

**Vergleichende Darstellung von
Dichlorodihydrofluorescein und Dihydrocalcein
zur Messung von reaktiven Sauerstoffspezies**

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Alexandra Keller

Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Diener

und Institut für kardiovaskuläre Physiologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
Betreuer: Prof. Dr. Busse

Vergleichende Darstellung von Dichlorodihydrofluorescein und Dihydrocalcein zur Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Alexandra Keller
Tierärztin aus Neu-Isenburg

Frankfurt am Main 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. R. Busse

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	8
1.1 Eigenschaften reaktiver Sauerstoffspezies	10
1.1.1 Superoxidanion	10
1.1.2 Wasserstoffperoxid	12
1.1.3 Hydroxylradikal.....	12
1.2 ROS-bildende Enzymsysteme	14
1.2.1 NADPH-Oxidase	15
1.2.2 Mitochondrien.....	16
1.2.3 Xanthinoxidase.....	18
1.2.4 Cytochrom P450	18
1.3 Antioxidativer Schutz.....	20
1.3.1 Superoxiddismutase.....	21
1.3.2 Katalase	21
1.3.3 Glutathionperoxidase	22
1.3.4 Thioredoxin	23
1.3.5 Antioxidantien.....	23
1.4 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen	25
1.4.1 Chemilumineszenz.....	26

1.4.2	Fluorimetrische Assays	27
1.4.3	Photometrische Verfahren	28
1.4.4	Elektronen Spin Resonanz und Spin Trapping	30
2.	Ziel der Arbeit	32
3.	Material und Methoden	33
3.1	Methoden	33
3.1.1	Zellkultur	33
3.1.2	Präparation von submitochondrialen Partikeln (SMP).....	33
3.1.3	Elektronen-Spin-Resonanz (ESR).....	33
3.1.4	Hydrolytische Spaltung von H ₂ -DCF-diacetat und H ₂ -Calcein-acetylmethylester	34
3.1.5	In vitro Messung der reaktiven Sauerstoffspezies.....	35
3.1.6	Intrazelluläre Retention der fluoreszierenden Substanzen.....	35
3.1.7	Redox Cycler.....	36
3.1.8	Basale und Agonisten-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	37
3.1.9	Fluoreszenzmessung im konfokalen Mikroskop.....	37
3.1.10	Hemmung der mitochondrialen Atmungskette	38
3.1.11	Bestimmung der NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase Aktivität in SMP..	38
3.2	Statistische Auswertung.....	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Chemische Eigenschaften von H ₂ -DCF und H ₂ -Calcein	40

4.2	Intrazelluläre Retention von Calcein und DCF	42
4.3	Einfluss des Redox Cyclers DMNQ auf die Bildung von DCF und Calcein .	44
4.4	Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion durch Angiotensin II: Einfluss auf die Bildung von DCF und Calcein	45
4.5	Effekt der Hemmung der NADPH Oxidase auf die Oxidation von H ₂ -DCF und H ₂ -Calcein	48
4.6	H ₂ -DCF und H ₂ -Calcein erfassen ROS in unterschiedlichen Teilen der Zelle	50
4.7	H ₂ -Calcein interagiert direkt mit dem Komplex I der mitochondrialen Atmungskette	52
5.	Diskussion	54
6.	Zusammenfassung	62
7.	Summary	63
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Anhang	75
9.1	Materialien.....	75
9.1.1	Chemikalien	75
9.1.2	Geräte und Zubehör	76
9.1.3	Abkürzungen	77

1. Einleitung

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der endogen- und exogen induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als wichtiger Faktor in der Entstehung von Alterungsprozessen und verschiedener Erkrankungen (z.B. Arteriosklerose, postischämischen Organschäden, Diabetes mellitus, neurologischer und dermatologischer Erkrankungen) weltweit Gegenstand von wissenschaftlichen Aktivitäten in allen Teilbereichen der biologischen und medizinischen Forschung (Finkel und Holbrook, 2000) (Droge, 2002) (Harrison *et al.*, 2003). Das Hauptinteresse gilt hierbei der quantitativen und qualitativen Analyse der Sauerstoffradikale in biologischen Systemen mit dem Ziel, Ursache der Bildung und den Stellenwert in der Pathogenese der jeweiligen Erkrankungsform zu verstehen (Halliwell, 1993). Dies ist als Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien erforderlich.

ROS sind nicht nur toxische Nebenprodukte eines oxidativen Stoffwechsels, sondern in vielen physiologischen Prozessen als Intermediärprodukte oder Botensubstanzen in die Signaltransduktion integriert (Fukai *et al.*, 2002) (Esposito *et al.*, 2004). So spielen ROS u.a. in der antimikrobiellen Abwehr, in der Regulation von Zellproliferation und Wachstum und auch in der Gefäßtonusregulierung eine wichtige Rolle (Sauer *et al.*, 2001) (Droge, 2002) (Taniyama und Griendling, 2003) .

ROS können intra- und extrazellulär entstehen. Es existieren eine Reihe von Enzymsystemen in der Zelle, die konstitutiv oder induzierbar ROS generieren können. Dies sind u.a. Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthinoxidase, NO-Synthase, Zyklooxygenase, Lipoxygenase, Cytochrom P450-Monooxygenase und NADPH-Oxidase (Fukai *et al.*, 2002). Des Weiteren können durch Autooxidationen von Katecholaminen, Flavinen oder Ferredoxinen ROS gebildet werden (Del Maestro, 1980). Die zelluläre ROS-Produktion wird u.a. durch Scherkräfte, Umweltfaktoren/Gift, Zytokine, Low-density-Lipoproteine sowie durch Metallionen stimuliert (Meneghini, 1997).

Die lokalen Konzentrationen von ROS in der Zelle werden durch die Balance zwischen der Bildung und dem Abbau durch Enzyme bzw. die Reaktionen mit verschiedenen Molekülen determiniert (Wolin *et al.*, 2002). Das Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von ROS ist für die Erhaltung der physiologischen Prozesse in der Zelle entscheidend (Droge, 2002).

Ein zeitweiliger Anstieg von ROS, durch eine übermäßige Generierung oder durch eine verminderte antioxidative Abwehr, wird als oxidativer Stress bezeichnet (Fattman *et al.*, 2003). Es kommt zu Reaktionen von ROS mit biologischen Makromolekülen, woraus die Bildung von Lipidperoxiden, inaktivierten Proteinen und mutierten DNA-Molekülen resultiert. ROS können direkte zelluläre Schädigungen verursachen, die Mitose stimulieren, in intrazellulären Signalkaskaden eine entscheidende Rolle spielen oder vasoprotektives Stickstoffmonoxid (NO*) abfangen (Droge, 2002) (Esposito *et al.*, 2004).

Als proatherosklerotischer Risikofaktor ist oxidativer Stress in der Herz-Kreislaufforschung von besonderem wissenschaftlichen Interesse (Harrison *et al.*, 2003) (Mugge, 1998) (Taniyama und Griendling, 2003). Herz-Kreislaufkrankungen sind in den Industrieländern die häufigste Todesursache und die Atherosklerose nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein.

1.1 Eigenschaften reaktiver Sauerstoffspezies

ROS sind charakterisiert durch ihre hohe chemische Reaktivität. Es handelt sich dabei entweder um freie Radikale (z.B. das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$)) oder um reaktive nicht-radikale Komponenten (z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Peroxynitrit (ONOO^-)) (Shah und Channon, 2004) (Abbildung 1). Die Halbwertszeit variiert von einigen Nanosekunden bei den hochreaktiven Komponenten bis hin zu Stunden.

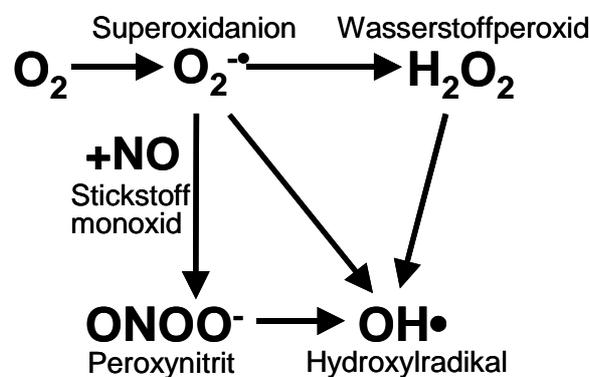


Abbildung 1: Bildung der biologisch bedeutsamsten reaktiven Sauerstoffspezies

Die Einelektronen-Reduktion von Sauerstoff zum Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ist der grundlegende Schritt in der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Obwohl $\text{O}_2^{\bullet-}$ die Quelle der ROS Produktion ist, sind schädigende Effekte hauptsächlich durch Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) und Peroxynitrit (ONOO^-) bedingt.

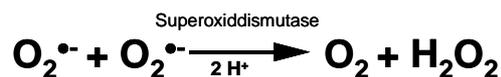
1.1.1 Superoxidanion

Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) wird durch eine univalente Reduktion aus molekularem Sauerstoff (O_2) gebildet. Diese Reaktion ist der grundlegende Schritt in der Entstehung von ROS insofern, dass sämtliche reaktiven Zwischenprodukte aus diesem Radikal entstehen können (Stahl und Sies, 2002) (McIntyre *et al.*, 1999). $\text{O}_2^{\bullet-}$ kann die Zellmembran nicht passieren und ist daher auf das Kompartiment der Zelle beschränkt, in dem es auch gebildet wurde (McIntyre *et al.*, 1999). Ebenfalls

assoziiert mit oxidativen Stress, handelt es sich bei $O_2^{\bullet-}$ um eine dafür untypische Spezies, da es sowohl als ein Reduktionsmittel, in dem es sein zusätzliches Elektron auf ein anderes Molekül (z.B. Stickstoffmonoxid (NO)) überträgt, als auch als Oxidationsmittel, wobei es zu H_2O_2 reduziert wird, agieren kann (Elstner, 1990).

Die Halbwertszeit von $O_2^{\bullet-}$ im Gewebe ist abhängig von der Anwesenheit von Superoxiddismutase (SOD) in dem entsprechendem Kompartiment der Zelle (Elstner, 1990). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und beschleunigt die spontane Dismutation um das 10.000fache (Gleichung 1). Noch um ein dreifaches schneller ist die Reaktion von $O_2^{\bullet-}$ mit NO, bei der $ONOO^-$ entsteht (Gleichung 2). Reaktionen mit Antioxidantien, wie Vitamin A, E und C sind dagegen um ein 10.000faches langsamer (Fukai *et al.*, 2002).

Die extremen Geschwindigkeiten der Reaktionen zwischen $O_2^{\bullet-}$ und NO und zwischen $O_2^{\bullet-}$ und SOD sind entscheidend für die Interaktion dieser drei Komponenten in der Zelle. Eine Veränderung in der Konzentration von $O_2^{\bullet-}$ und SOD hat somit einen direkten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des vasoprotektiven NO und somit einen Effekt auf den Gefäßtonus (Fukai *et al.*, 2002).



$$V=2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Gleichung 1



$$V=6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Gleichung 2

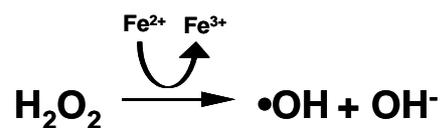
1.1.2 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht hauptsächlich durch die Dismutation von $\text{O}_2^{\bullet-}$. Neben dem spontanen Ablauf dieser Reaktion, wird der größte Teil enzymatisch durch SOD katalysiert (Gleichung 1).

Auf Grund der Elektronenkonfiguration handelt es sich bei H_2O_2 nicht um ein Radikal im eigentlichen Sinn und diese ROS ist somit weniger reaktionsfreudig. Bei einer Halbwertszeit von einigen Sekunden liegt die intrazelluläre Konzentration im Bereich von $10^{-8} - 10^{-7}$ M (Chance *et al.*, 1979).

Das ungeladene H_2O_2 kann größere Distanzen zurücklegen und Membranen permeieren (Halliwell und Gutteridge, 1984). Als Vorstufe für die FENTON-Reaktion (Gleichung 3), ist es eine wichtige Quelle für reaktives $\bullet\text{OH}$ und somit ebenfalls von pathophysiologischer Bedeutung. Des weiteren kann H_2O_2 selbst Signaltransduktionen beeinflussen.

Der enzymatische Abbau von H_2O_2 erfolgt größtenteils durch Katalase und Glutathionperoxidase (GPX) (Nordberg und Arner, 2001).



Gleichung 3

1.1.3 Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) zählt zu den aggressivsten ROS (Stahl und Sies, 2002). Auf Grund des hohen Reaktionspotentials ist $\bullet\text{OH}$ eines der stärksten Oxidationsmittel und kann mit fast jeder Art von Molekülen reagieren. Als Hauptquelle für die Entstehung von $\bullet\text{OH}$ in biologischen Systemen gilt die Eisen(II)-vermittelte FENTON-Reaktion (Gleichung 3) (Meneghini, 1997).

Für die Reduktion des Eisen(III) ist in vivo vor allem $O_2^{\bullet -}$ verantwortlich (Halliwell und Gutteridge, 1984). Unter bestimmten Bedingungen wird eine Reduktion aber auch durch Stoffe wie Vitamin C oder Glutathionen möglich (Burkitt und Gilbert, 1990)

Auf Grund der extremen Reaktivität von $\bullet OH$ (biologische Halbwertszeit 1 ns), sind die meisten Reaktionen lediglich diffusionslimitiert (Elstner, 1990). Solange nicht jedes gebildete $\bullet OH$ durch einen Abfänger („Scavenger“) direkt entgiftet werden kann, ist dessen Generierung praktisch immer mit Schäden verbunden. $\bullet OH$ ist unter anderem Hauptinitiator für Lipidperoxidationen, welche vor allem in Zellkompartimenten stattfinden, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind.

1.2 ROS-bildende Enzymsysteme

Wie bereits erwähnt, befinden sich in der Zelle eine Vielzahl von Substanzen, die sauerstoffabhängig zur ROS-Bildung führen. Neben speziellen Enzymsystemen, gehören hierzu auch niedermolekulare Substanzen, die vor allem durch ihre autooxidativen und katalysatorischen Eigenschaften zur ROS-Generierung beitragen.

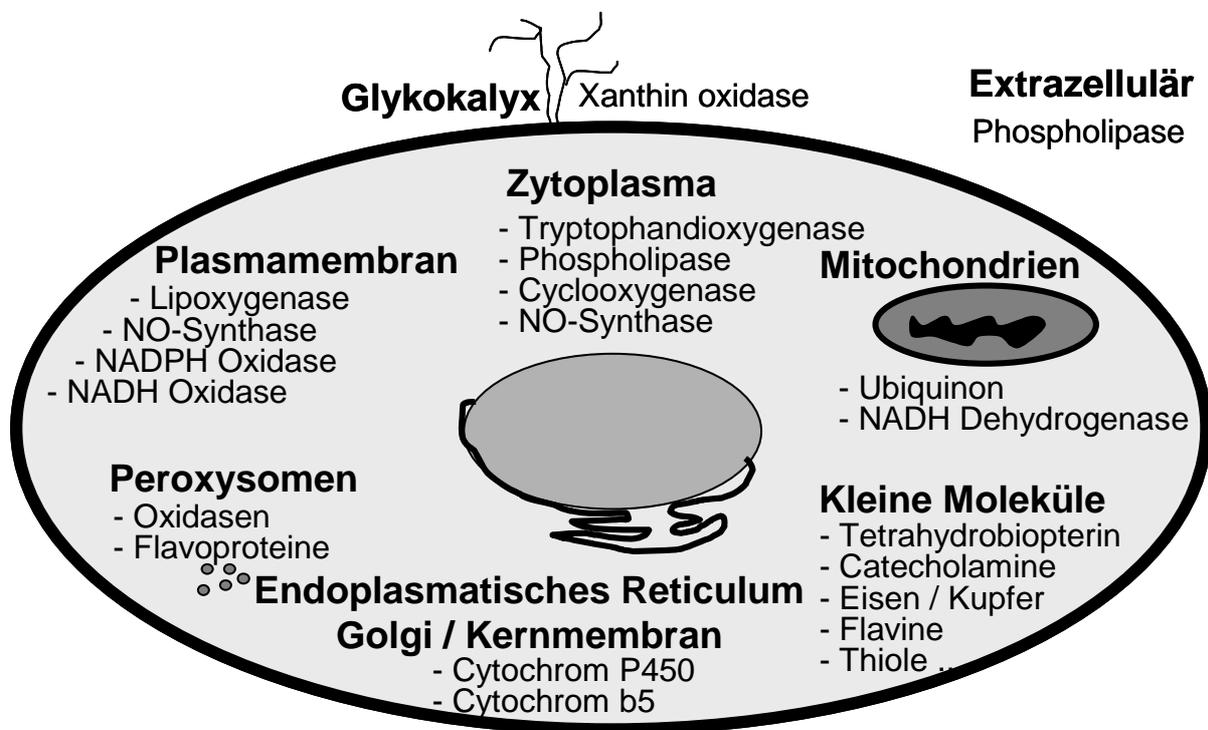


Abbildung 2: Quellen der zellulären ROS-Bildung

Übersicht einiger wichtiger Quellen der zellulären ROS-Bildung in ihren unterschiedlichen Kompartimenten.

1.2.1 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von Enzymen, die in einer Vielzahl von Zellen vorkommen. Am besten untersucht ist die NADPH-Oxidase der neutrophilen, eosinophilen und mononukleären Leukozyten, welche die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ aus molekularem Sauerstoff und NADPH katalysiert (Babior, 1999). Die neutrophile NADPH-Oxidase besteht aus dem membrangebundenen Flavocytochrom b_{558} , gebildet aus $gp91^{phox}$ und $p22^{phox}$, und den im Zytoplasma vorkommenden Komponenten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und den GTPasen Rac1 oder Rac2 (Babior *et al.*, 2002).

Die Translokation der zytoplasmatischen Komponenten zu dem membrangebundenen Proteinkomplex ermöglicht einen Transfer eines Elektrons von NADPH auf molekularen Sauerstoff, woraus die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ resultiert (Abbildung 3) (Shatwell und Segal, 1996). In den neutrophilen Granulozyten spielt die NADPH-Oxidase eine entscheidende Rolle bei der Bakterienabtötung während des so genannten "Respiratory Burst" (Forman und Torres, 2002).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass auch in vaskulären Zellen, einschließlich Endothel- und glatten Muskelzellen, Komponenten der neutrophilen NADPH-Oxidase, wie $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ und Rac exprimiert sind (Lassegue und Clempus, 2003). Endothelzellen und Fibroblasten enthalten ebenfalls ein, der neutrophilen NADPH-Oxidase Untereinheit $gp91^{phox}$ analoges Protein Nox 2, während in glatten Muskelzellen Nox 1 und Nox 4 exprimiert sind (Lambeth, 2004). Die verschiedenen vaskulären NADPH-Oxidasen stellen eine wichtige Quelle sowohl der basalen als auch der, durch Agonisten induzierten, $O_2^{\bullet-}$ -Produktion dar (Sorescu *et al.*, 2002) (Gorlach *et al.*, 2000).

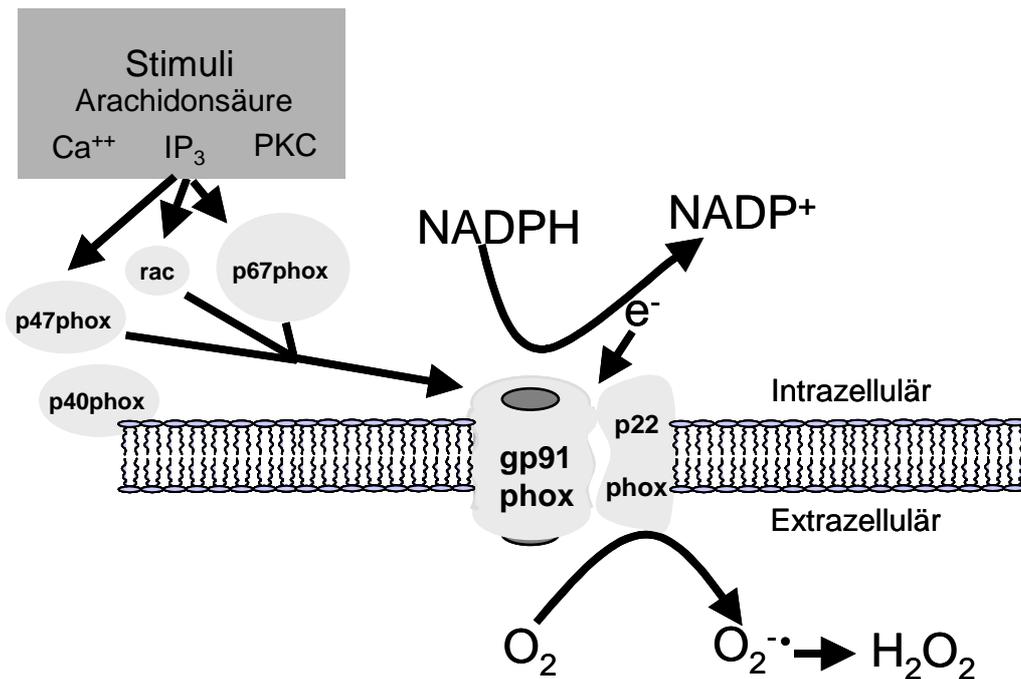


Abbildung 3: Schematische Darstellung der leukozytären NADPH-Oxidase

Stark vereinfachte Darstellung der leukozytären NADPH-Oxidase. Das in den Phagosomen vorkommende Enzym besteht aus dem membranären Cytochrom b558 Komplex, gebildet aus den Untereinheiten gp91phox, p22phox und einem Häm. Nach rezeptorgebundener Stimulation kommt es über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und einer Rac / PAK-abhängigen Phosphorylierung der zytosmatischen Komponenten p67phox und p47phox, zu deren Translokation an die membranären Untereinheiten. Hierdurch wird der Elektronentransfer von NADPH über FAD und FMN zu gp91phox und schließlich die Reduktion von Sauerstoff möglich.

1.2.2 Mitochondrien

Die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette stellen eine wesentliche Quelle von ROS im physiologischen Stoffwechsel dar (Turrens, 2003). Die Menge an ROS, die in den Mitochondrien gebildet wird, kann durch eine Vielzahl pathologischer Prozesse, einschließlich Hypoxie, Ischämie und Reperfusion, und auch durch verschiedene chemische Inhibitoren der Atmungskette gesteigert werden (Raha und Robinson, 2000) (Chen *et al.*, 2003).

Aufgebaut aus 5 Enzymen (Komplex I–V) und einem Cytochrom *c* (Cyt *c*) konnten verschiedene Entstehungsorte der ROS in den Mitochondrien identifiziert werden (Abbildung 4). Neben der NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), spielt der Cytochrom-*bc*₁ Komplex (Komplex III) die zentrale Rolle in der mitochondrialen ROS Generierung (Armstrong *et al.*, 2003).

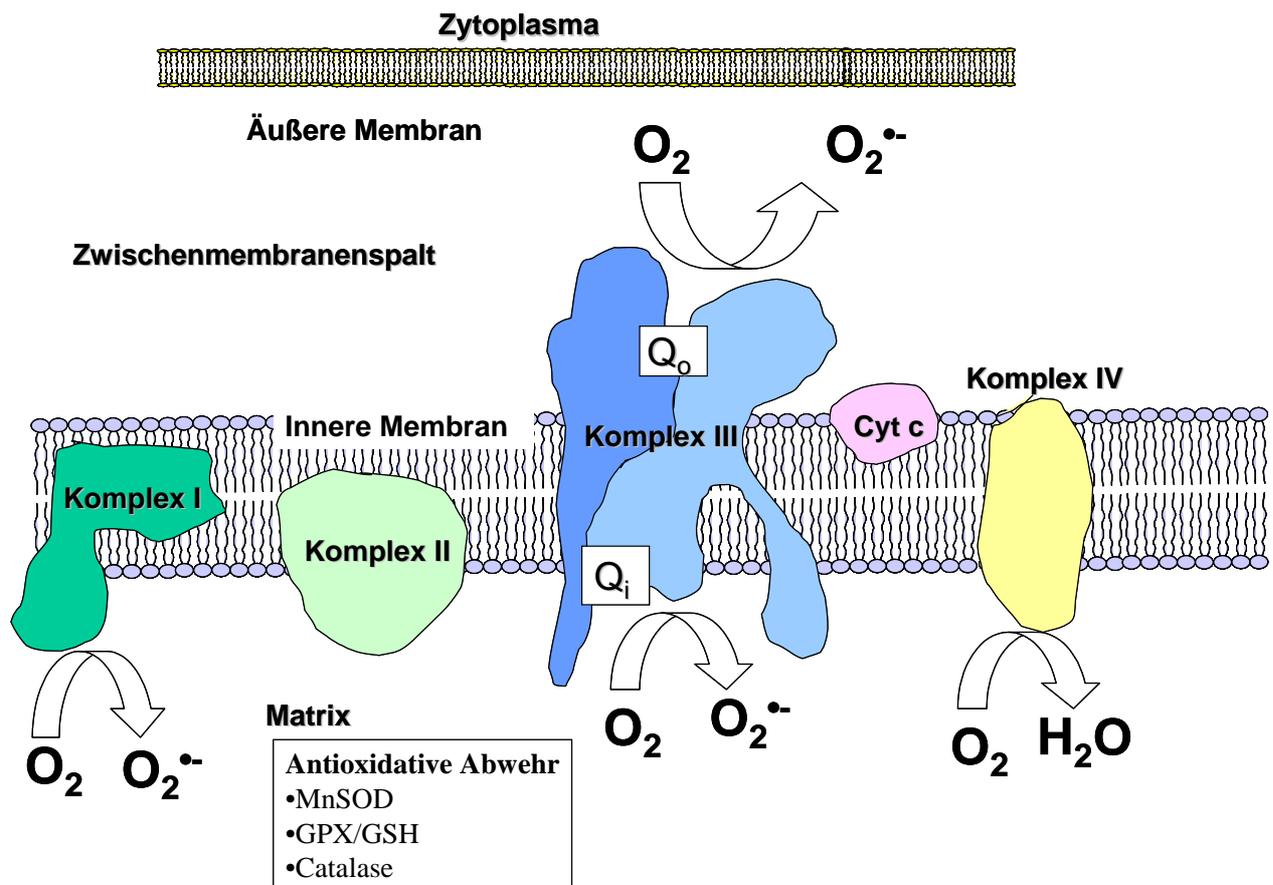


Abbildung 4: Entstehungsorte von ROS in der mitochondrialen Atmungskette

Die schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette zeigt, dass es sowohl an Komplex I, als auch an Komplex III im Bereich der Q_i-Seite zur O₂^{•-}-Bildung kommen kann. Diese ROS werden größtenteils von den antioxidativen Abwehrmechanismen der mitochondrialen Matrix, wie Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), Glutathion (GSH) und Glutathionperoxidase (GPX) abgefangen. Im Gegenteil dazu kann es an Komplex III zu einer O₂^{•-}-Bildung im Bereich der Q_o-Seite kommen. Diese werden dann in Richtung Zwischenmembranenspalte freigesetzt und sind demnach nicht für die antioxidativen Abwehrmechanismen der Matrix zugänglich, was zu einer Freisetzung von O₂^{•-} aus den Mitochondrien führen kann.

1.2.3 Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist ein in den Purin- und Pyrimidinstoffwechsel involviertes, im Zytosol vorkommendes Enzym, welches in zwei möglichen Formen, der Dehydrogenaseform (XDH, 80%) und der Oxidaseform (XO, 20%) vorkommt. Beide katalysieren den Abbau von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure (HS)

Die XDH verwendet oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) als Elektronenakzeptor. Während der Ischämiephase kann durch Thiol-Oxidation oder proteolytische Abspaltung eine Umwandlung der XDH-Form in die XO-Form erfolgen. XO ist ein dimeres, molybdän- und eisenhaltiges Flavoprotein. Anstelle von NAD^+ dient der XO molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor, wodurch es zur Bildung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$ kommt (Laakso *et al.*, 2004) (Harrison, 1997). Die somit gebildeten ROS werden unter anderem für die anschließend auftretenden endothelialen Schäden verantwortlich gemacht (Ullrich und Bachschmid, 2000).

1.2.4 Cytochrom P450

Die Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen sind membrangebundene Enzyme, die eine Häm-Gruppe enthalten. Sie sind Teil eines Multienzymkomplexes, der zusätzlich aus einer FAD/FMN enthaltenden NADPH:CYP-Reduktase und einem Cytochrom b_5 besteht.

Mit Hilfe verschiedener Kofaktoren übertragen CYP-Enzyme ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff (O_2) auf das entsprechende Substrat, wodurch dieses oxidiert oder peroxidiert wird (Abbildung 5) (Davydov, 2001). Einige CYP-Enzyme können auch eine Peroxidasereaktion ihres Substrates katalysieren und benötigen dann keinen molekularen Sauerstoff (White und Coon, 1980), (Puntarulo und Cederbaum, 1998).

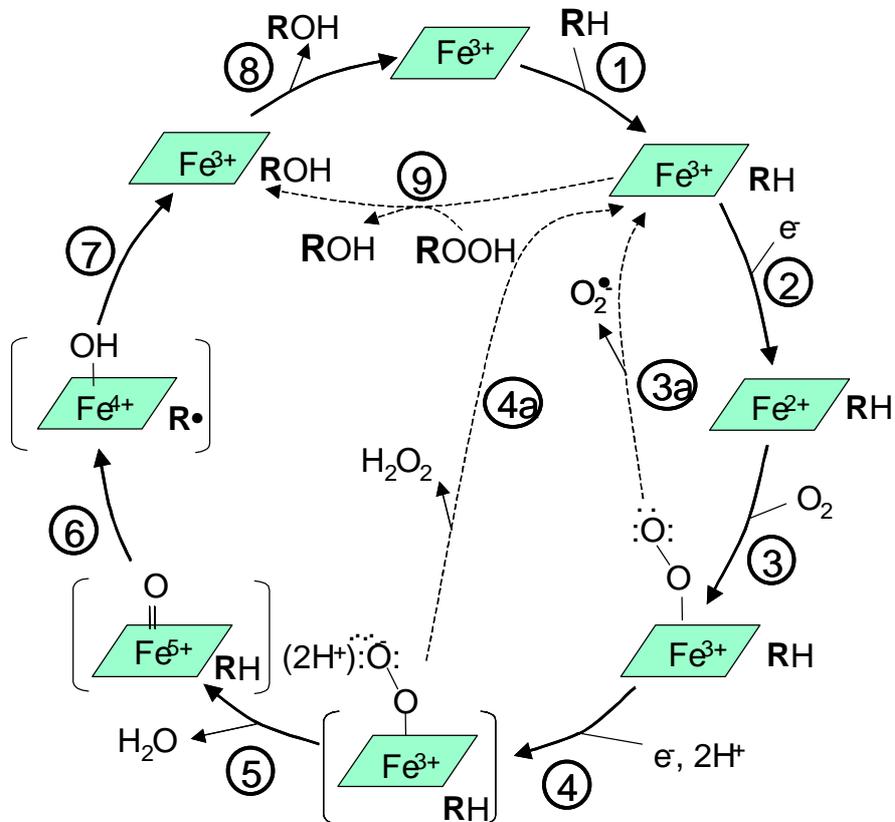


Abbildung 5: Reaktionszyklus der Cytochrom P450 Monooxygenasen.

Nach der Bindung des Substrates (R) an das aktive Zentrum der zentralen Häm-Gruppe (1) von der Cytochrom P450 NADPH-Reduktase wird ein Elektron (e^-) übertragen, das zur Reduktion des Eisen(III) zu Eisen(II) dient (2). Molekularer Sauerstoff wird an dieses Eisen(II) angelagert, wodurch es wieder zu Eisen(III) oxidiert wird (3). Bei diesem Schritt kann sich der Sauerstoff als Superoxidradikal ($O_2^{\bullet-}$) lösen (3a), wobei ein e^- am Eisen(III) verbleibt und der Zyklus wieder mit der Reduktion des zentralen Eisen(III) der Häm-Gruppe zu Eisen(II) beginnen kann. Kommt es zur Substratoxygenierung wird die Dioxygenbindung durch die Aufnahme eines zweiten e^- von der Reduktase (4) instabil und ein Sauerstoffatom wird in Form von Wasser abgespalten (5). Alternativ können sich auch aus diesem Zwischenprodukt reaktive Sauerstoffradikale (ROS) als H_2O_2 abspalten (4a), wodurch die Häm-Gruppe wieder zum Ausgangszustand vor der ersten Reduktion des Eisen(III) zurückkehrt. Nach der Wasserabspaltung ist das verbliebene Sauerstoffatom aktiviert und über eine Reihe sehr instabiler Zwischenprodukte (5-7) kommt es zur Hydroxylierung und zur Abspaltung des Substrates (8).

Peroxide als Substrat können in einer Art Kurzschlussreaktion auch in Abwesenheit von Reduktionsäquivalenten oder molekularem Sauerstoff durch CYP Enzyme hydroxyliert werden (9).

1.3 Antioxidativer Schutz

Um der schädigenden Wirkung von ROS zu entgehen, besitzt die Zelle antioxidative Schutzmechanismen. Neben unspezifischen Antioxidantien wie Vitaminen liegen in der Zelle spezifische ROS-abbauende Enzyme vor, die nicht nur bewirken, dass ROS unschädlich gemacht werden, sondern vielmehr ROS als elementaren Zwischenschritt in ihrer spezifischen Funktion nutzen (Elstner, 1990).

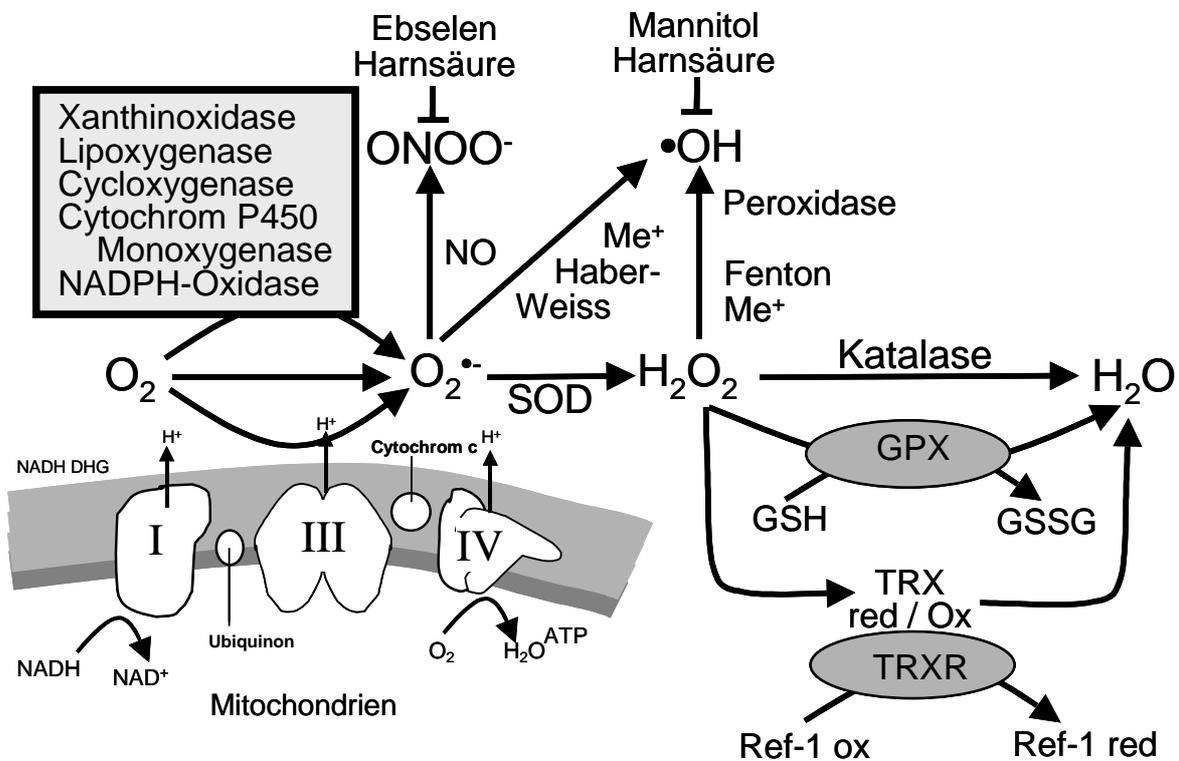


Abbildung 6: Physiologische antioxidative Abwehr

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind ein Nebenprodukt vieler physikalischer Vorgänge und enzymatischer Reaktionen im Körper. Neben unspezifischen Antioxidantien wie Vitaminen liegen in der Zelle spezifische ROS-abbauende Enzyme vor. Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Dismutation von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 , welches dann unter Katalase zu Wasser und Sauerstoff gespalten oder ebenfalls unter Oxidation von Glutathion (GSH) durch das Enzym Glutathionperoxidase (GPX) abgebaut wird, wobei Glutathiondisulfid (GSSG) und Wasser entsteht. Auch oxidiert H_2O_2 Thioredoxin (TRX) und wird über diesen Stoffwechselweg abgebaut. Für den Abbau von Hydroxylradikalen ($\bullet OH$), die durch Metallkatalyse (Me^+) aus $O_2^{\bullet-}$ (Haber-Weiss-Reaktion) bzw. aus H_2O_2 (FENTON⁻-Reaktion) entstehen, liegen in der Zelle keine spezifischen Enzyme vor. Die Reaktion von $\bullet OH$ mit wichtigen zellulären Komponenten, ähnlich wie die von Peroxynitrit ($ONOO^-$), kann nur durch unspezifische Radikalfänger verhindert werden.

1.3.1 Superoxiddismutase

Superoxiddismutase (SOD) katalysiert als einziges Enzym die Dismutation von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 (Gleichung 1). Diese Reaktion läuft 10.000fach schneller ab als die spontane Dismutation und wird lediglich durch die Diffusionsgeschwindigkeit vom Substrat zum Enzym limitiert (Halliwell und Gutteridge, 1984). Wenn $O_2^{\bullet-}$ nicht durch SOD abgefangen wird, reagiert es sehr schnell mit NO (Gleichung 2) und determiniert somit die NO-Bioverfügbarkeit (Fukai *et al.*, 2002). NO hat einen zentralen Stellenwert in der vaskulären Homöostase und wird als das wichtigste „antiarteriosklerotische Prinzip“ in der Gefäßwand angesehen (Napoli und Ignarro, 2001). SOD stellt somit, durch die Kontrolle von NO, das zentrale Element in der Aufrechterhaltung des vaskulären Redoxgleichgewichtes dar (Mugge *et al.*, 1991) (Muzykantov, 2001).

Bei Säugetieren können drei verschiedene Formen der SOD unterschieden werden. Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD) wird im Zytoplasma exprimiert, während die Mangan-SOD (MnSOD) nur in den Mitochondrien vorkommt. Neben den intrazellulären Formen der SOD existiert noch eine extrazelluläre SOD (ecSOD), die von den Zellen sezerniert wird und an die Glykokalix bindet (Marklund, 1990). Besonders in der Gefäßwand ist der Gehalt an ecSOD um ein vielfaches höher als im übrigen Gewebe, wobei die Expression von CuZnSOD und MnSOD in den Blutgefäßen vergleichsweise gering ist (Stralin *et al.*, 1995). Mit einem Anteil von bis zu 70% der SOD-Aktivität, spielt ecSOD somit eine entscheidende Rolle in der Regulation des vaskulären Redox-Status (Oury *et al.*, 1996).

1.3.2 Katalase

Katalase ist ein homotetrameres, Häm-tragendes Enzym. Das in den Zellorganellen lokalisierte Enzym spielt eine entscheidende Rolle als Regulator der H_2O_2 -Konzentration und wirkt als spezifische Peroxidase (Alberts *et al.*, 2002). Es kommt in fast allen Geweben von Säugetieren vor und ist besonders in den Peroxisomen der Leber konzentriert (Nordberg und Arner, 2001).

Die Hauptaufgabe der Katalase ist der Abbau von H_2O_2 , welches vor allem aus der Umsetzung von $\text{O}_2^{\bullet -}$ durch SOD (Gleichung 1) stammt (Nordberg und Arner, 2001). Katalase katalysiert die Disproportionierung von H_2O_2 zu O_2 und H_2O und führt damit zu einer direkten antioxidativen Abwehr. Bei sehr niedrigen H_2O_2 -Konzentration setzt Katalase aus H_2O_2 nicht O_2 frei, sondern reagiert wie eine Peroxidase. H_2O_2 wird dabei als Oxidationsmittel eingesetzt und dabei zu H_2O umgesetzt. So können Methanol und Äthanol über Aldehyde zur Säure oxidiert werden (Elstner, 1990).

Katalase besitzt eine außerordentlich Aktivität und mit einer Umsatzrate von $5 \cdot 10^6$ Molekülen pro Minute und ist damit fast so effektiv wie SOD. Trotzdem hat die Katalase, auf Grund der intrazellulären-mikrosomalen Lokalisation, im H_2O_2 -Stoffwechsel im Vergleich zum GPX/GSH-System nur eine untergeordnete Rolle (Yu, 1994).

1.3.3 Glutathionperoxidase

Glutathion ist eines der wichtigsten nicht-enzymatischen Abwehrsysteme in der Zelle (Tarpey *et al.*, 2004). Es existiert in einer hohen Konzentration von ca. 5 mmol/l in der Zelle und wechselt zwischen der reduzierten Thiolform (GSH) und der oxidierten Disulfidform (GSSG), in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die reduzierte Form (GSH) reagiert mit H_2O_2 zu organischen Peroxiden und wird dabei oxidiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutathionperoxidase (GPX) katalysiert (Stryer, 1994).

Die oxidierte Form (GSSG) kann nicht weiter antioxidativ reagieren und wird durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) kontinuierlich wieder zu GSH reduziert (Halliwell und Gutteridge, 1984).

1.3.4 Thioredoxin

Bei dem Thioredoxin (TRX)-System handelt es sich um ein ubiquitäres Thiol-Oxidoreduktase-System, welches TRX, Thioredoxinreduktase (TRXR) und NADPH beinhaltet. Es zählt wie Glutaredoxin und das Glutathion-System zu den Thiol-reduzierendem Mechanismen und trägt somit entscheidend zu der Regulation des Redox-Status der Zelle bei (Nordberg und Arner, 2001).

Der stärkste antioxidative Effekt geht von der TRX-Peroxidase (TRXP) aus, welche SH-Gruppen als reduzierendes Äquivalent nutzt. TRX reduziert die oxidierte Form der TRX-Peroxidase und diese reduzierte Form reagiert dann mit ROS (Yamawaki *et al.*, 2003).

Es konnten aktuell drei Formen des TRX identifiziert werden, das klassische TRX-1, welches im Zytosol vorkommt (Taniguchi *et al.*, 1996), TRX-2, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist (Spyrou *et al.*, 1997), und die dritte Form SpTRX, die ausschließlich in der Spermatozoen exprimiert ist (Miranda-Vizuete *et al.*, 2001).

1.3.5 Antioxidantien

Antioxidantien sind im engeren Sinne Substanzen, die ohne die Vermittlung von Enzymen mit freien Radikalen reagieren und diese abfangen können (*scavenger* = Abfänger). Die Wirksamkeit der Antioxidantien ist vor allem von deren Konzentration abhängig, da die Reaktionsgeschwindigkeit vergleichsweise gering sind.

Glutathion

Glutathion (GSH) ist an einer Vielzahl von zellulären Reaktionen beteiligt, die Hauptaufgabe besteht jedoch im Abfangen von ROS. Neben dem direkten antioxidativen Effekt ist GSH als Substrat der GPX indirekt über eine enzymatische Reaktion am Abbau von ROS beteiligt (Wu *et al.*, 2004) .

GSH ist mit einer intrazellulären Konzentration von 0,5-10 mmol/l das vorherrschende Thiol in der Zelle (Halliwell und Gutteridge, 1984; Yu, 1994). Der

größte Teil des GSH befindet sich im Zytoplasma (85-90%) und der Rest verteilt sich auf Mitochondrien, Zellkern und Peroxisomen (Lu, 2000).

Vitamin E

Vitamin E ist der Oberbegriff für eine Gruppe biologisch aktiver, lipidlöslicher Komponenten, zu denen Tocopherole und Tocotrienole zählen. α -Tocopherol ist die vorherrschende Substanz im Plasma und spielt eine bedeutende Rolle als Antioxidants zum Schutz von Lipoproteinen (Spencer *et al.*, 1999). Es kann sich in Membranen einlagern und dort die Lipidperoxidation hemmen (Esterbauer *et al.*, 1991). Des weiteren ist γ -Tocopherol ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe, welches im Abfangen von ONOO^- und anderen ROS effektiver zu sein scheint (Hoglen *et al.*, 1997).

Neben dem antioxidativem Effekt hat Vitamin E noch eine Vielzahl von präventiven Funktionen in der Pathogenese der Atherosklerose (Antoniades *et al.*, 2003).

Vitamin C

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist das wichtigste wasserlösliche Antioxidants. Es reduziert $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und wird dabei selbst oxidiert (Smirnov und Pallanca, 1996). Die dabei entstandene Dehydroascorbinsäure wird durch Glutathion wieder zu nativer Ascorbinsäure reduziert und das entstandene H_2O_2 kann durch Katalase oder GSH entgiftet werden (Spencer *et al.*, 1999). Vitamin C spielt auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des antioxidativ-wirksamen Vitamin E, indem es das nach Oxidation entstandene Tocopherylradikal wieder reduziert (Nuttall *et al.*, 1999).

Harnsäure

Harnsäure ist ein effektives Antioxidants für ONOO^- und $\bullet\text{OH}$ und gehört bei einer Konzentration von bis zu 300 $\mu\text{mol/l}$ im Blutplasma zu den wesentlichen extrazellulären *scavenger*-Molekülen (Frei, 1999).

1.4 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen

Die Messung der vaskulären Bildung von $O_2^{\bullet-}$ ist aus verschiedenen Gründen problematisch. Eine sehr niedrige intrazelluläre Steady-State Konzentrationen von ca. 1 nmol/l ist das Ergebnis der Balance zwischen der endogenen unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu $O_2^{\bullet-}$ und dem Abfangen von $O_2^{\bullet-}$ durch hocheffiziente zytoplasmatische und mitochondriale SODs (Brawn und Fridovich, 1980) (Cadenas und Davies, 2000). Zusätzlich verbleiben auch die durch membrangebundene Oxidasen gebildete ROS auf Grund der im Serum und extrazellulär vorkommenden antioxidativen Komponenten, einschließlich der niedermolekularen Radikalfänger und der ecSOD, in nur sehr niedrigen Konzentrationen (Halliwell, 1995) (Skulachev, 1997) (Marklund und Karlsson, 1990).

Folglich erfordern sowohl eine relativ kurze Halbwertszeit der ROS von wenigen Sekunden, als auch die Effizienz und der Überfluss von „scavenger“ Systemen eine Messtechnik, die sensitiv genug sein muss, um mit den intra- und extrazellulären antioxidativen Komponenten konkurrieren zu können. Außerdem müssen Methoden zur Messung von ROS einen ausreichenden intrazellulären Zugriff haben, um die intrazellulären Bedingungen genau widerspiegeln zu können (Tarpey *et al.*, 2004).

Nicht zuletzt erschwert eine überlappende Reaktivität von ROS mit dem Messsystem die eindeutige Identifizierung und Mengenbestimmung der entsprechenden Substanz.

1.4.1 Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz (CL)-Methode wird auf Grund der Zellpermeabilität der meisten Substanzen, der Spezifität für $O_2^{\bullet-}$ und der hohen Sensitivität im Vergleich zu chemischen Methoden häufig für die Detektion von intrazellulären $O_2^{\bullet-}$ eingesetzt (Tarpey und Fridovich, 2001). Bei Kontakt mit $O_2^{\bullet-}$ setzen die CL-Verstärker ein Photon frei, welches mittels Luminometer gemessen werden kann (Munzel *et al.*, 2002).

Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz

Lucigenin (bis-*N*-methylacridinium) ist der am häufigsten verwendete CL-Verstärker. Lucigenin wird durch $O_2^{\bullet-}$ in ein Kationenradikal reduziert, welches mit einem weiteren $O_2^{\bullet-}$ reagiert. Aus dieser Reaktion entsteht ein energiereiches Dioxetan Molekül, welches das Photon emittiert. Die Quantifizierung der Lucigenin-Methode wurde in Frage gestellt, als im Vergleich zu anderen Methoden grundsätzlich mit Lucigenin eine höhere $O_2^{\bullet-}$ -Produktion ermittelt wurde (Janiszewski *et al.*, 2002): Diese Tatsache wird auf Redox Cycling zurückgeführt, wobei das Kationenradikal, anstatt mit einem weiteren $O_2^{\bullet-}$ mit molekularem Sauerstoff reagiert und dadurch ein weiteres $O_2^{\bullet-}$ entsteht. Besonders bei hohen Konzentrationen von Lucigenin kann dieses Phänomen beobachtet werden, es spielt jedoch bei einer Konzentration von weniger als 20 $\mu\text{mol/l}$ so gut wie keine Rolle mehr (Tarpey *et al.*, 1999).

Coelenterazin- verstärkte Chemilumineszenz

Coelenterazin ist ein zellpermeabler Enhancer. Im Gegensatz zu Lucigenin konnte bei dem Einsatz von Coelenterazin kein Redox Cycling festgestellt werden. Allerdings reagiert es neben $O_2^{\bullet-}$ auch mit $ONOO^-$, was den Einsatz von spezifischen Abfängern oder Hemmstoffen notwendig macht, um eine genaue Aussage über die CL erzeugende Substanz machen zu können (Tarpey *et al.*, 1999).

Luminol-verstärkte Chemilumineszenz

Luminol vermittelte CL wird durch verschiedene ROS ausgelöst, einschließlich $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 und $ONOO^-$. Aus diesem Grund ist ebenfalls der Einsatz von spezifischen Inhibitoren notwendig, um festzustellen welche Radikale für das Signal verantwortlich sind (Munzel *et al.*, 2002).

1.4.2 Fluorimetrische Assays

ROS können in kultivierten Zellen und auch in präparierten Geweben unter Verwendung verschiedener fluoreszierender Substanzen dargestellt werden. Für die direkte bildliche Darstellung kann ein konfokales Mikroskop verwendet werden. Die bildgebenden Methoden sind semiquantitativ, geben aber Aufschluss über die topografische Lokalisation der ROS. Für ein quantitatives Ergebnis kann die Analyse auch in einem Mikrotiterplattenfluorimeter oder mittels FACS-Analyse (Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer) durchgeführt werden. Es gibt verschiedene etablierte Substanzen für die Detektion von ROS:

Dichlorodihydrofluorescein-diacetate

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H_2 -DCF-DA) ist die am häufigsten genutzte Fluoreszenzprobe. Nach der Aufnahme in die Zelle wird die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein (H_2 -DCF) wird durch ROS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Hempel *et al.*, 1999). Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm kann die Fluoreszenz von DCF bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert werden (Halliwell und Whiteman, 2004). Die Reaktion von H_2 -DCF ist nicht spezifisch und liefert Fluoreszenzantworten auf die Reaktion mit unterschiedlichsten Substanzen (Jakubowski und Bartosz, 2000). Neben der Autooxidation des H_2 -DCF, stellen die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 aus der Reaktion von H_2 -DCF mit Peroxiden und die Reaktion von H_2 -DCF mit intrazellulären Peroxidasen (LeBel *et al.*, 1992) Probleme in der qualitativen Messung von ROS dar.

Ein weiterer limitierender Faktor bei der Detektion von ROS ergibt sich aus der nur kurzzeitigen intrazellulären Retention der oxidierten Form (DCF) in der Zelle (Swift und Sarvazyan, 2000).

Um das schnelle Herausströmen aus der Zelle der Substanzen zu umgehen, sind Fluorescein-Derivate auf dem Markt, wie z.B. 5',6'-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate, welches eine bessere intrazelluläre Retention vorweist und somit auch eine stärkere zellgebundene Fluoreszenz besitzen sollen (Hempel *et al.*, 1999).

Dihydroethidium

Dihydroethidium (DHE) ist eine zellpermeable Substanz, die mit $O_2^{\bullet-}$ zu Ethidium reagiert, welches im Zellkern mit der DNA interkaliert. Bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm kann die Fluoreszenz im Zellkern dargestellt werden. DHE ist relativ spezifisch für $O_2^{\bullet-}$, kann aber auch mit $\bullet OH$ und H_2O_2 reagieren (Munzel *et al.*, 2002) und besitzt wie Lucigenin und H_2 -DCF unter bestimmten Bedingungen eine Tendenz zum Redox Cycling (Rota *et al.*, 1999a) (Zhao *et al.*, 2003).

1.4.3 Photometrische Verfahren

Cytochrom c Reduktion

Die Reduktion von Ferricytochrom c ($Fe^{3+}Cyt\ c$) zu Ferrocycytochrom c ($Fe^{2+}Cyt\ c$) ist eine etablierte Methode, um die $O_2^{\bullet-}$ -Bildung vieler Enzyme in Zellen und auch in Gewebeteilen zu bestimmen. Diese Reduktion des $Fe^{3+}Cyt\ c$ bewirkt eine Absorptionzunahme, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden kann. Mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz lässt sich die Menge des gebildeten $Fe^{2+}Cyt\ c$ bzw. des entsprechenden Reduktionsmittels quantifizieren (Murrant und Reid, 2001). Aufgrund der fehlenden Zellpermeabilität von Cytochrom c

(Cyt c) findet nur eine Messung der extrazellulär vorliegenden $O_2^{\bullet-}$ statt (Munzel *et al.*, 2002).

Die Reduktion von Cyt c ist allerdings nicht spezifisch für $O_2^{\bullet-}$. Verschiedene Komponenten in den Zellen und im Gewebe können Cyt c direkt reduzieren oder die Reduktion enzymatisch katalysieren. Es ist daher notwendig, durch Zugabe von SOD den $O_2^{\bullet-}$ -spezifischen Anteil der $O_2^{\bullet-}$ -vermittelten Reduktion zu bestimmen. Des Weiteren kann reduziertes Cyt c durch Cytochrom-Oxidasen, zelluläre Peroxidasen und durch Oxidationsmittel wie H_2O_2 oder $ONOO^-$ wieder oxidiert werden. Der bestimmte Anteil an $O_2^{\bullet-}$ liegt somit unter der tatsächlich gebildeten Menge. Dieser Nachteil kann mit der Zugabe entsprechender Enzyminhibitoren bzw. ROS-Abfängern vermieden werden (Tarpey und Fridovich, 2001).

Eine höhere Spezifität von Cyt c kann durch die Acetylierung des Substrates erzielt. Die Acetylierung mit Lysin verringert den direkten Elektronen-Transfer der Mitochondrien und der mikrosomalen Reduktase auf Cyt c und von Cyt c auf die Cytochrom-Oxidase, während die Reaktionsbereitschaft zu $O_2^{\bullet-}$ unverändert bleibt (Tarpey *et al.*, 2004).

NBT-Reduktion

Nitroblautetrazolium (NBT) wird durch $O_2^{\bullet-}$ zu dem blauvioletten, schwerlöslichen Farbstoff Formazan reduziert. Die Entstehung von Monoformazan (NBT^+) kann spektralphotometrisch bei 570 nm verfolgt werden (Elferink, 1984). Die Bildung von NBT^+ erfolgt über zwei Reaktionsschritte, wobei die dabei entstehenden Zwischenprodukte nicht spezifisch mit ROS reagieren. Des Weiteren zeigt NBT unter aeroben Bedingungen auch die Tendenz zum Redox Cycling (Tarpey und Fridovich, 2001).

Als Nachweis für die Fähigkeit der Leukozyten zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$ erlangte die NBT-Reduktion klinische Bedeutung (Van und Herman, 1987).

1.4.4 Elektronen Spin Resonanz und Spin Trapping

Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), auch bezeichnet als Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR), ist aktuell eine der spezifischsten Methoden zum Nachweis von Radikalen.

Es handelt sich um ein Spektroskopie-Verfahren im Mikrowellenbereich, das zur Strukturuntersuchung verschiedener paramagnetischer Substanzen verwendet werden kann. Als paramagnetisch werden Substanzen bezeichnet, die auf Grund des Drehimpulses der Elektronen oder der Kernspins ein magnetisches Moment haben und deshalb auf äußere Magnetfelder reagieren können. Im wesentlichen sind das Stoffe, die unpaarige Elektronen enthalten. Der Spin solcher Elektronen wird nicht vom gegensätzlich ausgerichteten Spin eines anderen Elektrons kompensiert und kommt deshalb als magnetisches Moment makroskopisch zur Geltung (Weil *et al.*, 1994).

ESR misst die resonante Absorption elektromagnetischer Strahlung durch die magnetischen Momente ungepaarter Elektronen in einer Probe als Funktion eines äußeren Magnetfeldes. Die erhaltenen Spektren sind für die entsprechenden Radikale charakteristisch (Tarpey *et al.*, 2004).

ROS haben paramagnetische Eigenschaften und sind deshalb grundsätzlich ein geeignetes Substrat für die Bestimmung mit der ESR Spektroskopie. Die Halbwertszeit der meisten freien Radikale ist allerdings zu kurz, um ausreichende Konzentrationen für die ESR Spektroskopie zu erhalten (Munzel *et al.*, 2002).

Aus diesem Grund wird die Spin-Trapping-Technik eingesetzt. Bestimmte diamagnetische Substanzen, so genannten Spinfallen (*engl. spin trap*), reagieren mit freien Radikalen zu einem relativ stabilen Produkt, dem Spinaddukt (Valgimigli *et al.*, 2001). Dieses kann mit Hilfe des ESR erfasst werden. Das Spektrum, das für ein solches Addukt gemessen wird, ist dabei sowohl von der Art des Spintrap-Moleküls, als auch von den Eigenschaften des gebundenen Radikals abhängig. Gebräuchliche *spin traps* sind die Nitronderivate, wie das 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) und das 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO) (Munzel *et al.*, 2002). Das gebildete Spinaddukt ist jedoch besonders in Anwesenheit von

Reduktionsmitteln anfällig in eine für das ESR inaktive Form reduziert zu werden. Zyklische Hydroxylamine wie 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-HCl (CMH) reagieren mit $O_2^{\bullet-}$ und $ONOO^-$, wobei das gebildete Spinaddukt weniger reaktiv mit zellulären Reduktionsmitteln ist.

2. Ziel der Arbeit

Die Untersuchungen über Bildung und Wirkung von ROS in biologischen Systemen werden durch die Schwierigkeiten der Messung von ROS in lebenden Zellen und Geweben erschwert. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Methoden, die aber alle Mängel in Sensitivität, Spezifität und auch in der Validierung aufweisen (Munzel *et al.*, 2002). Viele Untersuchungsmethoden sind nicht quantitativ auf Grund von Redox Cycling oder komplexer Sekundärreaktionen, die einen entscheidenden Einfluss auf das Endergebnis haben können (Rota *et al.*, 1999b).

Dihydrocalcein (H_2 -Calcein) ist eine neue von Molecular Probes angebotene Substanz, die auch zum Nachweis von ROS dienen soll. Eine Validierung diesbezüglich ist noch nicht durchgeführt worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, H_2 -Calcein als neuen intrazellulären Indikator für ROS zu validieren und speziell in dessen Sensitivität und Spezifität gegenüber ROS mit dem bereits etablierten H_2 -DCF-DA zu vergleichen und mögliche Vorteile des Indikators auszuarbeiten.

3. Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Zellkultur

Rattenglattemuskelzellen (RSMC) wurden von Tebu (Frankfurt, Deutschland) bezogen und in Minimal Essential Medium (MEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert.

Die Durchführung aller Experimente erfolgte mit Zellen unter serumfreien Bedingungen (24 Stunden, MEM + 0,1% Serumalbumin vom Rind, Streptomycin 100 U/ml und Streptomycin 50 µg/ml). Die RSMC wurden zwischen Passage 6 und 12 und bei einer Konfluenz von 70% eingesetzt.

3.1.2 Präparation von submitochondrialen Partikeln (SMP)

SMP's aus Rinderherzmitochondrien wurden freundlicherweise von Dr. Dröse und Prof. Brandt (Institut für Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt und in Präparationspuffer (75 mmol/l Na-Phosphat, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l MgCl₂, pH 7.4) resuspendiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Lowry (Waterborg und Matthews, 1994) und betrug 26,8 mg/ml. Der Gehalt an Cytochrom *b* und *a/a₃* betrug 17,24 µmol/l beziehungsweise 19,78 µmol/l.

3.1.3 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter Verwendung des Spintraps 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-HCl (CMH). Hierfür wurden RSMC auf 6 cm Platten kultiviert und bei einer Konfluenz von 70% mit Angiotensin II (A II,

100 nmol/l) stimuliert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit speziellem ESR Puffer (HEPES-Tyrode (NaCl 132 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, MgCl₂ 1,0 mmol/l, CaCl₂ 1,0 mmol/l, HEPES 10,0 mmol/l, Glucose 5,0 mmol/l, NaH₂PO₄ 0,36 mmol/l, pH 7,4 bei 37°C), metallionenfrei durch Zugabe der Chelatoren Chelax-100 5 g/l und Diethylenetriaminepentaacetat (DTPA, 100 µmol/l)) erfolgte die Inkubation mit 1ml ESR Puffer bei 37°C für 30 Minuten. CMH wurde in mit Argon begaster 0,9% NaCl-Lösung gelöst und in einer Endkonzentration von 2 mmol/l zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min bei 37°C, wurden 400 µl des Überstandes in Teflon-Küvetten in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Messungen des Spinadduktes erfolgte mit einem EPR-EMX Elektronenspinresonanz-Spektrometer der Firma Bruker bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,468 GHz, einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Temperatur von 77 K unter Verwendung von Dewargefäßen, die mit flüssigen Stickstoff gekühlte wurden.

3.1.4 Hydrolytische Spaltung von H₂-DCF-diacetat und H₂-Calcein-acetylmethylester

H₂-DCF und H₂-Calcein werden als Diacetat- (DA) bzw. Acetylmethylester (AM) bezogen. Diese Substanzen werden schnell von den Zellen aufgenommen und die Ester werden sofort von zellulären Esterasen im Zytoplasma abgespalten. Hydrolysiert können die Substanzen dann weiter reagieren. Für die *in vitro* Studien ist es notwendig, beide Substanzen vor dem Experiment chemisch zu hydrolysieren, damit sie mit ROS reagieren können.

Die Esterabspaltung erfolgte nach der Methode von Cathcart et al (Cathcart *et al.*, 1983). Hierfür wurde je 1 Teil H₂-DCF-DA oder H₂-Calcein-AM Lösung (1 mmol/l in Methanol) mit 4 Teilen NaOH-Lösung (0,01 mol/l, sauerstofffrei durch Begasung mit Argon) gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 20 Teilen Kaliumphosphatpuffer (25 mmol/l, pH 7,4, sauerstofffrei). Anschließend wurden die

Substanzen auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Konzentration von H₂-DCF und H₂-Calcein betrug in diesem Ansatz 0,04 mmol/l.

Für die Experimente mit SMPs war eine Endkonzentration von jeweils 100 µmol/l notwendig. Hierzu wurden je 3 Teile H₂-DCF-DA oder H₂-Calcein-AM Lösung (3 mmol/l in Methanol) mit 20 Teilen NaOH-Lösung (0,01 mol/l, sauerstofffrei) gemischt und ebenfalls bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Nach der Neutralisierung dieser Mischung mit 0,002 Teilen HCl (1 mol/l), erfolgte das Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 12 Teilen Kaliumphosphatpuffer (100 mmol/l, pH 7,4) und Lagerung auf Eis. Die Konzentration von H₂-DCF und H₂-Calcein betrug in dieser Mischung 0,2 mmol/l.

Der pH-Wert lag in allen Mischungen bei 7,4.

3.1.5 In vitro Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

In diesem Experiment wurde die Oxidation der beiden Fluoreszenzsubstanzen durch ONOO⁻, H₂O₂, HRP und NO, freigesetzt von DEA-NONOate untersucht.

Dazu wurde hydrolysiertes H₂-DCF oder H₂-Calcein (5 µmol/l, gelöst in sauerstofffreien Phosphatpuffer) in An- oder Abwesenheit der Testsubstanzen in Eppendorf-Tubes in einem Endvolumen von 300 µl angesetzt. Die Messung der Fluoreszenz von DCF und Calcein erfolgte in einer 96-Well-Platte (Endvolumen des jeweiligen Reaktionsgemisches: 200 µl) in einem Mikrotiterplattenfluorimeter (Victor, Wallac-ADL). Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und die Emissionswellenlänge 515 nm.

3.1.6 Intrazelluläre Retention der fluoreszierenden Substanzen

Um den Verbleib der hydrolysierten und oxidierten Fluorochrome in der Zelle zu vergleichen, wurden RSMC in einer 12-Well-Platte kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit HEPES-Tyrode einmal gewaschen und anschließend mit

dem jeweiligen Farbstoff für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Um sicher zu stellen, dass die Zellen mit identischen Konzentrationen des jeweiligen Fluorochroms beladen wurde, wurde H₂-DCF-DA (Stammlösung 10 mmol/l in DMSO) auf eine Endkonzentration von 10 µmol/l und H₂-Calcein-DA (Stammlösung 2 mmol/l in DMSO) auf 2 µmol/l in HEPES-Tyrode verdünnt und anschließend 500 µl dieser Lösung pro Well auf die Platte pipetiert.

Nach der Inkubationszeit von 20 Minuten wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit HEPES-Tyrode gewaschen und direkt mit HEPES-Tyrode (300 µl) bei 37°C im Dunkeln für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Die Lagerung des Überstandes mit DCF und Calcein, welches aus den Zellen herausgeleckt ist (extrazellulär), erfolgte im Dunkeln auf Eis. Die Zellen wurden im Anschluss noch einmal gewaschen und durch die Zugabe von 300 µl destillierten Wasser lysiert. Der Anteil von DCF und Calcein in dem Lysat entspricht dem intrazellulären Anteil, welcher nicht aus der Zelle geleckt ist. Die Messung der Fluoreszenz des extrazellulären und des intrazellulären Anteils erfolgte in einer 96-Well-Platte (300 µl) in einem Mikrotiterplattenfluorimeter.

3.1.7 Redox Cyclers

Durch Einsatz eines Redox Cyclers, der zu einem intrazellulären Anstieg von ROS führt, konnte die Reaktion von H₂-DCF und H₂-Calcein mit intrazellulären ROS bestimmt werden. Die auf 12-Well-Platten kultivierten RSMC wurden einmal mit HEPES-Tyrode gewaschen und anschließend mit H₂-DCF-DA und H₂-Calcein-AM in An- und Abwesenheit von dem Redox Cycler 2,3-Dimethoxy-1,4-Naphthoquinone (DMNQ) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung fand im Mikrotiterplattenfluorimeter im Abstand von 10 Minuten über einen Zeitraum von 120 Minuten statt. Nach Subtraktion der Fluoreszenz der leeren 12-Well-Platte von den Messwerten, wurden die mit DMNQ stimulierten Zellen gegen die nicht stimulierten über die Zeit aufgetragen.

3.1.8 Basale und Agonisten-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

RSMC wurden in 12-Well-Platten kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und durch frisches Medium (MEM + 0,1% BSA) mit und ohne A II (100 nmol/l) ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Zellen einmal mit HEPES-Tyrode gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit H₂-DCF-DA und H₂-Calcein-AM verdünnt in HEPES-Tyrode inkubiert. Die Messung der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen in einem Endvolumen von 500 µl HEPES-Tyrode im Mikrotiterplattenfluorimeter. Die Hintergrundfluoreszenz der leeren 12-Well-Platte wurde von jedem Messwert subtrahiert.

In einigen Experimenten erfolgte eine Visualisierung der Zellen im konfokalen Mikroskop unter Verwendung des 40fachen Objektivs und einer Pinhole-Einstellung von 3 Einheiten.

Für Studien mit dem NADPH-Oxidase-Hemmstoff gp91ds-TAT wurden die Zellen 4 Stunden vor Stimulation mit A II nach Erneuerung des serumfreien Mediums mit dem Peptid (100 µmol/l) inkubiert. Der Einsatz von DPI (10 µmol/l) erfolgte während der Stimulation mit A II für die letzten 30 Minuten der Inkubationszeit.

3.1.9 Fluoreszenzmessung im konfokalen Mikroskop

Zur Bestimmung der Lokalisation des akkumulierten DCF und Calcein in der Zelle, wurden RSMC auf Collagen-beschichteten Glasdeckgläschen (9x9 mm) in 24-Well-Platten kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit HEPES-Tyrode erfolgte die Inkubation der Zellen mit H₂-DCF-DA, H₂-Calcein-AM oder Mitotracker grün (1 µmol/l) in HEPES-Tyrode bei 37°C für 20 Minuten. Die Glasdeckgläschen wurden in eine mit 500 µl HEPES-Tyrode gefüllten Messkammer überführt und im Mikroskop unter Verwendung des 40fachen Ölimmersionsobjektivs gemessen. Die Belichtungszeit wurde kurz gewählt werden, um die Fotooxidation der Farbstoffe möglichst gering zu halten.

3.1.10 Hemmung der mitochondrialen Atmungskette

Um die mitochondriale Atmungskette zu hemmen, wurden RSMC auf 12-Well-Platten kultiviert. Nach dem Erneuern des serumfreien Mediums, erfolgte die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Hemmstoffen für 30 Minuten.

Zur Hemmung des Komplexes I wurde Rotenon (10 $\mu\text{mol/l}$), ein Antagonist des Semichinon-Zwischenproduktes verwendet. Der Komplex III wurde durch Antimycin A (1 $\mu\text{mol/l}$), Stigmatellin (100 nmol/l) und Myxothiazol (100 nmol/l) gehemmt. Während Antimycin A den Komplex III auf der Q_i -Seite (Matrix) hemmt, wirken Stigmatellin und Myxothiazol an der Q_o -Seite (Zwischenmembranenraum).

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit HEPES-Tyrode gewaschen, bevor die Zellen mit $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ und $\text{H}_2\text{-Calcein-AM}$ für 20 Minuten beladen wurden. Anschließend wurden die Zellen noch einmal gewaschen und dann mit Volumen von 500 μl HEPES-Tyrode im Mikrotiterplattenfluorimeter gemessen.

3.1.11 Bestimmung der NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase Aktivität in SMP

Die NADH:n-decylubiquinone (DBQ) Aktivität wurde anhand des NADH Verbrauchs in einem Phosphatpuffer (25 mmol/l Kaliumphosphat, 2 mmol/l KCN, pH 7.4 bei 30° C) mit 1,34 μg SMPs unter Verwendung eines SpectraMax® Plus³⁸⁴ Mikrotiterplattenfluorimeter gemessen. Das Endvolumen betrug 200 μl je Well. Die Wellenlänge der Lösung in den Mikrotiterplatten wurde gemessen und normalisiert. DBQ (100 $\mu\text{mol/l}$) und NADH (100 $\mu\text{mol/l}$) wurden als Substrate verwendet und die NADH Oxidationsrate wurden mit $\epsilon_{340-400\text{nm}}=6.1 \text{ mmol/l}^{-1}\text{cm}^{-1}$ unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an $\text{H}_2\text{-DCF}$ und $\text{H}_2\text{-Calcein}$ bestimmt. Da diese Substanzen in einem Puffer mit einem höheren Gehalt an Methanol hydrolysiert wurden, wurden entsprechende Volumina diesen Puffers (ohne die Substanzen) zu den Kontrollen dazugegeben und die erhaltenen Ergebnisse wurde auf 100% gesetzt.

3.2 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte +/- des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels des gepaarten oder des ungepaarten Student's t-Test oder mit der Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-t-Test durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Chemische Eigenschaften von H₂-DCF und H₂-Calcein

Um die Eignung von H₂-Calcein als Probe zur Messung von ROS zu beurteilen, wurde dessen Reaktivität mit verschiedenen Komponenten in einem *in vitro* Experiment untersucht und mit der von H₂-DCF verglichen. In diesem Versuch zeigten beide Proben sehr ähnliche Reaktivität.

Peroxynitrit (ONOO⁻) oxidierte sowohl H₂-DCF als auch H₂-Calcein schon in sehr geringen Konzentration von 0,1 µmol/l (Abbildung 7, A).

Hingegen waren relativ hohe Konzentration des NO-Donors DEA-NONOate (100 µmol/l) notwendig, um einen Anstieg der Fluoreszenz von H₂-DCF und H₂-Calcein zu bedingen. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt, als der von ONOO⁻. Es besteht die Möglichkeit, dass die durch den NO Spender DEA-NONOate vermittelte Oxidation der Proben auf Grund einer Akkumulation von ONOO⁻ (Abbildung 7, B) der Bildung von NO oder von reaktiven NO⁻, welche als Folge von relativ hohen Konzentration des NO-Spenders entstehen können (Wang *et al.*, 2002), vermittelt war.

Mit Peroxidase (HRP) konnte bei sehr geringen Konzentration von 0,1 mU/ml ein Anstieg der Fluoreszenz, sowohl von H₂-DCF als auch H₂-Calcein, beobachtet werden (Abbildung 7, C). Dieser Effekt war unabhängig von der Anwesenheit von H₂O₂ und ist daher nicht durch •OH vermittelt, obgleich •OH in der Lage ist H₂-DCF zu oxidieren. H₂O₂ alleine zeigte, selbst in einer hohen Konzentration von 100 µmol/l, keinen Effekt auf die Oxidation von H₂-DCF als auch H₂-Calcein.

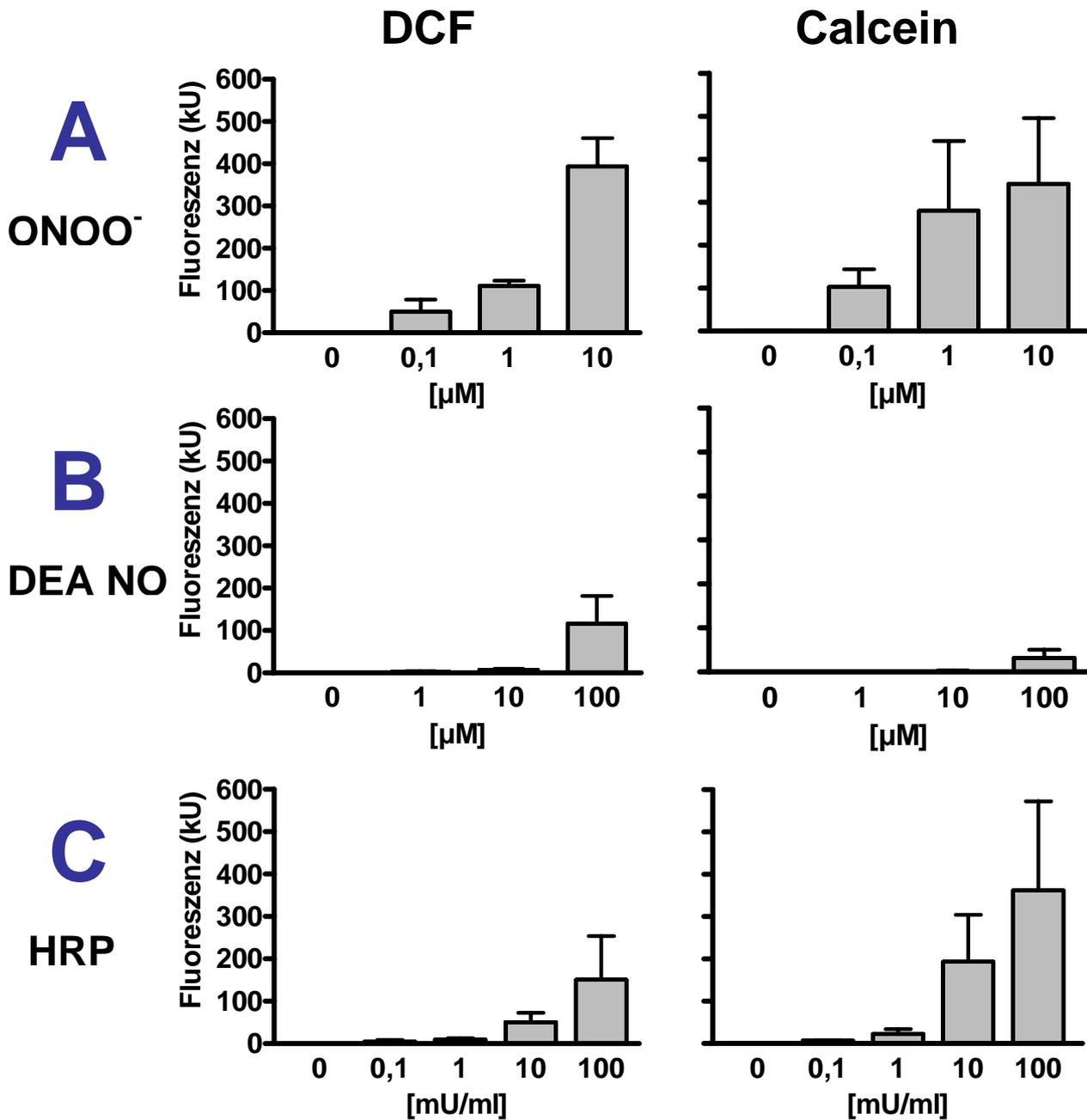


Abbildung 7: Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein *in vitro*

H₂-DCF-DA (5 μmol/l) und H₂-Calcein (5 μmol/l) wurden mit NaOH-Lösung hydrolisiert. Die Anreicherung der oxidierten Produkte DCF und Calcein wurde in Phosphatpuffer (25 mmol/l) unter Verwendung einer Mikrotiterplattenfluorimetrie (Fluoreszenz angegeben in arbitrary kilo units, kU) gemessen. Appliziert wurden verschiedene Konzentrationen von Peroxynitrit (ONOO⁻, A), DEA-NONOate (DEA NO, B) und Peroxidase (HRP, C). Mittelwerte ± S.E.M., n=3. P < 0,05 vs Kontrolle

4.2 Intrazelluläre Retention von Calcein und DCF

Um die Retention von DCF und Calcein in der Zelle zu untersuchen, wurde nach dem Beladen mit H₂-DCF-DA und H₂-Calcein-AM die Akkumulation beider Proben sowohl im Medium als auch in der Zelle verglichen.

Auch wenn dieser Ansatz dadurch kompliziert wird, dass die Menge an oxidierten Proben sowohl im extra- als auch im intrazellulären Kompartiment während des gesamten Versuches kontinuierlich ansteigt, kann eine Aussage über die Membranpermeabilität getroffen werden. Um diese exakt beurteilen zu können, müsste jedoch bereits fluoreszierendes DCF und Calcein direkt in die Zelle injiziert werden, um anschließend den Ausstrom direkt zu beurteilen.

DCF strömt sehr schnell aus der Zelle und sammelt sich hauptsächlich im extrazellulären Raum an. Intrazellulär beträgt die Halbwertszeit nur 10 Minuten und nach 20 Minuten bleibt die DCF Konzentration bei 40% des Maximums konstant. Die extrazelluläre Fluoreszenz hingegen steigt über den gesamten Zeitraum fast linear an (Abbildung 8, A).

Im Gegenteil dazu sind nach der Versuchszeit von 60 Minuten nur 20% der maximalen Calcein Konzentration im extrazellulären Raum akkumuliert, während die Calcein Konzentration in der Zelle während der gesamten Zeit kontinuierlich ansteigt ohne ein Maximum zu erreichen (Abbildung 8, B).

Die Fluoreszenz von Calcein ist wesentlich intensiver als die von DCF. Da das Volumen von Zelle und Medium sehr unterschiedlich ist, zeigen diese Daten, dass der Ausstrom von Calcein aus der Zelle praktisch zu vernachlässigen ist und in erster Linie die sehr hohe Calcein-Konzentration und damit deren Fluoreszenz in der Zelle von Bedeutung ist.

Darüber hinaus wird durch den kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz beider Proben deutlich, dass die Konzentration an H₂-DCF und H₂-Calcein nach dem Beladen in der Zelle so effizient ist, dass nach 60 Minuten noch kein Mangel an nicht-oxidierten Substanzen vorhanden ist.

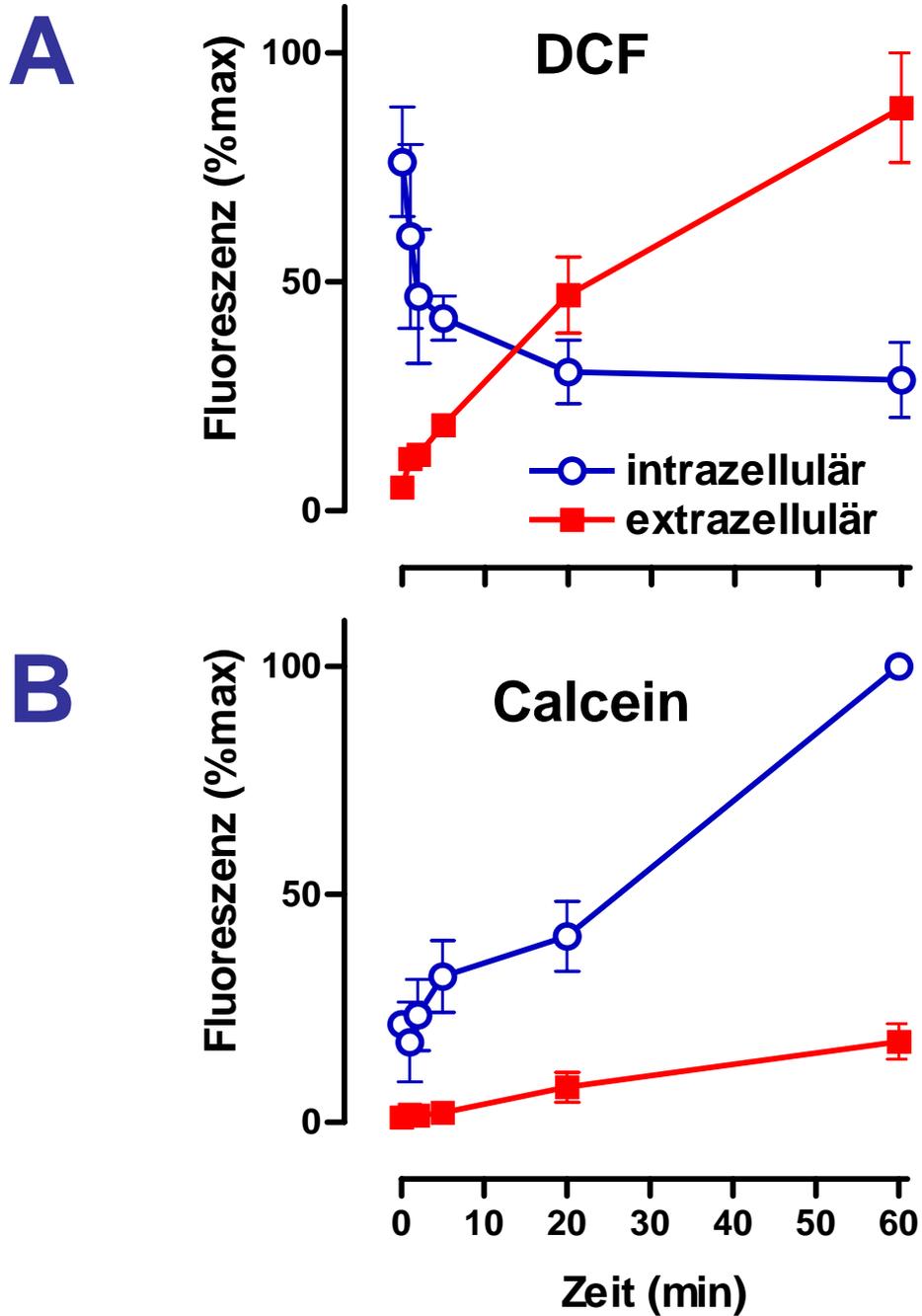


Abbildung 8: Intrazelluläre Retention von DCF (A) und Calcein (B) in RSMC

RSMC wurden in 12-well Platten kultiviert und mit H_2 -DCF-DA ($10 \mu\text{mol/l}$) oder H_2 -Calcein-DA ($2 \mu\text{mol/l}$) für 20 Minuten beladen. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und die intrazelluläre gegen die extrazelluläre Fluoreszenz gemessen. Für die Standardisierung wurde das maximale Fluoreszenzsignal auf 100% gesetzt. Mittelwerte \pm S.E.M., $n=5$.

4.3 Einfluss des Redox Cyclers DMNQ auf die Bildung von DCF und Calcein

Um festzustellen, ob H₂-DCF und H₂-Calcein für die Messung von intrazellulären ROS geeignet ist, wurde der Einfluss des Redox Cyclers DMNQ auf die ROS Messung untersucht. DMNQ ist ein Semiquinon, welches von der Zelle aufgenommen wird und in einer Redox-Reaktion mit NADH O₂^{•-} generiert.

Die Behandlung der Zellen mit DMNQ steigerte sowohl die Oxidation von H₂-DCF als auch die von H₂-Calcein signifikant im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (Abbildung 9). Es konnte kein Unterschied in der Sensitivität der beiden Proben festgestellt werden.

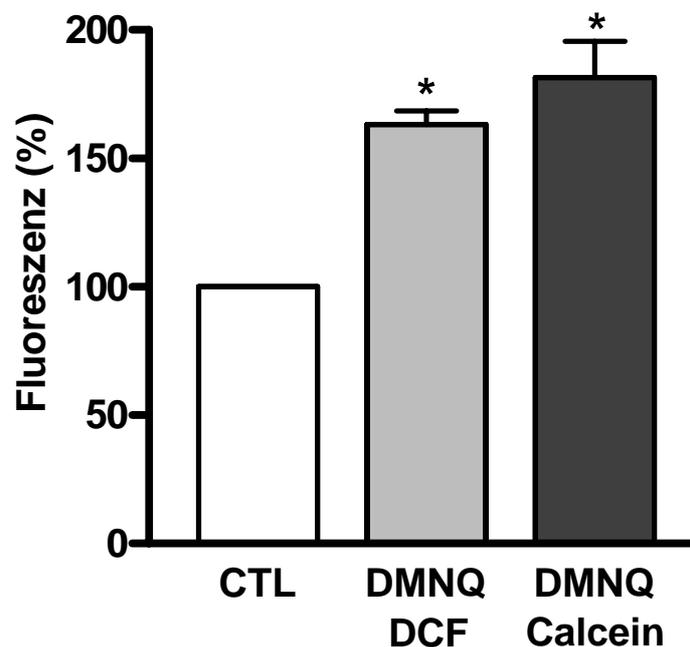


Abbildung 9: Effekt des Redox Cyclers DMNQ auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein in RSMC

RSMC wurden mit H₂-DCF-DA (10 µmol/l) oder H₂-Calcein-DA (2 µmol/l) für 20 Minuten in An- und Abwesenheit von dem Semiquinon DMNQ (100 µmol/l) geladen. Der relative Effect von DMNQ auf DCF und Calcein Anreicherung wurde mit nicht behandelten Zellen verglichen. Mittelwerte ± S.E.M., n=3. *p<0.05 vs. Kontrolle

4.4 Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion durch Angiotensin II: Einfluss auf die Bildung von DCF und Calcein

Um den Effekt einer auf physiologische Weise gesteigerter intrazellulärer ROS-Produktion auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein zu ermitteln, wurden RSMC mit Angiotensin II (A II) stimuliert. Über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären ROS.

Während die Inkubation der Zellen mit A II einen signifikanten Anstieg der Oxidation von H₂-DCF bewirkte, konnte kein Effekt auf die Oxidation von H₂-Calcein gezeigt werden (Abbildung 10).

Um sicher zu stellen, dass der unterschiedliche Effekt nicht auf eine unspezifische Reaktion von H₂-DCF zurückzuführen ist, wurde die durch A II vermittelte Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies zusätzlich mittels Elektronen Spin Resonanz (ESR) Technik gemessen (Abbildung 11). Die gesteigerte Oxidation des verwendeten Spin Traps CMH nach A II Inkubation entsprach im relativen Betrag der gesteigerten Oxidation von H₂-DCF. Es ist somit nicht möglich ist, die durch A II über Aktivierung der NADPH-Oxidase bewirkte Steigerung der ROS-Bildung mit H₂-Calcein zu detektieren.

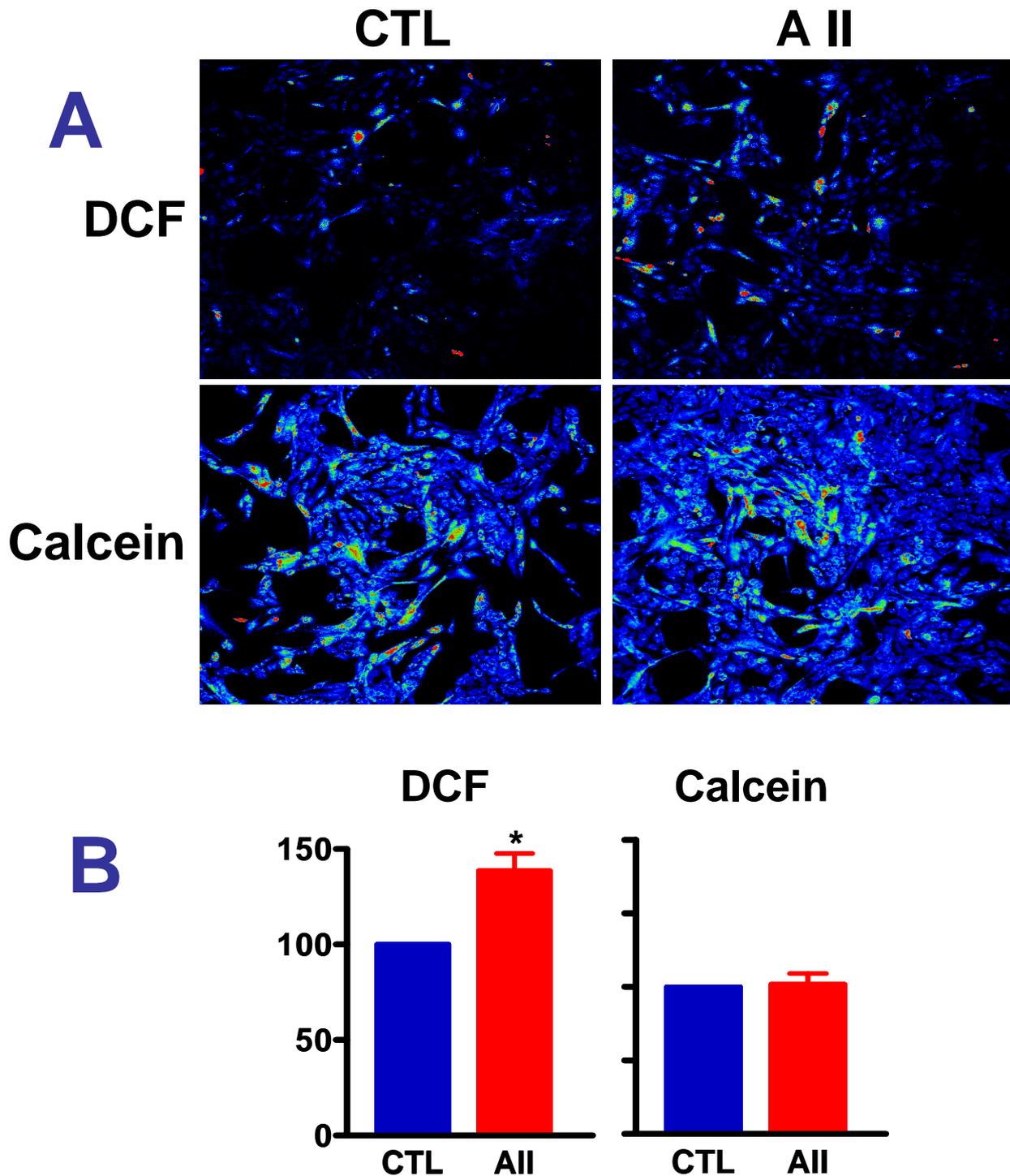


Abbildung 10: Effekt von Angiotensin II auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein in RSMC

Oben: Die Aufnahmen im Konfokalen Mikroskop zeigen die basale Akkumulation von DCF und Calcein in nicht stimulierten RSMC und im Vergleich dazu RSMC die mit Angiotensin II für 45 Minuten stimuliert waren. Unten: RSMC wurden in 12 well Platten kultiviert und für 20 Minuten mit den Farbstoffen beladen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Mikrotiterplattenfluorimeter. Die Daten wurden relativ zur Kontrolle, nicht stimulierte Zellen, dargestellt. Mittelwert \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle

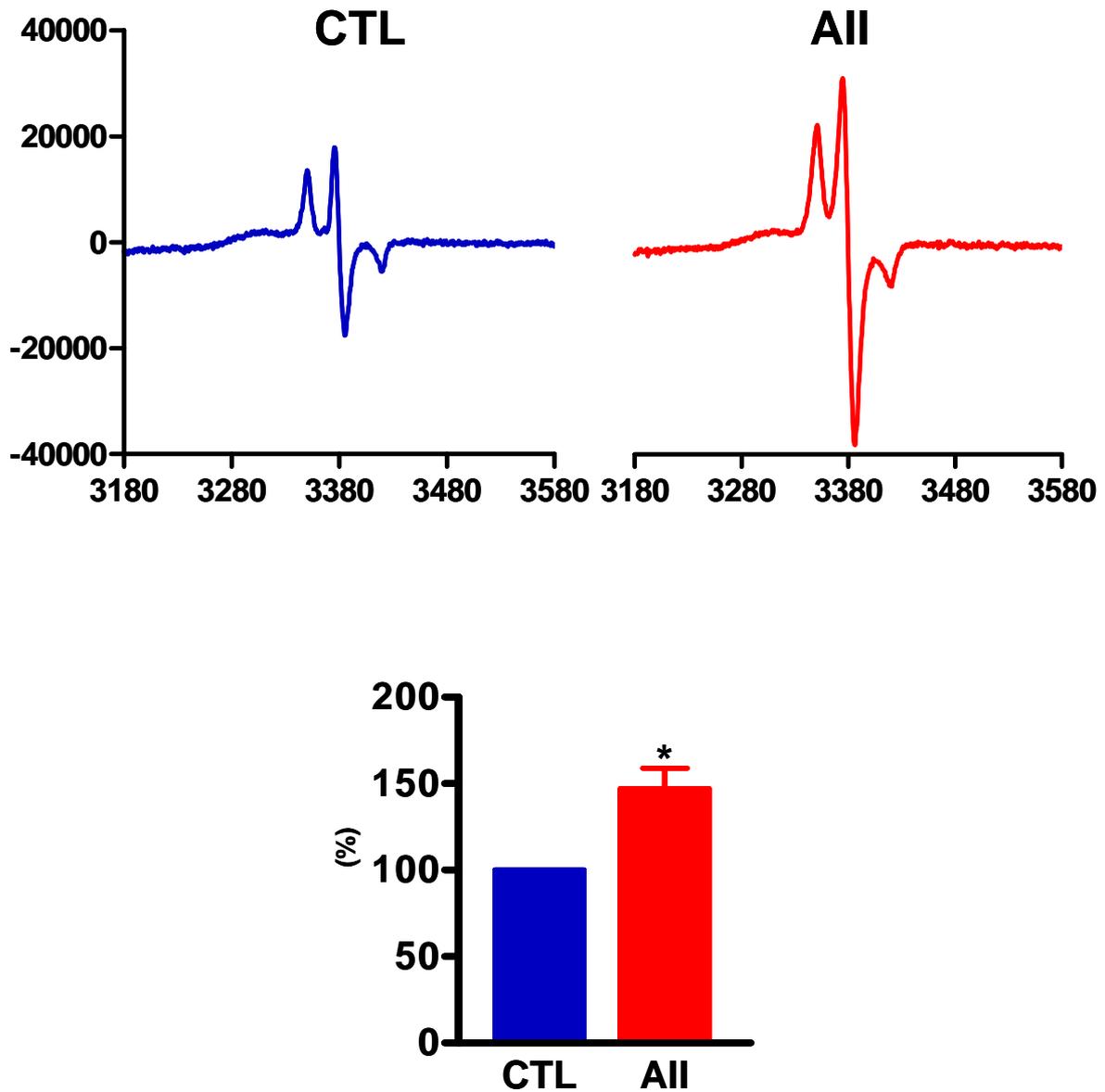


Abbildung 11: Effekt von Angiotensin II auf die Bildung von ROS in RSMC dargestellt im ESR Spektrum

Die durch Angiotensin II (100 nmol/l, A II) induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in RSMC wurde mittels des Spin Traps CMH im ESR gemessen. Der Graph zeigt das ESR-Signal in Kontrollzellen und in mit Angiotensin II stimulierten RSMC. Die y-Achse zeigt die Absorption und die x-Achse das Magnetfeld in Gauss dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die statische Auswertung, n=5. *p<0.05 vs Kontrolle

4.5 Effekt der Hemmung der NADPH Oxidase auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein

Um den Effekt der Hemmung der NADPH Oxidase auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein zu untersuchen, wurde DPI, ein unspezifischer Hemmstoff aller flavinhaltiger Enzyme, wie z.B. die NADPH Oxidase (Cross und Jones, 1986), die Cytochrom P450 Monooxygenase (McGuire *et al.*, 1998) und Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (Li und Trush, 1998) mit gp91ds-tat, einem spezifischen NADPH Oxidase Hemmstoff verglichen (Abbildung 12) (Rey *et al.*, 2001).

DPI und gp91ds-tat zeigten einen geringen Effekt auf die basale ROS Detektion mit H₂-DCF, während durch beide Substanzen die A II-induzierte DCF Akkumulation komplett geblockt wurde.

Im Gegenteil dazu zeigte gp91ds-tat absolut keinen Effekt auf die Bildung von Calcein, während DPI die Oxidation von H₂-Calcein sowohl in basalen als auch in mit A II stimulierten Zellen um fast 50% gesenkt hat.

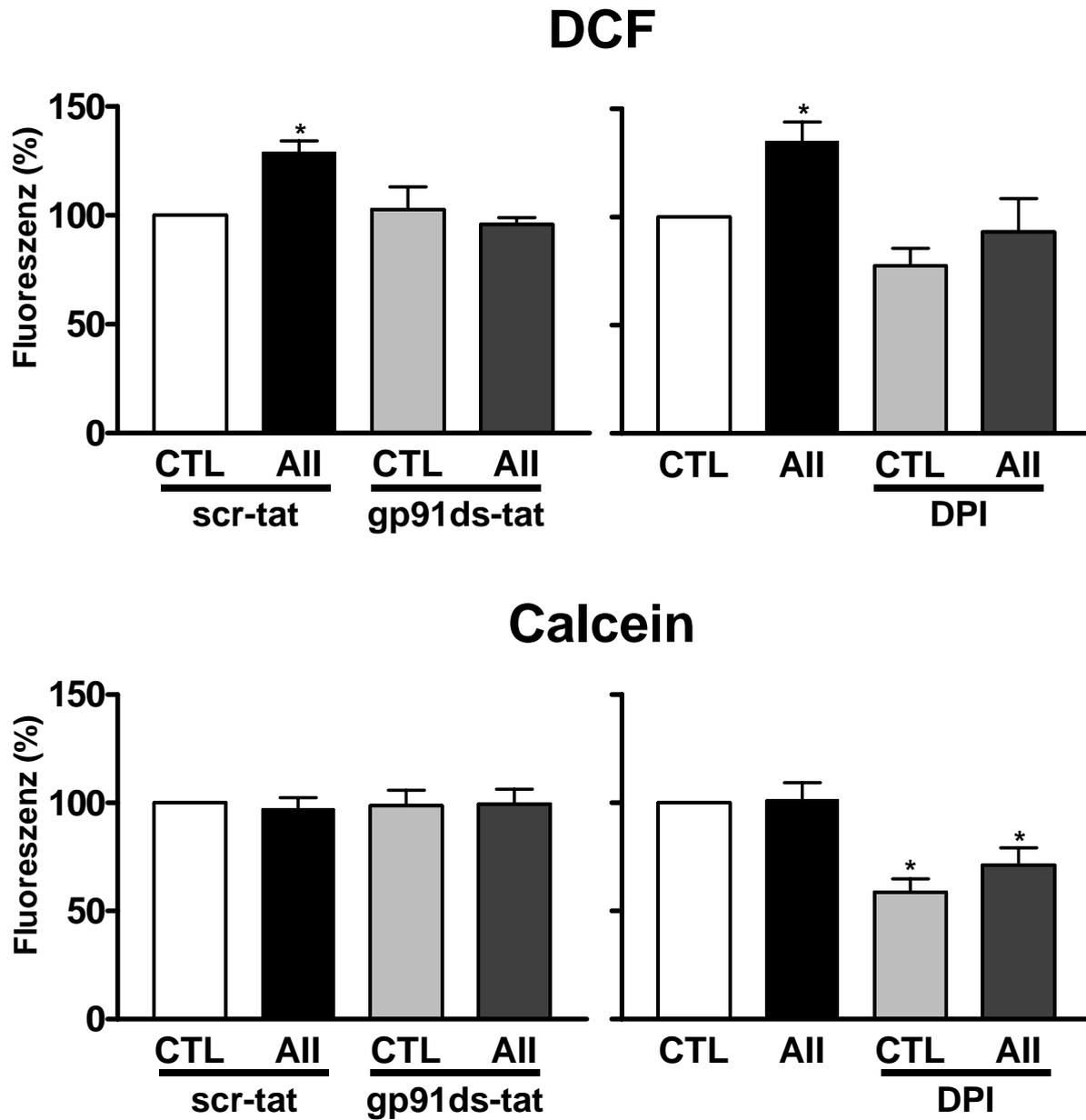


Abbildung 12: Effekte von Hemmstoffen auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein in mit Angiotensin II stimulierten RSMC

Effekt des spezifischen NADPH-Oxidase-Hemmstoffes gp91ds-tat (100 µmol/l), dem Kontrollpeptid scr-tat (100 µmol/l) und des Flavin-Hemmstoffes DPI (10 µmol/l) auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein in Kontrollzellen und in mit Angiotensin II stimulierten RSMC. Die Kontrollen wurden jeweils auf 100% normalisiert. n=5. *p<0.05 vs Kontrolle

4.6 H₂-DCF und H₂-Calcein erfassen ROS in unterschiedlichen Teilen der Zelle

Der Effekt von DPI auf die Oxidation von H₂-Calcein unter basalen Bedingungen lässt vermuten, dass H₂-Calcein, anders als H₂-DCF, überwiegend die konstitutive Bildung von flavin-abhängigen ROS oxidiert wird und nicht in der Lage ist, NADPH-Oxidase abhängige Sauerstoffradikale zu detektieren. Daraus kann gefolgert werden, dass Calcein und DCF in unterschiedlichen Kompartimenten in der Zelle akkumuliert.

Im konfokalen Mikroskop fand sich dementsprechend, dass DCF hauptsächlich im Zytoplasma und nur zu geringem Teil in den Mitochondrien, Calcein hingegen hauptsächlich in den Mitochondrien akkumuliert. Zum Vergleich wurde Mitotracker grün eingesetzt, der in den gleichen Kompartimenten wie Calcein angereichert wurde (Abbildung 13).

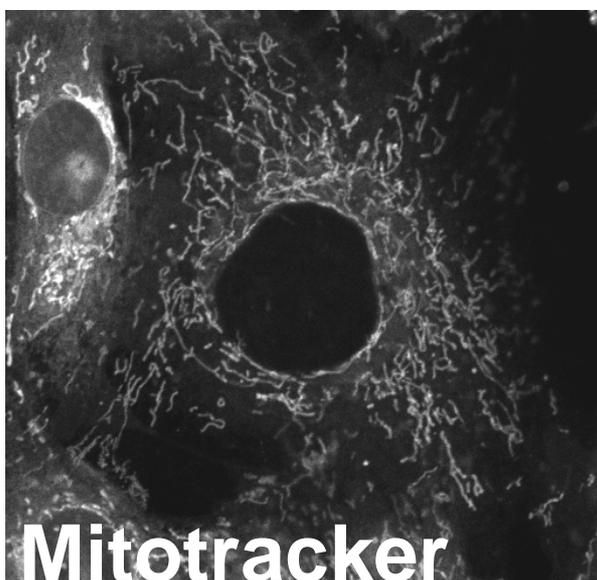
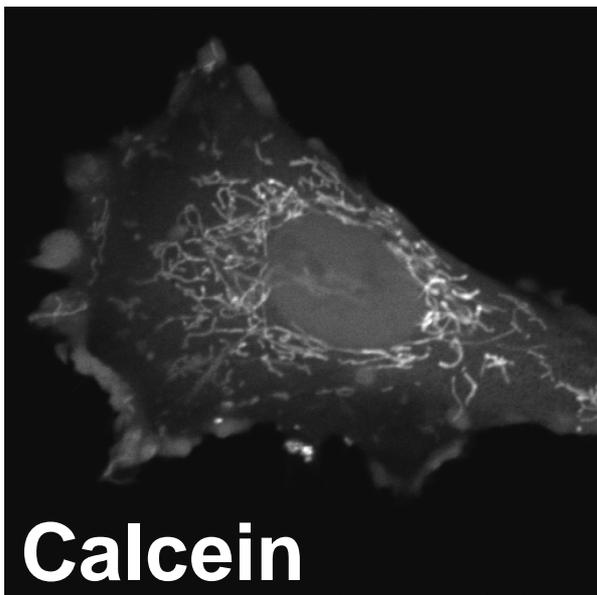
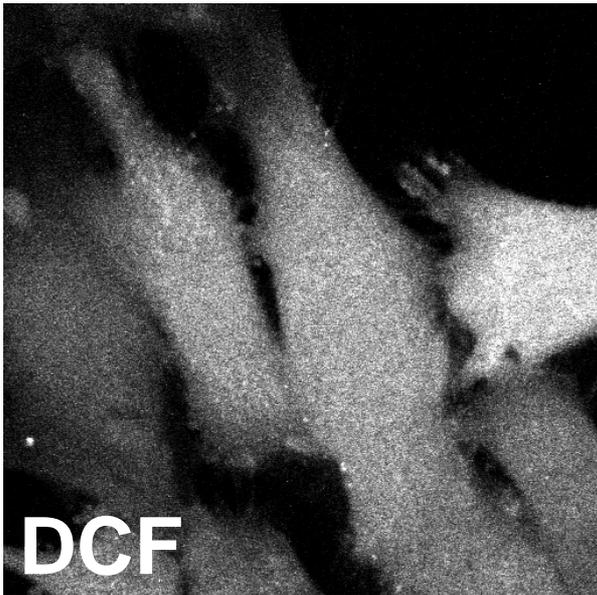


Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisation von DCF und Calcein in RSMC

Die Aufnahmen im konfokalen Mikroskop zeigen RSMC die mit H_2 -DCF-DA (5 $\mu\text{mol/l}$), H_2 -Calcein-DA (2 $\mu\text{mol/l}$) und dem Mitotracker grün (100 nmol/l) beladen sind.

4.7 H₂-Calcein interagiert direkt mit dem Komplex I der mitochondrialen Atmungskette

Um den Mechanismus der Oxidation von H₂-Calcein in den Mitochondrien zu bestimmen, wurde der Effekt von verschiedenen Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette auf die Farbstoffoxidation bestimmt. In nicht stimulierten RSMC steigert Antimycin A, ein Hemmstoff der mitochondrialen Komplexes III, die Fluoreszenz von DCF, während die Komplex III-Hemmstoffe Stigmatellin (STIG) und Myxothiazol (MYX) genauso wie der Komplex I-Hemmstoff Rotenon (ROT) die Fluoreszenz abschwächen. Im Gegenteil dazu wurde die Calcein Fluoreszenz nur durch ROT gehemmt, während alle andern Komponenten ohne Effekt blieben (Abbildung 14).

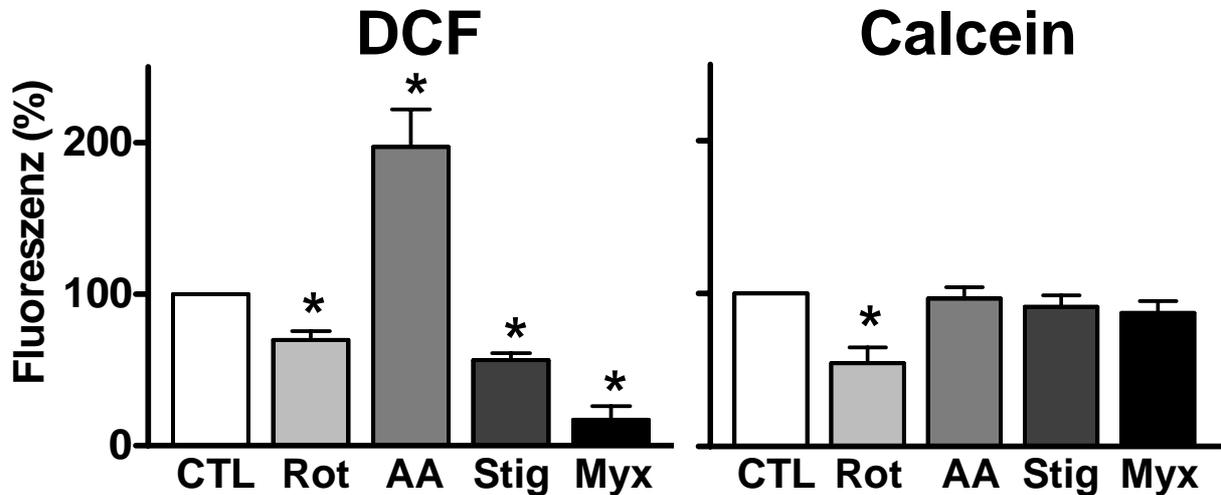


Abbildung 14: Effekt von Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein in RSMC

Effekte von dem Komplex I Hemmstoff Rotenon (ROT, 10 µmol/l) und der Komplex III Hemmstoffe Antimycin A (AA, 1 µmol/l), Stigmatellin (STIG, 100 nmol/l) und Myxothiazol (MYX, 100 nmol/l) auf die Oxidation von H₂-DCF und H₂-Calcein. Die Daten sind relativ zur Kontrolle angegeben. n=5. *p<0.05 vs Kontrolle

Da diese Daten vermuten lassen, dass Calcein spezifisch mit dem Komplex I interagiert, wurde in weiterführenden Experimenten der Effekt von H₂-Calcein auf die Aktivität von Komplex I in isolierten submitochondrialen Partikeln bestimmt. Während H₂-Calcein die Aktivität von Komplex I deutlich hemmte (Abbildung 15), zeigte H₂-DCF keinen Effekt. NADH hatte keinen direkten Einfluss auf die Oxidation von H₂-Calcein verläuft.

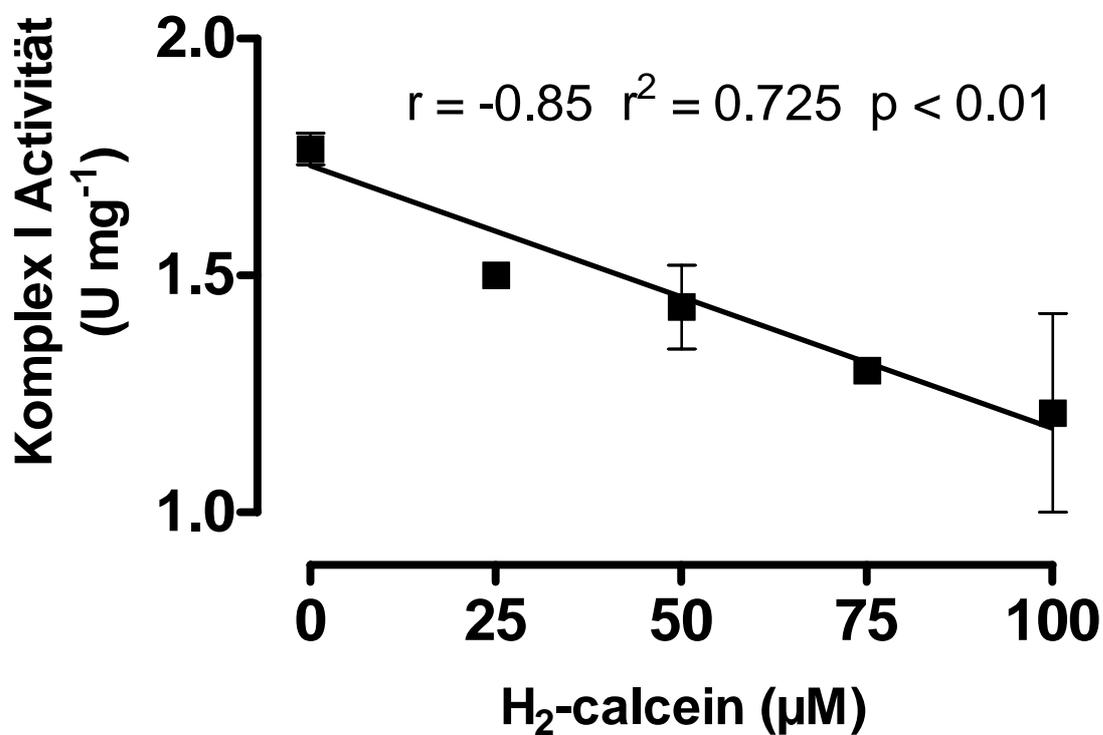


Abbildung 15: Effekt von H₂-Calcein auf die Aktivität des mitochondrialen Komplexes I.

Die Aktivität von Komplex I wurde in einem NADH:Ubiquinone Assay bestimmt. Mittelwerte \pm S.E.M., n=3

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde H₂-DCF und H₂-Calcein als Indikatoren für die Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies verglichen. Beide Substanzen sind in ihrer oxidierten Form fluoreszierend und können fluorimetrisch über ihre grüne Fluoreszenz gemessen werden (Tabelle 1).

Substanz	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
DCF	488 nm	520 nm
Calcein	495 nm	515 nm

Tabelle 1

Sowohl H₂-DCF als auch H₂-Calcein werden kommerziell in der veresterten Form vertrieben. Diese Substanzen werden von der Zelle aufgenommen und durch intrazellulären Esterasen hydrolysiert. Als freie Alkohole sind die Komponenten nicht mehr zellpermeabel. H₂-DCF wird oxidiert und ist in der fluoreszierenden Form wieder mehr oder weniger gut membranpermeabel. Besonders in Endothelzellen ist die intrazelluläre Retention sehr kurz (Abbildung 16) (Swift und Sarvazyan, 2000)

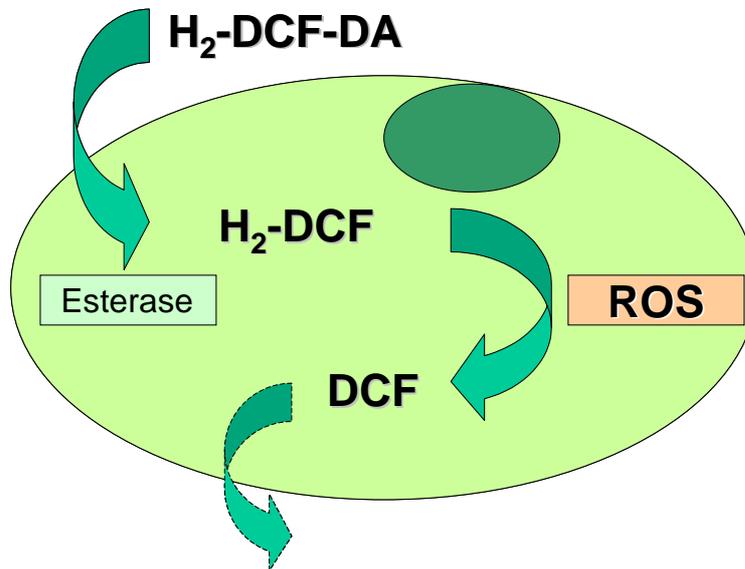


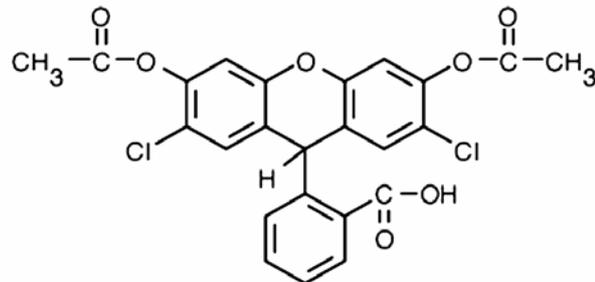
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Dihydrodichlorofluorescein

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ($H_2\text{-DCF-DA}$) wird von der Zelle aufgenommen und sofort durch intrazellulären Esterasen hydrolysiert. Das nicht fluoreszierende Dihydrodichlorofluorescein ($H_2\text{-DCF}$) ist nicht mehr zellpermeabel und wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. DCF ist, abhängig vom Zelltyp, mehr oder weniger membranpermeabel.

$H_2\text{-Calcein}$ wird ebenfalls von intrazellulären Esterasen hydrolysiert, der genaue Mechanismus der Oxidation zu Calcein und damit zu der fluoreszierenden Substanz ist nicht vollständig bekannt.

Die ähnlichen Strukturformeln von $H_2\text{-DCF}$ und $H_2\text{-Calcein}$ deutet darauf hin, dass beide Substanzen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies zeigen (Abbildung 17).

Dichlorodihydrofluorescein -diacetate



Dihydrocalcein-acetylmethylester

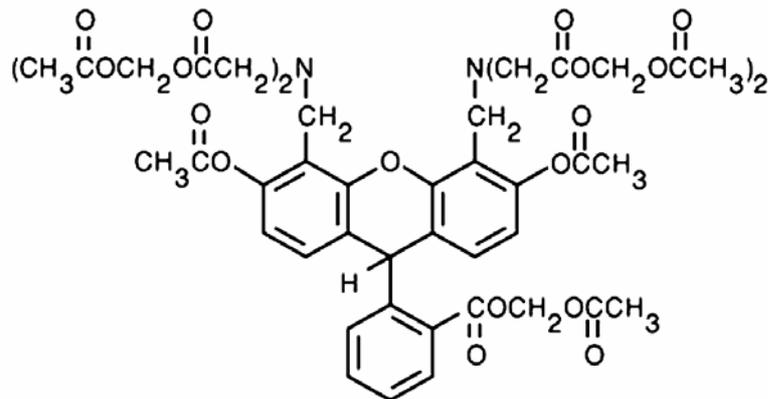


Abbildung 17: Strukturformeln von H₂-DCF-DA und H₂-Calcein-AM

Tatsächlich zeigten beide Komponenten in den *in vitro* Experimenten eine vergleichbare Sensitivität gegenüber unterschiedlichen reaktiven ROS. Beide Proben wurden sowohl von OONO⁻ als auch von •OH oxidiert, während keine der Komponenten mit H₂O₂ reagierten. Der NO-Donor DEA-NONOate konnte beide Proben in nur sehr hohen Konzentrationen oxidieren, was durch die Bildung von NO⁻ oder OONO⁻ bedingt gewesen sein könnte (Wang *et al.*, 2002). Außerdem wurde sowohl H₂-DCF als auch H₂-Calcein direkt und unabhängig von ROS durch Peroxidase (HRP) oxidiert.

H₂-DCF und H₂-Calcein können besonders unter NADPH- oder Glutathion-Mangel als Protonenspender dienen und somit als potentes Reduktionsmittel direkt mit HRP reagieren (Rota *et al.*, 1999b). Neben HRP können auch Cyclooxygenasen (Larsen *et al.*, 1996) als Protonenakzeptor dienen. Dies gewinnt unter oxidierenden Bedingungen an Bedeutung, wie z.B. bei einer Ischämie. Dementsprechend sollte daher weder H₂-DCF noch H₂-Calcein zur Messung von ROS unter Bedingungen der Ischämie und Reperfusion verwendet werden.

Nach der Behandlung der Zellen mit dem Redox Cycler 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), welcher zu einem intrazellulären Anstieg von ROS führt (Dypbukt *et al.*, 1994), zeigten beide Proben eine gesteigerte Fluoreszenz. Allerdings konnte in RSMC nach Stimulation mit A II und der damit gesteigerten Bildung von intrazellulären ROS durch die aktivierte NADPH Oxidase eine vermehrte Fluoreszenz nur bei DCF, nicht aber bei Calcein festgestellt werden.

Grundsätzlich ist die spezifische Fluoreszenz von Calcein größer als die von DCF (Tomasetto *et al.*, 1993). Dieser Aspekt ist insbesondere bei bildgebenden Verfahren wie Laserscanning- oder Fluoreszenzmikroskopie ein großer Vorteil. Außerdem zeigt H₂-DCF eine relativ hohe Tendenz zur Photooxidation (Marchesi *et al.*, 1999), weswegen das Anregungslicht während der Mikroskopie die DCF Fluoreszenz schnell, aber unspezifisch verstärkt. Aus diesem Grund darf nur eine geringe Lichtintensität eingesetzt werden, was wiederum eine geringe Bildqualität mit einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis zur Folge hat. Die Bildqualität ist mit Calcein wesentlich besser und außerdem erschien H₂-Calcein gegenüber Photooxidation weniger empfindlich. Besonders in der Fluoreszenzmikroskopie spielt das eine entscheidende Rolle. Bei der Verwendung eines Mikrotiterplattenfluorimeters ist die Anregungsenergie wesentlich geringer und auch nur von kurzer Dauer, so dass die Photooxidation der Komponenten nicht so entscheidend ist. Für die FACS Analyse ist dieser Aspekt ebenfalls irrelevant.

Ein wichtiges Ergebnis in der vorliegenden Studie war, dass H₂-Calcein nicht in der Lage ist, den Anstieg der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies als Folge der A II-bedingten Aktivierung der NADPH-Oxidase zu detektieren. Da Zellen sehr stark in

einzelne Kompartimente aufgeteilt sind und vermutlich die Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies zwischen den einzelnen subzellulären Strukturen schwankt, ist anzunehmen, dass DCF und Calcein in verschiedenen Bereichen der Zellen angereichert wird.

In den Mitochondrien herrschen immer oxidierende Bedingungen und nach Stimulation des zellulären Energieverbrauchs kommt es zu einem weiteren Anstieg des oxidativen Stresses in den Mitochondrien (Brookes *et al.*, 2002). Im Gegenteil dazu findet die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies als Reaktion auf A II an intrazellulären Membranen wie Endosomen und Plasmamembranen statt (Lassegue und Clempus, 2003). Folglich bestimmt die subzelluläre Lokalisation der ROS-sensitiven Substanz entscheidend das Ergebnis der Messung.

DCF akkumuliert vermutlich nur zu einem geringen Teil in den Mitochondrien, während der größte Teil im Zytoplasma verbleibt (Swift und Sarvazyan, 2000), was auch in der vorliegenden Studie betätigt werden konnte. Der Ausstrom von DCF aus der Zelle ergibt sich daher abhängig von dem Volumen des Zytoplasmas relativ gesehen zu dem der Mitochondrien. Dieses Verteilungsverhältnis erklärt auch den schnellen Ausstrom von DCF aus der Endothelzelle im Vergleich zu Herzmuskelzellen, da letztere ein wesentlich größeres relatives Mitochondrienvolumen haben.

Bis jetzt waren noch keine Informationen über die Lokalisation von Calcein in der Zelle bekannt. Die hohe Polarität der Komponente macht sie nahezu vollständig impermeabel für die Membran wodurch ein Anreichern der Komponente in Zellorganellen erleichtert wird. Diese Eigenschaft verhindert auch die Freisetzung von H₂-Calcein aus den Lysosomen, wo die Diacetatesterbindungen gespalten werden.

Diese für die beiden Substanzen verschiedene Kompartimentierung unterliegt den unterschiedlichen Eigenschaften von H₂-DCF und H₂-Calcein und kann zusätzlich auch von den Beobachtungen abgeleitet werden, die mit dem Flavin-Hemmstoff DPI

gemacht wurden. Die Zellen enthalten eine Vielzahl flavin-abhängiger Oxidasen, wobei abgesehen von der NADPH Oxidase (Cross und Jones, 1986) eine flavin-abhängige Bildung von ROS zum größten Teil in der mitochondrialen Atmungskette stattfindet, welche ebenfalls sensitiv gegenüber DPI ist (Li und Trush, 1998). Die wesentlich stärkere Hemmung der basalen Oxidation von H₂-Calcein im Vergleich zu H₂-DCF durch DPI verdeutlicht, dass die Oxidation der beiden Komponenten durch unterschiedliche flavin-abhängige Oxidasen vermittelt ist. Der unterschiedliche Effekt von DPI könnte durch ein direktes Abfangen von H₂-Calcein in den Mitochondrien bedingt sein.

Tatsächlich konnte der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Calcein fast ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dementsprechend zeigten Zellen, die sich in der Teilung befanden aufgrund des erhöhten Energieverbrauchs eine erhöhte basale Oxidation von H₂-Calcein.

Um den Mechanismus der mitochondrial vermittelten Oxidation der Farbstoffe zu bestimmen, wurden verschiedene Hemmstoffe von Komplex I und Komplex III der Atmungskette untersucht. Die Blockade von Komplex I verringert die Oxidation beider Komponente. Eine Blockade von Komplex III mit verschiedenen Inhibitoren, hat keinen Einfluss auf die Oxidation von H₂-Calcein. Im Gegenteil dazu hatte Antimycin A eine steigernde, Stigmatellin und Myxothiazol aber eine hemmende Wirkung auf die Oxidation von H₂-DCF. Diese unterschiedlichen Effekte auf H₂-DCF ist die Konsequenz der unterschiedlichen Wirkorte dieser Hemmstoffe am Komplex III. Antimycin A blockiert den Transfer von Elektronen von Q₀ nach Q_i und führt dadurch zu einer Bildung von O₂^{•-} in dem Zwischenmembranenspalt der Mitochondrien, abgewandt von der antioxidativen Abwehr der Matrix (Fang und Beattie, 2003). Die anderen beiden Inhibitoren, welche einen Elektronentransport zu Q₀ verhindern, lösen dadurch keinen Anstieg an O₂^{•-} aus (Abbildung 18).

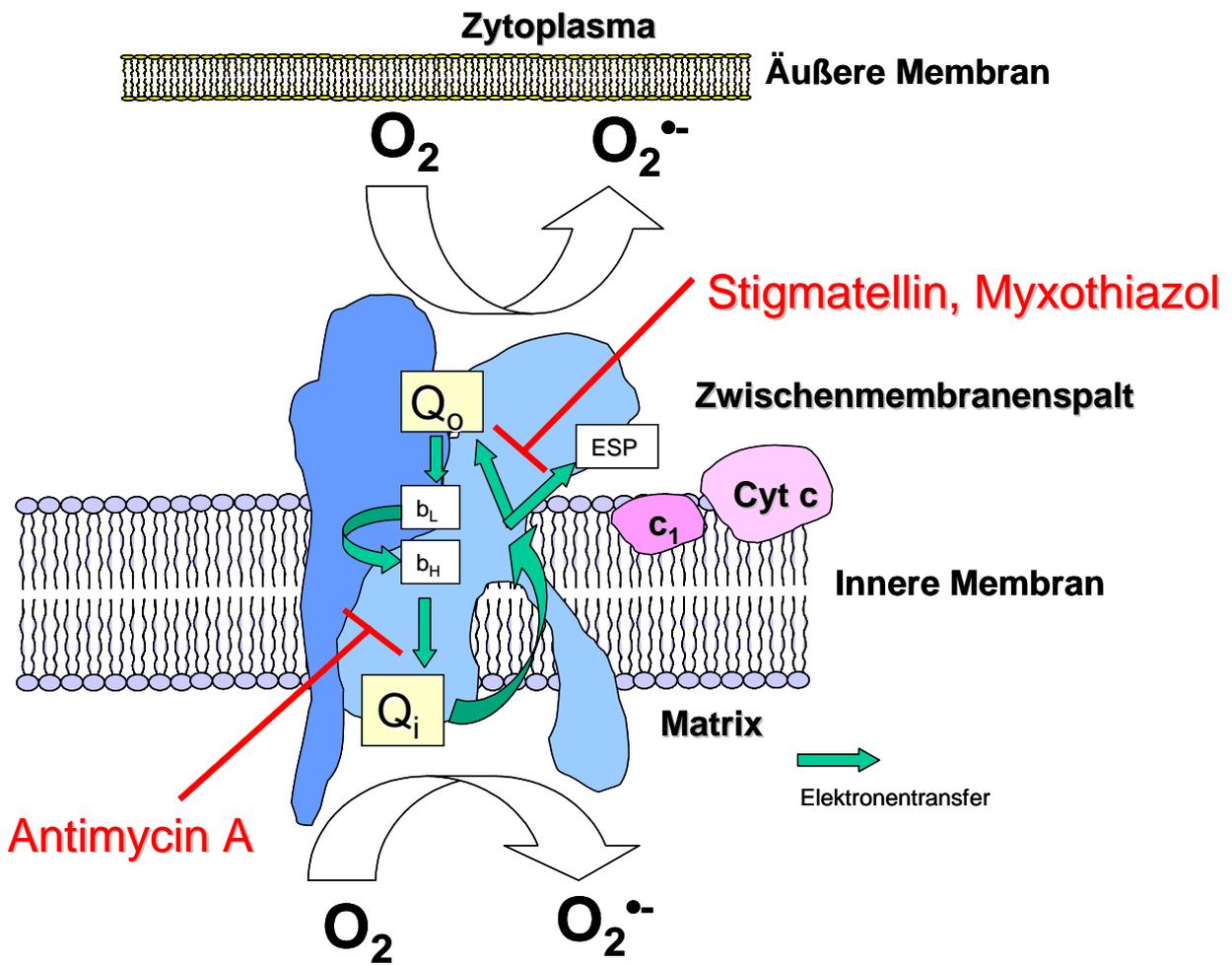


Abbildung 18: Vereinfachte Darstellung des Q-Zyklus für den Elektronentransport und die ROS-Bildung im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette

Ubiquinol wird an der Q_o -Seite oxidiert, wobei ein Elektron erst auf Eisen-Sulfur-Protein (ESP), dann auf Cytochrom c_1 (Cyt c_1), Cytochrom c und Cytochrom Oxidase übertragen wird. Das dabei gebildete Semiquinon ist sehr instabil und überträgt zwei Elektronen auf Cytochrom b_L und b_H , welche wiederum an der Q_i Seite ein Elektron auf ein Ubiquinon transferieren und damit ein stabiles Semiubiquinon bilden. Bei der Oxidation eines weiteren Moleküls wird ein zweites Elektron auf das stabile Semiquinon übertragen und somit Ubiquinol gebildet. Antimycin A (AA) hemmt den Elektronentransfer von Cytochrom b_H zu Ubiquinon an der Q_i Seite, was zu einer Akkumulation von Semiquinon an der Q_o -Seite führt. Diese instabilen Semiquinone können Elektronen auf molekularen Sauerstoff transferieren und somit Sauerstoffradikale ($O_2^{\bullet-}$) bilden. Myxothiazol (MYX) verhindert die Oxidation von Ubiquinol an der Q_o Seite und Stigmatellin (STIG) unterbricht den Transfer der Elektronen von der Q_o Seite zum Cyt c_1 , wodurch es nicht zu der Bildung von Semiquinonen kommt (Crofts *et al.*, 1999) (Fang und Beattie, 2003)

Diese Beobachtungen lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Die Oxidation von H₂-Calcein in den Mitochondrien ist nicht durch O₂^{•-} im Zwischenmembranenspalt bedingt. Komplex III und O₂^{•-} beeinflussen die Oxidation von H₂-DCF. Komplex I ist an der Oxidation von H₂-Calcein beteiligt, wobei es unklar ist, ob dies durch einen ROS-vermittelten Effekt unterstützt wird oder H₂-Calcein direkt als Substrat oder Elektronendonator für Komplex I agiert. Um diesen Aspekt zu analysieren, wurde der Effekt von H₂-Calcein auf die NADH-Oxidase-Aktivität von Komplex I untersucht. Es stellte sich heraus, dass H₂-Calcein dieses Enzym mit einer IC₅₀ von ungefähr 200 µmol/l direkt hemmt. Es wurde bereits gezeigt, dass der Komplex I mit verschiedenen Klassen von Komponenten direkt interagiert. Insbesondere eine dem Fluorescein verwandte Struktur, Erythrosin-5'-iodoacetamid hemmt den Komplex I mit einer IC₅₀ von 20 nmol/l (Degli, 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass H₂-Calcein grundsätzlich *in vitro* für die Darstellung von reaktiven Sauerstoffspezies genutzt werden kann. Obwohl diese Komponente ähnliche chemische Eigenschaften hat wie bereits etablierte Indikatoren für reaktive Sauerstoffspezies, kann der Anstieg von ROS in der lebenden Zelle nicht dargestellt werden. H₂-Calcein ist vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert, wo es direkt von Komplex I der Atmungskette oxidiert wird. Aus diesem Grund ist H₂-Calcein nicht als Indikator für intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies zu nutzen und stellt trotz des deutlichen Vorteils der besseren intrazellulären Retention und der stärkeren Fluoreszenzintensität keine Alternative zu dem etablierte DCF dar.

6. Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen in der Physiologie und der Pathophysiologie des vaskulären Systems eine wichtige Rolle. ROS beeinflussen eine Vielzahl zentraler Prozesse innerhalb der Zelle. Eine Störung der Homöostase und der daraus resultierende Anstieg von ROS wird als oxidativer Stress bezeichnet und führt zu pathophysiologischen Veränderungen. Schwierigkeiten in der Untersuchung von ROS ergeben sich vor allem aufgrund mangelnder Quantität der etablierten Meßmethoden in lebenden Zellen.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Validierung von H₂-Calcein als neue Substanz zur Messung von ROS zusammengefasst und dessen Sensitivität und Spezifität in Rattenglattenmuskelzellen (RSMC) mit dem bereits etablierten H₂-DCF verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass H₂-Calcein grundsätzlich zur Detektion von ROS geeignet ist und dass es im Vergleich zu DCF eine wesentlich längere intrazelluläre Halbwertszeit vorweisen kann. Obwohl beide Substanzen *in vitro* ähnliche chemische Eigenschaften besitzen, führt eine auf physiologische Weise gesteigerte intrazelluläre ROS-Produktion in RSMC nicht zu einer gesteigerten Calcein-Fluoreszenz, während bei DCF eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz dargestellt werden kann. Letzteres Ergebnis konnte mittels ESR-Messungen bestätigt werden. Im konfokalen Mikroskop konnte gezeigt werden, dass beide Substanzen in unterschiedlichen Zellkompartimenten akkumulieren. DCF ist größtenteils im Zytoplasma lokalisiert, während Calcein fast ausschließlich auf die Mitochondrien beschränkt ist. Darüber hinaus konnte in submitochondrialen Partikeln (SMP) gezeigt werden, dass H₂-Calcein, nicht aber H₂-DCF, die Aktivität des Komplex I hemmt.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass die Oxidation von H₂-Calcein höchstwahrscheinlich die Konsequenz einer direkten Elektronenübertragung zu dem mitochondrialen Komplex I ist. Folglich ist H₂-Calcein zur Messung von intrazellulären ROS ungeeignet und bietet keine Alternative zu H₂-DCF.

7. Summary

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the physiology as well as in the pathophysiology of the cardiovascular system. ROS influence a variety of central processes within the cell. A disturbance of the homeostasis and the subsequent increase in ROS production, also referred to as oxidative stress, results in pathophysiological changes. Difficulties in the analysis of ROS arise due to the low sensitivity of established detection methods within living cells.

The present study aimed on the validation of H₂-calcein as a new compound for ROS detection and to determine sensitivity and specificity of this new fluorochrome in rat smooth muscle cells (RSMC) as compared to the already established H₂-DCF.

We could demonstrate that H₂-calcein can be used to assess ROS production and that H₂-calcein, in comparison to DCF, exhibits a significant longer intracellular half-life. Although *in vitro* both compounds have similar chemical properties, the stimulation of ROS production under physiological circumstances did not result in an increased calcein fluorescence but DCF did. The latter finding could be confirmed by ESR-measurements. Confocal microscopy revealed that both compounds accumulate in different cellular compartments. DCF mainly localized in the cytoplasm, whereas calcein fluorescence was almost exclusively restricted to the mitochondria. Furthermore, in submitochondrial particles (SMP) H₂-Calcein, but not H₂-DCF inhibited complex I activity.

Taken together, these observations indicate that the oxidation of H₂-calcein most likely occurs as a consequence of direct electron transfer to mitochondrial complex I. Therefore, H₂-calcein can not be used as a probe for intracellular ROS detection and offers no alternative to H₂-DCF.

8. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Robert, K., und Walter, P. Molecular Biology of the cell 4th Edition 2002; GS Garland Service Taylor & Francis Group, New York

Antoniades C., Tousoulis D., Tentolouris C., Toutouzas P., Stefanadis C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz* 2003; 28: 628-638

Armstrong J. S., Whiteman M., Rose P., Jones D. P. The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial [correction mitochondrial] complex III. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 49079-49084

Babior B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476

Babior B. M., Lambeth J. D., Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 397: 342-344

Brawn K. und Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand. Suppl* 1980; 492: 9-18

Brookes P. S., Levenon A. L., Shiva S., Sarti P., Darley-Usmar V. M. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 755-764

Burkitt M. J. und Gilbert B. C. Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic. Res. Commun.* 1990; 10: 265-280

Cadenas E. und Davies K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 222-230

- Cathcart R., Schwiers E., Ames B. N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* 1983; 134: 111-116
- Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59: 527-605
- Chen Q., Vazquez E. J., Moghaddas S., Hoppel C. L., Lesnefsky E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 36027-36031
- Crofts A. R., Barquera B., Gennis R. B., Kuras R., Guergova-Kuras M., Berry E. A. Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* 1999; 38: 15807-15826
- Cross A. R. und Jones O. T. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* 1986; 237: 111-116
- Davydov D. R. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26: 155-160
- Degli E. M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1364: 222-235
- Del Maestro R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand. Suppl* 1980; 492: 153-168
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95
- Dyrbukt J. M., Ankarcrona M., Burkitt M., Sjöholm A., Strom K., Orrenius S., Nicotera P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or

- produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 30553-30560
- Elferink J. G. Measurement of the metabolic burst in human neutrophils: a comparison between cytochrome c and NBT reduction. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1984; 43: 339-342
- Elstner, Erich F. *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin* 1990, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim Wien Zürich
- Esposito F., Ammendola R., Faraonio R., Russo T., Cimino F. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.* 2004; 29: 617-628
- Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 53: 314S-321S
- Fang J. und Beattie D. S. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34: 478-488
- Fattman C. L., Schaefer L. M., Oury T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35: 236-256
- Finkel T. und Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247
- Forman H. J. und Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 2002; 166: S4-S8
- Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999; 222: 196-204

- Fukai T., Folz R. J., Landmesser U., Harrison D. G. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55: 239-249
- Gorlach A., Brandes R. P., Nguyen K., Amidi M., Dehghani F., Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ. Res.* 2000; 87: 26-32
- Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23 Suppl 1: 118-126
- Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.* 1995; 61: 73-101
- Halliwell B. und Gutteridge J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219: 1-14
- Halliwell B. und Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142: 231-255
- Harrison D., Griending K. K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 2003; 91: 7A-11A
- Harrison R. Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem. Soc. Trans.* 1997; 25: 786-791
- Hempel S. L., Buettner G. R., O'Malley Y. Q., Wessels D. A., Flaherty D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 146-159

- Hoglen N. C., Waller S. C., Sipes I. G., Liebler D. C. Reactions of peroxynitrite with gamma-tocopherol. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 401-407
- Jakubowski W. und Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol. Int.* 2000; 24: 757-760
- Janiszewski M., Souza H. P., Liu X., Pedro M. A., Zweier J. L., Laurindo F. R. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32: 446-453
- Laakso J. T., Teravainen T. L., Martelin E., Vaskonen T., Lapatto R. Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2004; 22: 1333-1340
- Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 181-189
- Larsen L. N., Dahl E., Bremer J. Peroxidative oxidation of leuco-dichlorofluorescein by prostaglandin H synthase in prostaglandin biosynthesis from polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1299: 47-53
- Lassegue B. und Clempus R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2003; 285: R277-R297
- LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992; 5: 227-231
- Li Y. und Trush M. A. Diphenyliodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 253: 295-299
- Lu S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* 2000; 36: 95-116

- Marchesi E., Rota C., Fann Y. C., Chignell C. F., Mason R. P. Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 148-161
- Marklund S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem. J.* 1990; 266: 213-219
- Marklund S. L. und Karlsson K. Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic applications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; 264: 1-4
- McGuire J. J., Anderson D. J., McDonald B. J., Narayanasami R., Bennett B. M. Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 881-893
- McIntyre M., Bohr D. F., Dominiczak A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 1999; 34: 539-545
- Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 783-792
- Miranda-Vizuete A., Ljung J., Damdimopoulos A. E., Gustafsson J. A., Oko R., Pelto-Huikko M., Spyrou G. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 31567-31574
- Mugge A. The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z. Kardiol.* 1998; 87: 851-864
- Mugge A., Elwell J. H., Peterson T. E., Hofmeyer T. G., Heistad D. D., Harrison D. G. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 1991; 69: 1293-1300

- Munzel T., Afanas'ev I. B., Kleschyov A. L., Harrison D. G. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1761-1768
- Murrant C. L. und Reid M. B. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 55: 236-248
- Muzykantov V. R. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J. Control Release* 2001; 71: 1-21
- Napoli C. und Ignarro L. J. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric. Oxide.* 2001; 5: 88-97
- Nordberg J. und Arner E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 1287-1312
- Nuttall S. L., Kendall M. J., Martin U. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *QJM.* 1999; 92: 239-244
- Oury T. D., Day B. J., Crapo J. D. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20: 957-965
- Puntarulo S. und Cederbaum A. I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24: 1324-1330
- Raha S. und Robinson B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 502-508
- Rey F. E., Cifuentes M. E., Kiarash A., Quinn M. T., Pagano P. J. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ. Res.* 2001; 89: 408-414

- Rota C., Chignell C. F., Mason R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 1999a; 27: 873-881
- Rota C., Fann Y. C., Mason R. P. Phenoxy free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J. Biol. Chem.* 1999b; 274: 28161-28168
- Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001; 11: 173-186
- Shah A. M. und Channon K. M. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart* 2004; 90: 486-487
- Shatwell K. P. und Segal A. W. NADPH oxidase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996; 28: 1191-1195
- Skulachev V. P. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci. Rep.* 1997; 17: 347-366
- Smirnoff N. und Pallanca J. E. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 1996; 24: 472-478
- Sorescu D., Weiss D., Lassegue B., Clempus R. E., Szocs K., Sorescu G. P., Valppu L., Quinn M. T., Lambeth J. D., Vega J. D., Taylor W. R., Griendling K. K. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1429-1435
- Spencer A. P., Carson D. S., Crouch M. A. Vitamin E and coronary artery disease. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159: 1313-1320

- Spyrou G., Enmark E., Miranda-Vizueté A., Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2936-2941
- Stahl, W und Sies, H. *Introduction: Reactive Oxygen Species* 2002, Institut für physiologische Chemie I, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
- Stralin P., Karlsson K., Johansson B. O., Marklund S. L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 2032-2036
- Stryer, L. *Biochemie* 1994, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford
- Swift L. M. und Sarvazyan N. Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 2000; 278: H982-H990
- Taniguchi Y., Taniguchi-Ueda Y., Mori K., Yodoi J. A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 2746-2752
- Taniyama Y. und Griending K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081
- Tarpey M. M. und Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ. Res.* 2001; 89: 224-236
- Tarpey M. M., White C. R., Suarez E., Richardson G., Radi R., Freeman B. A. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ. Res.* 1999; 84: 1203-1211

- Tarpey M. M., Wink D. A., Grisham M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2004; 286: R431-R444
- Tomasetto C., Neveu M. J., Daley J., Horan P. K., Sager R. Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol.* 1993; 122: 157-167
- Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol* 2003; 552: 335-344
- Ullrich V. und Bachschmid M. Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278: 1-8
- Valgimigli L., Pedulli G. F., Paolini M. Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 708-716
- Van D. V. und Herman C. J. Leukocyte functions. *Lab Invest* 1987; 56: 127-137
- Wang P. G., Xian M., Tang X., Wu X., Wen Z., Cai T., Janczuk A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* 2002; 102: 1091-1134
- Waterborg J. H. und Matthews H. R. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 1994; 32: 1-4
- Weil J., Bolton J.R., und Wertz J.E. *Electron Paramagnetic Resonance* 1994; Wiley, New York
- White R. E. und Coon M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 315-356
- Wolin M. S., Gupte S. A., Oeckler R. A. Superoxide in the vascular system. *J. Vasc. Res.* 2002; 39: 191-207

- Wu G., Fang Y. Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004; 134: 489-492
- Yamawaki H., Haendeler J., Berk B. C. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ. Res.* 2003; 93: 1029-1033
- Yu B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-162
- Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34: 1359-1368

9. Anhang

9.1 Materialien

9.1.1 Chemikalien

1-hydroxy-3methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-HCl (CMH)

	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Angiotensin II	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Antimycin A	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DEA NONOate	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Diphenylene iodonium (DPI)	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
DMNQ	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
DTPA	Merck, Darmstadt, Deutschland
gp91ds-tat	Eurogentec, Ourgée, Belgien
H₂-Calcein-AM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
H₂DCF-DA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
HPLC ultrapur Wasser	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Hydrogenperoxid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Katalase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mitotracker grün	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Myxothiazol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rotenon	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Peroxidase (HRP)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Peroxyinitrit	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland

scr-tat	Eurogentec, Ourgée, Belgien
Stigmatellin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Superoxiddismutase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
„Suprapur“ Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland

9.1.2 Geräte und Zubehör

EPR-EMX Spektrometer	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
VICTOR Mikrotiterplattenfluorimeter	Wallac / PerkinEllmer, Rodgau, Deutschland
SpectraMax Plus³⁸⁴	Molecular Devices, Grossbritannien
LSM 510 META Konfokale Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland

9.1.3 Abkürzungen

μmol/l	mikromolar
·OH	Hydroxylradikal
A II	Angiotensin II
AA	Antimycin A
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CL	Chemilumineszenz
CMH	1-hydroxy-3methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-HCl
CTL	Kontrolle
CuZnSOD	Kupfer-Zink SOD
CYP	Cytochrom P450
Cyt c	Cytochrom c
DBQ	n-decylubiquinone
DCF	Dichlorofluorescein
DEPMPO	5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide
DHE	Dihydroethidium
DMNQ	2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyliodonium
DTPA	Diethylenetriaminpentacetat
ecSOD	extrazelluläre SOD
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
ESR	Elektronenspinresonanz
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zell Sortierer
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum

Fe²⁺Cyt c	Ferrocytochrom c
Fe³⁺Cyt c	Ferricytochrom c
FMN	Flavinmononukleotid
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
H₂-Calcein	Dihydrocalcein
H₂-DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
H₂-DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulonsäure
HRP	Peroxidase
HS	Harnsäure
HX	Hypoxanthin
KAT	Katalase
kU	arbitrary kilo units
M	Molar
mmol/l	millimolar
MnSOD	Mangan SOD
MYX	Myxothiazol
NAD⁺	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat, reduzierte Form
NBT	Nitroblautetrazolium
NBT⁺	Monoformazan
nmol/l	nanomolar
NO·	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH-Oxidasen
ns	Nanosekunden

O₂	molekularer Sauerstoff
O₂^{•-}	Superoxidanion
ONOO⁻	Peroxynitrit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSMC	Rattenglattemuskelzellen
S.E.M.	Standfehler des Mittelwertes
SMP	submitochondriale Partikel
SOD	Superoxiddismutase
STIG	Stigmatellin
TRX	Thioredoxin
TRXP	Thioredoxinperoxidase
TRXR	Thioredoxinreduktase
u.a.	unter anderem
X	Xanthin
XDH	Xanthinoxiddehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase