presence of Cyanide. *Journal of Biochemistry*, 94, S. 403-408.

Owens, C. W. I. und **Belcher, R. V.** (1965): A Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione. *Biochemical Journal*, 94, S. 705-711.

Paglia, D. E. und **Valentine, W. N.** (1967): Studies on the quantitative and qualitative Characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, S.158-169.

Patrick, L. (2004): Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Alternative Medicine Review*, 9, S. 239-258.

Sagara, J., Makino, N. und **Bannai, S.** (1996): Glutathione Efflux from Cultured Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 66, S. 1876-1881.

Sandström, B. E., R., Carlsson, J. und **Marklund, S. L.** (1987): Variations among cultured cells in glutathione peroxidase activity in response to selenite supplementation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 929, S. 148-153.

Scientific Committee on Food, European Commission, Health & Consumer Protection directorate-general, Directorate C - Scientific Health Opinions, Unit C3 - Management of scientific committees II (2000): Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium, online publiziert.

Selenius, M., Fernandes, A. P., Brodin O., Björnstedt, M. und Rundlöf, A. (2008): Treatment of lung cancer cells with cytotoxic levels of sodium selenite: Effects on the thioredoxin system. *Biochemical Pharmacology*, 75, S. 2092-2099.

Smith, P. S., Zhao, W., Spitz, D. R. und Robbins, M. E. (2007): Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 42, S. 787-797.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. und Mahajan, R. T. (2009): Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7, S. 65-74.

Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J. und Laffon, B. (2010): In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic and protective effects: a review. *Archives of Toxicology*, 84, S. 337-351.

Vogiatzis, G., Tousoulis, D. und Stefanadis C. (2009): The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology*, 50, S. 402-409.

Wang, X. und Quinn, P. J. (1999): Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38, S. 309-336.

Yang, M. S., Chan, H. W. und Yu, L.C. (2006): Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, 226, S. 126-130.

Young, I. S. und Woodside, J. V. (2001): Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, S. 176-186.

Danksagung

Ich danke Herr Prof. Dr. Maser für die Möglichkeit, eine Inauguraldissertationsarbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gülden für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit, seinen stets wertvollen Ratschlägen und seiner Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Sabine Seibert, die mir die Arbeit in der Zellkultur beibrachte, möchte ich mich herzlichst für die so lehrreiche und hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit, aber auch darüber hinaus, bedanken. Auch möchte ich Herrn Dr. Seibert für die vielen anregenden Diskussionen und Hilfestellungen danken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Sibylle Brenner und Manuela Perle, die mir stets bei Fragen zum praktischen wie auch theoretischen Vorgehen zur Seite gestanden haben. Teresa Meyer danke ich für ihre großartige Unterstützung während des gesamten Studiums und vor allem für ihre wunderbare Freundschaft. Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die für eine so angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Schließlich gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie und meinem Partner Robert Nier für ihren uneingeschränkten Rückhalt, ihr Verständnis und ihren Glauben an mich. Hervorheben möchte ich besonders meinen Dank gegenüber meinem Vater, Uli Brinkschulte-Kunert, der auf unvergleichliche Weise immer für mich da war.

Lebenslauf

Name: Anne Kunert
Geburtstag: 09.11.1984
Geburtsort: Herdecke
Staatsangehörigkeit: deutsch
Ausbildung:
1990 - 1994 Grundschule Lünern
1995 - 2001 Peter-Weiss-Gesamtschule Unna
2001 - 2002 Schüleraustausch, OCEU positivo, Penápolis, Brasilien
2002 - 2004 Peter-Weiss-Gesamtschule Unna, Abitur
09/2004 - 10/2010 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel