

**Entwicklung eines
Dual-Luciferase-Reportergen-Assays
zum Nachweis der Induktion antioxidativer
Enzyme durch Nahrungsbestandteile**

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades
“Diplom-Ernährungswissenschaftler“



der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von
Anne Maria Wiencierz
(Matrikelnummer 71 82 18)

1. Gutachter

Prof. Dr. Pablo Steinberg

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik

2. Gutachter

Prof. Dr. Hans-Rudolf Glatt

Deutsches Institut für Ernährungsforschung

Abteilung Ernährungstoxikologie

Online veröffentlicht auf dem Publikationsserver der Universität Potsdam:

<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/2790/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-27901

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-27901>]

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | iii |
| Abkürzungen | v |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 <i>Reaktive Sauerstoffverbindungen und ihre Rolle in der Pathogenese altersassoziierter Erkrankungen</i> | <i>1</i> |
| 1.2 <i>Antioxidative Enzyme</i> | <i>3</i> |
| 1.3 <i>Methoden zum Nachweis der Regulation der Aktivität von antioxidativen Enzymen</i> | <i>5</i> |
| 1.4 <i>Bekannte und mögliche Induktoren von CAT, GPXI und SOD1</i> | <i>10</i> |
| 1.5 <i>Zielstellung</i> | <i>14</i> |
| 2 Material und Methoden..... | 15 |
| 2.1 <i>Geräte.....</i> | <i>15</i> |
| 2.2 <i>Materialien</i> | <i>16</i> |
| 2.2.1 <i>Verbrauchsmaterial.....</i> | <i>16</i> |
| 2.2.2 <i>Reagenzien, Biochemikalien</i> | <i>16</i> |
| 2.2.3 <i>Kits</i> | <i>18</i> |
| 2.2.4 <i>Lösungen, Puffer</i> | <i>18</i> |
| 2.2.5 <i>Enzyme und dazugehörige Puffer.....</i> | <i>21</i> |
| 2.2.6 <i>Plasmide</i> | <i>22</i> |
| 2.2.7 <i>Bakterienstämme</i> | <i>22</i> |
| 2.2.8 <i>Tierische Zelllinien.....</i> | <i>22</i> |
| 2.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i> | <i>24</i> |
| 2.3.1 <i>Plasmide</i> | <i>24</i> |
| 2.3.2 <i>Transformation von Bakterien.....</i> | <i>25</i> |
| 2.3.3 <i>Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....</i> | <i>27</i> |
| 2.3.4 <i>Enzymatische Fragmentierung von Plasmiden.....</i> | <i>28</i> |
| 2.3.5 <i>Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen.....</i> | <i>29</i> |
| 2.4 <i>Zellbiologische Methoden.....</i> | <i>32</i> |
| 2.4.1 <i>Standardmethoden der Zellkultur</i> | <i>32</i> |
| 2.4.2 <i>Bestimmung der Populationsverdopplungszeit.....</i> | <i>35</i> |
| 2.4.3 <i>Bestimmung der Reporterenzym-Aktivität.....</i> | <i>36</i> |
| 2.4.4 <i>In-vitro-Zytotoxizitätstest.....</i> | <i>44</i> |
| 2.4.5 <i>Beeinflussung der Aktivität von CAT-, GPXI- und SOD1-Promotor</i> | <i>47</i> |

| | | |
|----------|---|-------------|
| 2.5 | Statistische Auswertung..... | 49 |
| 2.5.1 | Überprüfung auf Normalverteilung | 49 |
| 2.5.2 | Deskriptive Statistik | 49 |
| 2.5.3 | Stichprobenvergleich | 49 |
| 3 | Ergebnisse..... | 51 |
| 3.1 | <i>Wachstumsverhalten von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen.....</i> | <i>51</i> |
| 3.2 | <i>Entwicklung des Dual-Luciferase-Reportergen-Assays.....</i> | <i>53</i> |
| 3.2.1 | Reportergenvektoren | 53 |
| 3.2.2 | Transiente Transfektion..... | 57 |
| 3.2.3 | Lumineszenzmessung..... | 60 |
| 3.2.4 | Endogene Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor | 64 |
| 3.3 | <i>in-vitro-Zytotoxizitätstest.....</i> | <i>65</i> |
| 3.4 | <i>Beeinflussung der SOD1-, GPX1- und CAT-Promotor-Aktivität.....</i> | <i>70</i> |
| 4 | Diskussion..... | 76 |
| | Zusammenfassung..... | I |
| | Summary..... | II |
| | Anhang..... | III |
| | Literaturverzeichnis..... | XV |
| | Danksagung..... | XXIX |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | XXX |

Abkürzungen

| | |
|--------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AOE | antioxidatives Enzym |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| bzgl. | bezüglich |
| ca. | circa |
| CAT | Katalase |
| CMV | Zytomegalievirus (engl. <i>Cytomegalovirus</i>) |
| DLR | Dual-Luciferase-Reportergen |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| EC | Enzyme Commission/Enzyme Classification number |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGCG | Epigallocatechingallat |
| EYFP | verbessertes gelb-fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>) |
| FBS | Fötale Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GPX | Glutathion-Peroxidase |
| GPX1 | zytosolische Glutathion Peroxidase |
| GSH | reduziertes Glutathion |
| GSSG | oxidiertes Glutathion |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HSV-TK | Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasenpaare |
| LB | Nährlösung (engl. <i>lysogeny broth</i>) |
| MD | Median |
| mRNA | proteinkodierende RNA (engl. <i>messenger RNA</i>) |
| MW | Mittelwert |

| | |
|-------|---|
| OD | optische Dichte |
| o. g. | oben genannt |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| pH | potentia Hydrogenii |
| QD | halber Quartilsabstand (engl. <i>quartile deviation</i>) |
| RFU | relative Fluoreszenzeinheit (engl. <i>relative fluorescence unit</i>) |
| RLU | relative Lumineszenzeinheit (engl. <i>relative light unit</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffverbindungen (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| s. a. | siehe auch |
| s. o. | siehe oben |
| SD | Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>) |
| SFM | serumfreies Medium |
| sign. | signifikant |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| SOD1 | kupfer-/zinkhaltige Superoxid-Dismutase |
| Tab. | Tabelle |
| TPA | 12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-Acetat, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| U | Enzymeinheit (engl. <i>unit</i>) |
| u. a. | unter anderem |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>) |
| vs. | versus |
| w/v | Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>) |
| z. B. | zum Beispiel |
| zw. | zwischen |

1 Einleitung

Da oxidativer Stress in der Entstehung altersassoziierter Erkrankungen (z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neurodegeneration, Atherosklerose) eine Rolle spielt, wird seit vielen Jahren zur Therapie oder Prävention der Einsatz von Antioxidanzien diskutiert. Während dabei in den letzten Jahrzehnten niedermolekulare, radikalfangende oder ROS-reduzierende Substanzen (z. B. Vitamine C und E) im Vordergrund standen, rücken derzeit die antioxidativen Enzyme verstärkt ins Blickfeld der Wissenschaft.

Aufbauend darauf beschäftigte sich die vorliegende Arbeit damit, inwiefern die Aktivität antioxidativer Enzyme durch exogene Faktoren (z. B. Nahrungsbestandteile) gezielt hoch reguliert und somit die antioxidative Kapazität von Zellen gesteigert werden kann. Tierversuche zur Identifizierung derartiger bioaktiver Nahrungsbestandteile sind für die großflächige Testung wenig geeignet. Besonderes Augenmerk liegt deshalb auf der Entwicklung von *in-vitro*-Testsystemen, die eine qualifizierte Aussage über die Bioaktivität von Nahrungsbestandteilen bei hohem Substanzdurchsatz ermöglichen. Ausgehend davon wurde in der vorliegenden Arbeit ein Reporter-Gen-Assay zum Nachweis der Induktion antioxidativer Enzyme als Teil einer Testplattform zur Beurteilung des antioxidativen Potentials von Nahrungsbestandteilen etabliert.

1.1 Reaktive Sauerstoffverbindungen und ihre Rolle in der Pathogenese altersassoziierter Erkrankungen

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS, engl. *reactive oxygen species*) wie z. B. das Superoxidradikal, das Hydroxylradikal oder Wasserstoffperoxid werden vielfältig im biologischen System gebildet. Der überwiegende Anteil entsteht als Nebenprodukt in der mitochondrialen Atmungskette (Chance 1979). Weitere endogene ROS-Quellen sind die peroxisomale β -Oxidation, Cytochrom-P450-Enzym-katalysierte Elektronenübertragungen, Autooxidationsvorgänge löslicher Zellbestandteile (z. B. Thiole) sowie phagozytierende Zellen, die Pathogene mit einem Gemisch aus Oxidanzien und freien Radikalen angreifen, was unter dem Begriff „respiratory burst“ bekannt ist (Übersicht in Yu 1994). Daneben ist der Organismus freier Radikale exogener Herkunft ausgesetzt, z. B. durch Zigarettenrauch, Brandgase oder Ruß (Younes 2004).

Die hohe Reaktionsfreudigkeit von ROS kann bei praktisch allen wichtigen Makromolekülen einer Zelle (Lipide, Nukleinsäuren, Proteine) in funktionellen wie auch strukturellen

Beeinträchtigungen resultieren (Übersicht in Yu 1994, Beckmann 1998). Davon ausgehend stellte Denham Harman 1956 die Theorie der Alterung durch freie Radikale (engl. *The Free Radical Theory of Aging*) auf, wonach als Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels gebildete freie Radikale und akkumulierende, oxidative Zellschäden die Hauptursache für die zelluläre Seneszenz sind und somit die Lebenserwartung limitieren (Harman 1956). Die experimentelle Bestätigung dieses Zusammenhangs steht bisher aus. Dennoch konnte in vielen Studien eine positive Korrelation der ROS-Bildung und der Pathogenese diverser Erkrankungen, vor allem mit dem Alter assoziierter Erkrankungen wie Neurodegeneration, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs, gezeigt werden (Übersicht in Finkel 2000, Vina 2007).

Demgegenüber zeigte sich, dass ROS neben ihrer potentiell schädigenden Wirkung auch als intrazelluläre Botenstoffe dienen (Sen 1996, Krejsa 1998, Wang 2000) und damit in einer Reihe von grundlegenden physiologischen Prozessen (z. B. mitogene Signaltransduktion, Genexpression, Zellzyklusregulation) involviert sind (Esposito 2004, de Magalhaes 2006). Dementsprechend ist die endogene ROS-Bildung strikt reguliert und dient der Aufrechterhaltung einer intrazellulären ROS-Homöostase.

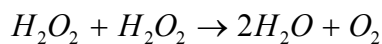
Zum Schutz vor ROS und zur Erhaltung der ROS-Homöostase sind die Zellen mit einer Bandbreite von Mechanismen zur Neutralisierung von ROS ausgestattet (Übersicht in Yu 1994). Das antioxidative Regulationssystem der Zelle umfasst dabei ROS-reduzierende, niedermolekulare Substanzen (z. B. Vitamin C), ROS-abbauende Enzyme (z. B. Katalase) und im weiteren Sinne Enzyme zur Aufrechterhaltung des reduzierenden Milieus in Zellen (z. B. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) sowie zum Abbau oxidativ geschädigter Zellbestandteile (z. B. DNA-Reparatursystem). Übersteigt die ROS-Bildungsrate die Kapazität antioxidativer Systeme, kommt es zu oxidativen Schädigungen der Zelle, was als oxidativer Stress bezeichnet wird (Younes 2004).

Aufgrund der Rolle von oxidativem Stress in der Entstehung zahlreicher Erkrankungen wird zur Therapie oder Prävention der Einsatz von Antioxidanzien diskutiert. Es entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten die allgemeine Auffassung, dass die vermehrte Zufuhr von Antioxidanzien (v. a. antioxidative Vitamine C und E) durch die Ernährung, Nahrungsergänzungsmittel oder angereicherte Lebensmittel (funktionelle Lebensmittel) eine positive Auswirkung auf die menschliche Gesundheit habe (Dureja 2003). Metadatenanalysen konnten die proklamierten positiven Effekte jedoch nicht bestätigen (Bjelakovic 2007), so dass sich die Wissenschaft verstärkt auf die antioxidativen Enzyme (AOE) und die Möglichkeiten ihrer Regulation konzentriert (Vina 2007).

1.2 Antioxidative Enzyme

Katalase (CAT), Glutathion-Peroxidase (GPX) und Superoxid-Dismutase (SOD) sind antioxidative Enzyme, die in aeroben Organismen weit verbreitet sind. Wurden diese Enzyme experimentell inaktiviert, wurde eine erhöhte Anfälligkeit der Versuchstiere oder Kulturzellen gegenüber oxidativem Stress beobachtet (Gregory 1973, Harris 1992, Kondo 1997, Parkes 1998, de Haan 1998, Cheng 1998, Fu 1999). Eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativen Stressoren zeigten Organismen hingegen bei Überexpression von CAT, GPX oder SOD (White 1991, Orr 1992, Mena 1997, Schriener 2005).

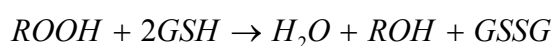
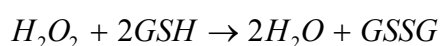
Die Katalase (EC 1.11.1.6, CAT) ist ein tetrameres Hämprotein und katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser und molekularem Sauerstoff.



Die Aktivität des Enzyms variiert in Abhängigkeit von Gewebe (v.a. Leber, Niere und Erythrozyten) und Kompartiment. In Geweben wie der Leber ist die Katalase-Aktivität in den Peroxisomen besonders hoch; in reifen, humanen Erythrocyten hingegen findet sich die Katalase frei im Zytosol (Deisseroth 1970).

Das Gen für die humane Katalase (*CAT*) wurde auf dem Chromosom 11 lokalisiert (11p13). Es besteht aus 13 Exons, die über rund 34 kb verteilt liegen (Quan 1986). Wie bei vielen peroxisomalen Haushaltsgenen fehlt dem CAT-Promotor die TATA-Box und entgegen anderen TATA-freien Promotoren auch das Initiatorelement (Quan 1986, Taniguchi 2005). Er ist reich an Steuerungssequenzen, an denen Transkriptionsfaktoren induzierend oder reprimierend auf die Transkription wirken können (Sato 1992, Nakashima 1989, Takeuchi 2000). Nachgewiesen wurden bspw. Bindungsmotive für NF κ B und AP1 im murinen CAT-Promotor (Zhou 2001) oder überlappende SP1-, Erg-1- und WT1-Bindungsstellen im humanen CAT-Promotor (Nenoi 2001).

Glutathion-Peroxidasen (EC 1.11.1.9, GPX) katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder organischen Hydroperoxiden zu Wasser bzw. dem entsprechenden Alkohol unter Verbrauch von Glutathion (GSH) als Elektronendonator (Mills 1957).

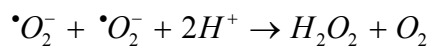


In Säugetieren wurden sechs GPX-Isoformen beschrieben. Die GPX1 wurde 1973 als erstes Selenoprotein identifiziert (Flohé 1973). Sie ist im Zytosol aktiv und wird ubiquitär

exprimiert, wobei besonders hohe Aktivitäten in Leber, Niere und Erythrozyten zu finden sind (Flohé 1973). Die Se-abhängige GPX2 wird vor allem im Gastrointestinaltrakt exprimiert und gilt als am stärksten durch oxidativen Stress regulierbar (Banning 2005). Weitere Se-abhängige Isoformen sind die GPX3, die in der Niere gebildet wird und im Extrazellularraum aktiv ist, die GPX4, die auch komplexe, organische Hydroperoxide reduziert, sowie die GPX6 (Kryukov 2003). Daneben gibt es noch die Se-unabhängige GPX5, die gegenüber H₂O₂ und organischen Hydroperoxiden kaum aktiv ist.

Das Gen für die humane, zytosolische Glutathion-Peroxidase (*GPX1*) liegt auf dem Chromosom 3, ist ca. 1,2 kb groß und besteht aus zwei Exons (Chada 1990, Moscow 1992). Zur Regulation der GPX1-Expression finden sich im Promotor bspw. Sauerstoff Responsive Elemente (ORE, *oxygen response element*) (Cowan 1993), eine Bindungsstelle für p53 (Tan 1999) sowie AP1-Bindungsstellen im Intron (Moscow 1992).

Superoxid-Dismutasen (EC 1.15.1.1., SOD) katalysieren die Disproportionierung („Dismutation“) des Superoxidradikals zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (McCord 1969).



In Säugetieren wurden drei SODs beschrieben. Im Zytosol findet sich die SOD1 mit Kupfer und Zink im aktiven Zentrum (Cu,Zn-SOD), in den Mitochondrien die manganhaltige SOD2 (Mn-SOD) und im Extrazellularraum die kupfer- und zinkhaltige SOD3 (EC-SOD) (Fridovich 1997). SODs werden in allen Geweben stark exprimiert, so dass ein hohes Maß an Schutz gegenüber Superoxidradikalen garantiert ist (Younes 2004).

Das Gen für die humane Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (*SOD1*) liegt auf dem Chromosom 21 (21q22.1), umfasst rund 11 kb und wird durch vier Introns unterbrochen (Levanon 1985). Die Regulation der SOD1-Expression wird über eine Vielzahl von Bindungsstellen auf verschiedene Umwelteinflüsse hin vermittelt (Kim 1994, Chang 2002, s. a. Tab. 1-1).

| cis-Element | Induktor | Referenz |
|--|---|----------------------------|
| AP2-Bindungsstelle | Ginsenosid Rb ₂ | Kim 1996 |
| PPRE (peroxisome proliferator response element) | Arachidonsäure, Retinsäure, 9- <i>cis</i> -Retinsäure | Yoo 1999A |
| HRE (hydrogen peroxide response element) | H ₂ O ₂ | Yoo 1999B |
| MRE (metal response element) | Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ | Yoo 1999C |
| XRE (xenobiotic response element) | β-Naphthoflavon, <i>tert</i> -Butylhydrochinon, Iodoacetamid 2,3,7,8-Tetrachloro- dibenzo- <i>p</i> -dioxin | Yoo 1999D Park 2002 |
| HSE (heat shock element) | 42 °C, Paraquat | Yoo 1999B |
| ARE (antioxidative response element) | 2,3,7,8-Tetrachloro- dibenzo- <i>p</i> -dioxin | Park 2002 |
| SP1/Erg1/WT1-Bindungsstelle | 12-O-Tetradecanoyl- phorbol-13-Acetat | Minc 1999 |

Tabelle 1-1: Übersicht über die Möglichkeit der Induktion des SOD1-Gens.

Aufgeführt sind regulatorische Sequenzen des SOD1-Promotors (*cis*-Elemente) sowie Substanzen oder Umwelteinflüsse, die die Aktivierung der entsprechenden Elemente nachweisbar auslösen können (Induktoren). [Übersicht in Anlehnung an Chang 2002]

1.3 Methoden zum Nachweis der Regulation der Aktivität von antioxidativen Enzymen

Die Regulation der Enzymaktivität kann durch Zeitpunkt und Häufigkeit der Transkription, durch die Prozessierung der primär gebildeten RNA zur mRNA, durch den Export der mRNA aus dem Zellkern ins Zytosol und ihre dortige Lokalisation, durch die Stabilität der mRNA, durch die Translation sowie durch Phosphorylierung, Kompartimentierung oder Stabilität des Enzyms beeinflusst werden (Alberts 2002). Durch Bindung aktivierend oder reprimierend wirkender Proteine (Transkriptionsfaktoren) an spezifische Sequenzelemente (proximaler Promotor) kann bspw. die Expression dieses Gens in Abhängigkeit von Zelltyp, Stoffwechsellage oder Umwelteinflüssen reguliert werden.

Die Steigerung der Enzymaktivität kann im Prinzip über jeden der oben genannten Punkte vermittelt werden. Die aktivierende Wirkung einer Substanz auf einen dieser Punkte muss in der Gesamtheit jedoch nicht zwingend mit einer erhöhten Enzymaktivität einhergehen, da unter Umständen auch gegenregulatorische Prozesse eingeleitet werden können (z. B. verstärkte Degradation, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung).

Untersuchungen hinsichtlich der Bioaktivität von Verbindungen werden idealerweise am Versuchstier durchgeführt. Die Wirkung einer Substanz kann nur im Zusammenspiel aller Organe miteinander sowie unter Beachtung spezifischer Zellinteraktionen im Gewebe wie auch der systemischen Regulation (Nervensystem, endokrines System) beurteilt werden. So spielen bei über die Nahrung aufgenommenen Substanzen bspw. die intestinale Barriere wie auch die Leber eine wichtige Rolle (Sambury 2001). Tierversuche werfen jedoch rechtliche, moralische und ethische Fragen auf, sind zeit- und kostenintensiv und sind somit nicht für die großflächige Testung geeignet. In den letzten Jahren wurde deshalb eine Vielzahl von zellkultur-basierten Modellsystemen entwickelt. Zellkulturmodelle ermöglichen hinsichtlich der Bioaktivität von Substanzen bei konstanteren Versuchsbedingungen (Kontrolle der physiochemischen Umgebung, Homogenität der Zellen) die gezielte Untersuchung eines Mechanismus. Die Umsetzung von Zellkulturversuchen in 96-Well-Platten ist zudem mit einem geringeren Materialeinsatz verbunden und bietet die Möglichkeit zur Automatisierung. *In-vitro*-Modellsysteme eignen sich damit für die routinemäßige Testung einer großen Anzahl von Substanzen (Spielmann 2004).

Eine Vielzahl von Untersuchungen hinsichtlich der Steigerung von CAT-, GPX- oder SOD-Aktivität durch exogene Faktoren konzentriert sich direkt auf den Endpunkt Enzymaktivität (z. B. Ramiro-Puig 2007, Rajasekar 2007). Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgt häufig anhand von photometrisch, luminometrisch oder fluorometrisch detektierbaren Veränderungen im Zuge des enzymatischen Substratumsatzes (Flohé 1984A+B, Aebi 1984). Ebenfalls weit verbreitet ist der einfache Nachweis der Gesamtzymmenge über die Bindung markierter Antikörper gegen das gesuchte Enzym. Der Status der Enzymaktivität wird hierbei jedoch nicht berücksichtigt (z. B. Raschke 2006).

Derartige Untersuchungen werden bevorzugt am Versuchstier (v. a. Ratte) durchgeführt. Die Versuchstiere werden der zu untersuchenden Einflussgröße für einen definierten Zeitraum ausgesetzt. Anschließend wird im Serum oder Gewebehomogenaten die Aktivität der zu untersuchenden Enzyme bestimmt (z. B. Rajasekar 2007, Ramiro-Puig 2007).

Die Umsetzung dieses Prinzips auf Zellkulturmodelle gestaltet sich jedoch schwieriger. Auch wenn sie nicht von Tumoren abgeleitet sind, durchlaufen die Zellen während des Immortalisierungsprozesses Veränderungen in Bezug auf die Genausstattung und Genexpression (Freshney 2000). Selbst etablierte Zellkulturen verändern ihr Muster der Phase-II-Enzymexpression im Laufe der Passagen (Wilkening 2003). Der Nachweis der Modulation der AOE-Aktivität durch exogene Faktoren ist häufig erst nach oxidativer Stimulierung der Zellen mög-

lich (z. B. Stimulation von murinen Makrophagen mit Lipopolysacchariden, Choi 2003). Lee et al. haben V79-4-Zellen mit Pflanzenextrakten behandelt und dann die SOD-, CAT- und GPX-Aktivitäten bestimmt (Lee 2003). In der Arbeitsgruppe konnte die Enzymaktivitätsbestimmung mit V79-Zellen im *96-Well*-Format jedoch nicht etabliert werden (unveröffentlichte Daten).

Als Marker für eine mögliche Steigerung der Enzymaktivität, wird zudem in vielen Studien die für das entsprechende Enzym kodierende mRNA quantifiziert (z. B. Röhrdanz 2000, Röhrdanz 2003 mittels Northern Blot; Röhrdanz 2002, Sadi 2007 mittels RT-PCR). Gesteigerte mRNA-Spiegel nach Behandlung von Tieren oder Kulturzellen können auf eine vermehrte Transkription aber auch auf andere Mechanismen zurückzuführen sein. Die Steigerung der CAT-Aktivität und –mRNA-Spiegel in der Lunge von Ratten bei Hyperoxie bspw. liegt in einer Stabilisierung der mRNA begründet (Clerch 1992). Zudem bleiben posttranskriptionale und –translationale Proteinmodifikationen unbeachtet.

Andere Untersuchungen wiederum beschränken sich bei der Überprüfung der Aktivitätssteigerung von AOE auf die Promotoraktivierung (z. B. Toyokuni 2003). Die Fähigkeit zur Steigerung der Transkription (Induktion) ist einer der oben genannten Mechanismen, fördernd auf die Enzymaktivität einzuwirken, und ist somit ein guter Marker dafür. Sie ermöglicht jedoch keine Aussage über eine tatsächliche Steigerung der Enzymaktivität, da posttranskriptionale Regulationsmechanismen nicht erfasst werden.

Die Aktivierung der Promotoren kann indirekt über die Aktivität eines Reporterenzym gemessen werden (Abb. 1.1). Reportergene kodieren für Enzyme, deren Aktivität sich eindeutig von anderen intrinsischen Aktivitäten der Zellen unterscheidet und leicht, sensitiv sowie reproduzierbar nachweisbar ist. Zudem sollten die Reporterenzyme keiner posttranslationaler Prozessierung bedürfen (Neurath 1997).

Der zu untersuchende Promotor wird in einen geeigneten Vektor vor das Reportergen kloniert, so dass die Transkription des Reportergens durch eben diesen Promotor reguliert wird. Dieses Konstrukt wird in Tiere oder Kulturzellen transfiziert und in den so genetisch modifizierten Zellen oder Organismen exprimiert. Exogene Faktoren können das Expressionsverhalten beeinflussen. Anschließend kann in den Lysaten aus Kulturzellen oder Gewebeextrakten die Reporterenzymaktivität bestimmt werden, wobei diese direkt proportional zur Transkriptionsrate und damit zur Promotoraktivität ist. Das Spektrum der Verfahren zum Nachweis der Reporterenzymaktivität ist sehr breit. Häufig werden aufgrund der höheren

Sensitivität chemo- und biolumineszierenden Bestimmungsmethoden verwendet (Bronstein 1994).

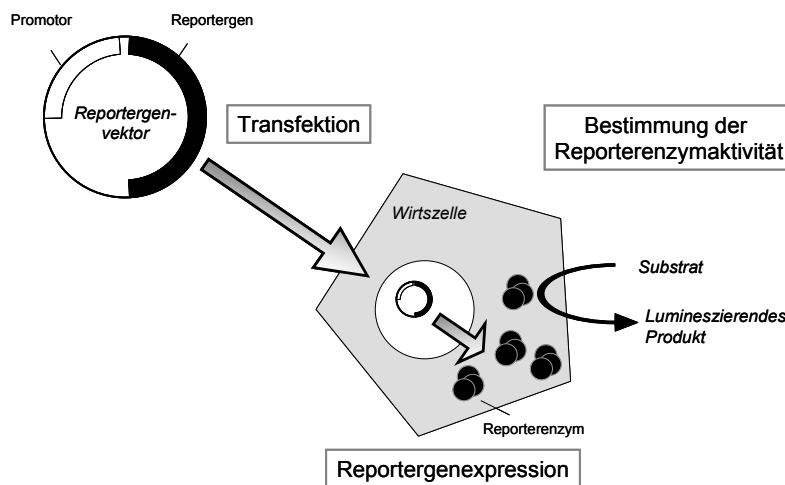


Abbildung 1.1: Prinzip der Reporterexpression

Nach der Transfektion des Promotor-Reporter-gen-Konstrukts in Kulturzellen, erfolgt die Transkription des Reporter-gens unter der Steuerung des zu untersuchenden Promotors. Nach Prozessierung und Export der Reporter-gen-Transkripte ins Zytosol erfolgt die Synthese des Reporter-enzym. Die Aktivität des Reporter-enzym wird häufig anhand der enzymatischen Bildung lumineszierender Produkte gemessen und ist direkt proportional zur Transkriptionsrate bzw. zur Aktivität des steuernden Promotors.

Dieses Verfahren bedarf zum Ausgleich von Schwankungen in der Zellviabilität, der Transfektionseffizienz oder der Probenaufarbeitung eines internen Standards. Hierfür wird ein zweites Reporter-gen unter der Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden Promotors kotransfiziert (Alam 1990). Dabei ist es wichtig, beide Reporter-enzymaktivitäten voneinander unterscheiden zu können. Als „experimenteller Reporter“ wird dasjenige Reporter-enzym bezeichnet, dessen Expression vom zu untersuchenden Promotor reguliert wird und dessen Aktivität folglich mit den speziellen experimentellen Bedingungen korreliert. Das konstitutiv exprimierte Reporter-gen wird als „Standardreporter“ bezeichnet.

Eine Vielzahl von Kombinationen ist möglich. Besonders verbreitet und kommerziell erhältlich ist die Kombination von zwei verschiedenen Luciferase-Genen (Abb. 1.2). Bei den beiden Reporter-genen handelt es sich zum einen um das aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) klonierte Luciferase-Gen (Wood 1984, de Wet 1985). Das Reporter-enzym – im Weiteren *Firefly*-Luciferase (EC 1.13.12.7) genannt – katalysiert die Oxidation von *beetle*-Luciferin, wobei Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert wird. Das zweite Reporter-gen ist das aus dem Seestiefmütterchen (*Renilla reniformis*) klonierte Luciferase-Gen (Lorenz 1991). Das Reporter-enzym – im Weiteren als *Renilla*-Luciferase (EC 1.13.12.5) bezeichnet – oxidiert Coelenteraten-Luciferin (Coelenterazin), wobei Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird.

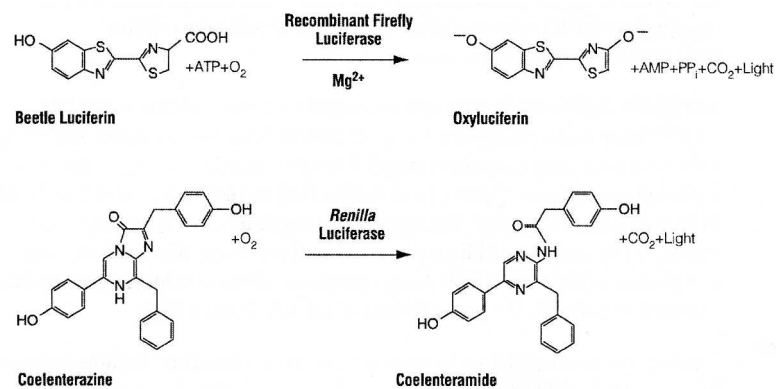


Abbildung 1.2: Durch *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-katalysierte Biolumineszenz-Reaktionen (Promega 2006)

Durch die unterschiedliche Substratspezifität der Enzyme ist eine selektive Zuordnung der biolumineszierenden Reaktion gewährleistet. Das *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* der Firma Promega ermöglicht die Kotransfektion von „experimentellem“ und „Standard-Vektor“, die simultane Expression beider Reporterenzyme in einem einzelnen System sowie – nach Aufarbeitung der Proben – die Messung beider individueller Reporterenzymaktivitäten in der gleichen Probe (Abb. 1.3).

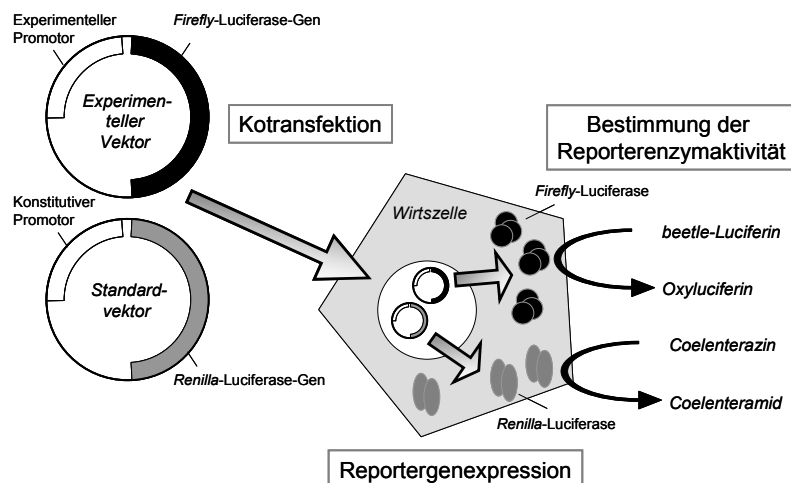


Abbildung 1.3: Prinzip des Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Beim Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay werden zwei verschiedene Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte ko-transfiziert. Die Transkription der Reportergene durch die Wirtszelle erfolgt simultan. Dabei wird die Transkription des *Renilla*-Luciferase-Gens durch einen konstitutiv aktiven Promotor reguliert, womit eine hohe Transkriptionsrate gewährleistet ist. Demgegenüber steuert der zu untersuchende (experimentelle) Promotor die Transkription des *Firefly*-Luciferase-Gens in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen. Nach Prozessierung und Export der Reportergentranskripte ins Zytosol erfolgt die Synthese der Reporterenzyme. Die Bestimmung der Aktivitäten der Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase erfolgt anhand der Bildung lumineszierender Produkte, wobei die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzyme die selektive Unterscheidung der Lumineszenzreaktionen ermöglicht. Die Normalisierung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die konstitutive *Renilla*-Luciferase-Aktivität dient dem Ausgleich experimenteller Schwankungen (z. B. Zellviabilität, Transfektionseffizienz).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion von CAT, GPX1 und SOD1 untersucht. Dazu diente die *Firefly*-Luciferase als „experimenteller Reporter“. Es wurden Konstrukte verwendet, in denen die Transkription eines rekombinanten *Firefly*-Luciferase-Gens (*luc+*) durch AOE-Promotoren reguliert wurde (Toyokuni 2003). Zur Standardisierung wurde ein *Renilla*-Luciferase-Konstrukt mit dem Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-(HSV-TK)-Promotor kotransfiziert. Dieser Promotor ermöglicht die konstitutive Expression in vielen Zellen.

1.4 Bekannte und mögliche Induktoren von CAT, GPX1 und SOD1

Antioxidative Enzyme (AOE) konnten in verschiedenen Zellen durch oxidativen Stress (z. B. H_2O_2 , Paraquat) in ihrer Aktivität gesteigert werden (Harris 1992). Über den Mechanismus der Regulation ist nur wenig bekannt. Diskutiert wird eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1. Sie werden in vielen Zellen durch oxidativen Stress aktiviert. Bindungsmotive für wenigsten einen der beiden Faktoren finden sich in vielen oxidativ induzierbaren Genen (Sen 1996).

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gehört zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Es entsteht als zweites Zwischenprodukt der sukzessiven Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff, kann aber auch durch eine direkte Zwei-Elektronen-Übertragung gebildet werden (Younes 2004). H_2O_2 ist kein Radikal und damit relativ stabil. Es gilt jedoch als Quelle für Hydroxylradikale, die nach der Fenton-Reaktion (Fenton 1876) aus der Interaktion von H_2O_2 mit Übergangsmetallionen (Fe^{2+} , Cu^+) oder nach der Haber-Weiß-Reaktion (Haber 1932, 1934) in Zusammenarbeit von H_2O_2 und dem Superoxidradikal gebildet werden.

Vom H_2O_2 wurde die Induktion aller drei hier untersuchten antioxidativen Enzyme berichtet. Yoo et al. wiesen eine Aktivierung des Ratten-SOD1-Promotors mittels Reportergenkonstrukten in humanen Hepatomzellen (HepG2) nach (Yoo 1999B). Verantwortlich für die Promotoraktivierung zeigte sich ein Wasserstoffperoxid Responsives Element (HRE, engl. *hydrogen peroxide response element*). Zudem konnte mittels Reportergenkonstrukten eine Aktivierung des Ratten-Katalase- und des humanen GPX1-Promotors beobachtet werden (Toyokuni 2003).

Paraquat (Methylviologen) gehört chemisch zur Klasse der Bipyridyle. Es ist als Kontaktherbizid seit Anfang der 1960er Jahre auf dem Markt und ist auch heute noch weit ver-

breitet als solches im Einsatz. Die toxische Wirkung von Paraquat auf Pflanzen- und Tierzellen beruht auf der Bildung von Superoxid-Anionen (Farrington 1973, Krall 1988), welche hochreaktiv sind und zu massiven Zellschädigungen führen. Die Behandlung von Kulturzellen mit Paraquat resultierte in einem Anstieg der mRNA-Spiegel (Röhrdanz 2000) und der Aktivität (Stevens 1988) von CAT und SOD. Die GPX-Aktivität hingegen wurde reduziert (Stevens 1988). Bezüglich der SOD wurde nachgewiesen, dass die Regulation auf transkriptioneller Ebene erfolgt. So konnte mittels Reportergen-Assay eine Aktivierung des Ratten-SOD1-Promotors gezeigt werden, welche über das Hitzeschockelement im SOD1-Promotor vermittelt wurde (Yoo 1999B).

Der Phorboldiester 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) ist der potenteste einer Reihe von Tumorpromotoren, die aus Krotonöl isoliert wurden (Hecker 1967). TPA ist in der Lage, die Expression des Gens für die SOD1 zu steigern und fand deshalb in Reportergen-Assays zur Untersuchung der SOD1-Promotor-Aktivierung mehrfach Anwendung als Modell-Agonist (Minc 1999, Toyokuni 2003).

Eine Hochregulation von SOD2 und GPX wurde in der humanen Brustdrüsen-Tumorzelllinie MCF-7 durch 17 β -Östradiol berichtet (Borrás 2005). Der Effekt wurde durch den Östrogenrezeptor über den MAPK- und NF κ B-Signalweg vermittelt. Dies ließ vermuten, dass Isoflavone mit östrogenen Wirkung einen ähnlichen Effekt auslösen könnten. In der Tat konnte die gleiche Arbeitsgruppe in MCF-7-Zellen einen Anstieg der SOD2-mRNA durch Vorinkubation mit dem Isoflavon Genistein zeigen (Borrás 2006).

Das Sojapolyphenol Genistein (Walz 1931, Walter 1941) besitzt neben seiner östrogenen Wirkung auch antioxidative Eigenschaften (Lee 2005). Ein regulierender Effekt auf die Aktivität antioxidativer Enzyme wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Choi et al. berichteten von einer Erhöhung der CAT- und SOD-Aktivität durch Genistein in mit Lipopolysacchariden stimulierten murinen Macrophagen (RAW 264.7) (Choi 2003). Suzuki et al. zeigten einen Anstieg der GPX1-mRNA-Spiegel mit einhergehender, erhöhter Enzymaktivität in humanen Prostatakrebszelllinien (LNCaP, PC-3) nach Stimulation mit Genistein, wobei die gleiche Behandlung keinen Effekt auf die CAT- und SOD-Aktivität hatte (Suzuki 2002). Auch Kameoka et al. beobachteten keine Veränderung der CAT- und SOD1-Aktivität in humanen Adenokarzinomzellen (CaCo2) durch die Behandlung mit Genistein (Kameoka 1999).

Flavonoide sind phenolische Substanzen, die in einer Reihe von Pflanzen vorkommen. Ihnen wird eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten zugeschrieben (Benthath 1936, Rusznyak 1936), wobei ihre antioxidative Wirkung von besonderem Interesse ist. Sie vermindern einerseits die ROS-Bildung durch Hemmung von daran beteiligten Enzymen, können ROS aufgrund ihres niedrigeren thermodynamischen Reduktionspotentials reduzieren oder durch Komplexbildung stabilisieren (Pietta 2000, Cotelle 2001). Daneben wurde von Grünteephenolen berichtet, dass sie den MAPK-Signalweg aktivieren und somit über das Antioxidanz Responsive Element (ARE) in der Promotorregion von Phase-II-Enzymen induzierend wirken können (Rushmore 2002). Flavonoide könnten folglich über die nicht-enzymatische antioxidative Wirkung hinaus wichtige modulierende Effekte auf verschiedene Transkriptionsfaktoren haben, die den intrazellulären Redoxstatus regulieren (Yamamoto 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb neben Genistein auch Quercetin, Catechin und Epigallocatechingallat als Vertreter der Flavonoide in Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Induktion von CAT, GPX1 und SOD1 untersucht.

Das Flavonol Quercetin findet sich in vielen Lebensmitteln (Zwiebel, Apfel, Brokkoli, Wein, Tee), so dass der Mensch tagtäglich hohen Konzentrationen ausgesetzt ist (Hertog 1993). Versuche an Ratten zeigten eine Verminderung antioxidativer Enzyme (CAT, GPX) nach Verabreichung von Quercetin (Breinholt 1999). Demgegenüber konnte der durch UVA-Bestrahlung induzierte Verminderung von CAT-, GPX- und SOD-Aktivitäten in Ratten durch vorherige Gabe von Quercetin entgegengewirkt werden (Inal 2001, Kahraman 2002). *In-vitro*-Studien berichteten von einem Anstieg der GPX- und SOD1-mRNA-Spiegel in der Rattenhepatomzelllinie H4IIE nach Behandlung mit Quercetin (Röhrdanz 2003). In der humanen Hepatomzelllinie HepG2 wurden durch Quercetin steigende GPX- und CAT-mRNA-Spiegel sowie eine konzentrationsabhängige Steigerung oder Reduktion des SOD1-mRNA-Spiegels beobachtet (Alía 2006).

Das Flavonol Catechin kommt in Tee, Früchten und Rotwein vor und ist damit ein weit verbreitetes Polyphenol. Es ist als potentes Antioxidanz beschrieben worden (Yoneda 1995, Noda 1997), jedoch ist über seinen Einfluss auf die Aktivität antioxidativer Enzyme noch wenig bekannt. *In-vivo*-Studien, in denen Catechin oder catechinhaltige Nahrungsmittel zugefüttert wurden, zeigten veränderte Enzymaktivitäten von CAT, GPX oder SOD. So beobachteten Jeon et al. eine Verminderung der CAT- und SOD-Aktivität sowie eine Steigerung der GPX-Aktivität in Balb/c-Mäusen. Bei durch UVB-Strahlung induzierter Verminderung der

CAT- und SOD-Aktivität wirkte die Vorbehandlung mit Catechin präventiv (Jeon 2003). In *in-vitro*-Untersuchungen konnten neben einer ansteigenden SOD-Aktivität auch erhöhte mRNA-Spiegel festgestellt werden, was auf eine mögliche Induktion der SOD1 durch Catechin hinweist (Chan 2002, Chow 2002).

Epigallocatechingallat (EGCG) ist ein Catechinderivat, das hauptsächlich im grünen Tee zu finden ist und stark antioxidative Eigenschaften besitzt (Yoneda 1995, Noda 1997). In *Drosophila melanogaster* führte die 20tägige Verabreichung von Longjing-Grüntee-Catechinextrakt (62 % EGCG) zum Anstieg der CAT- und SOD1-Aktivität sowie -mRNA-Spiegel (Li 2007). Keine Änderung der CAT- und SOD-Aktivität wurde nach Behandlung von OSC2- und OSC-4-Zellen, die aus zervikalen metastatischen Lymphknoten von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom isoliert wurden, sowie humanen primären epidermalen Keratinozyten (NHEK) mit EGCG festgestellt werden (Yamamoto 2003). Allerdings konnte den durch die Behandlung mit Endprodukten der Maillard-Reaktion (engl. *advanced glycation endproducts*) induzierten Alterationen der AOE-Aktivität durch die Behandlung mit EGCG in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y vorgebeugt werden (Lee 2007).

Carnitin ist ein wasserlösliches quaternäres Amin. Es spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle als essentieller Kofaktor für den Transport von langkettigen Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran und gilt zudem als Antioxidanz (Tein 1996). In zahlreichen Studien wurden Ratten prooxidativen Stressoren (z. B. intermittierende hypobarische Hypoxie) ausgesetzt, was zu einer Steigerung der Konzentration oxidativer Stressmarker (z. B. thiobarbitursäurereaktive Substanzen) führte und außerdem mit einer veränderten CAT-, GPX- oder SOD-Aktivität einherging. Die Behandlung mit L-Carnitin konnte diese Effekte verhindern, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht geklärt wurde (Irat 2003, Asha Devi 2007, Rajasekar 2007).

Ascorbat ist für den Menschen essentiell, kommt vor allem in Obst, Gemüse und Grüntee vor und ist als starkes Antioxidanz beschrieben (Svirbely 1932, Pauling 1970). Es wirkt als Radikalfänger, da es direkt mit Superoxid- und Hydroxylradikalen sowie mit diversen Lipidhydroperoxiden reagieren kann. Zudem regeneriert es oxidiertes Vitamin E (Witting 1964). Ganztierstudien lieferten Hinweise auf eine modulierende Wirkung von Vitamin C auf antioxidative Enzyme. Ähnlich wie beim L-Carnitin beschrieben, zeigten sich in diesen Experimenten eine präventive Wirkung von Vitamin C auf durch prooxidative Stressoren hervor-

gerufene Veränderungen von AOE-Aktivitäten (Sadi 2007, Asha Devi 2007). Der genaue Mechanismus wurde dabei nicht aufgeklärt. In kultivierten Rattenhirnastrozyten (RBA-1) wirkte Vitamin C in hohen Konzentrationen vermindern auf SOD1-Aktivität und –mRNA-Spiegel (Kao 2003).

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin-E-Derivat (Scott 1974, Cort 1975). Vitamin E wurde 1922 als essentieller Nahrungsbestandteil entdeckt (Evans 1922, Fernholz 1938) und findet sich in Ölsamen wie Alfalfa, Mais und Soja. Vitamin E selbst ist seit langem als Antioxidanz bekannt (Crider 1961, Witting 1964). Auch in der wasserlöslichen Form wirkt es stark antioxidativ und wird in antioxidativen Assays oft als Referenzsubstanz eingesetzt, was sich in der Angabe der *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) äußert (Miller 1993). Daneben weisen Tierversuche auf eine modulierende Wirkung von Trolox auf Aktivität und Expression von Phase-II-Enzymen hin. Durch hepatische Ischämie und anschließende Reperfusion hervorgerufene Veränderungen in der CYP-Aktivität und –mRNA-Spiegel beispielsweise konnten durch die vorherige Gabe von Trolox verhindert werden (Eum 2004).

1.5 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *in-vitro*-Testsystem zum Nachweis der Induktion von Katalase (CAT), zytosolischer Glutathion-Peroxidase (GPX1) und Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) zu etablieren. Dazu wurde ein Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay in 96-Well-Format entwickelt, der die Testung großer Substanzmengen in relativ kurzer Zeit ermöglicht. Im Zuge dessen wurden drei Säugetierzelllinien auf ihre Eignung als Modellzelllinie untersucht. Nach Auswahl einer Zelllinie und Festlegung der Versuchsparameter erfolgte die Auswahl einer Referenzsubstanz. Getestet wurden dafür zehn Substanzen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen. Dazu zählten zum einen Verbindungen, die bereits als Induktoren für mindestens eines der Enzyme beschrieben worden sind, zum anderen potentielle Induktoren wie die Nahrungsflavonoide, von denen regulierende Effekte auf die antioxidative Enzyme (z. B. Steigerung der mRNA-Spiegel) berichtet worden sind, sowie Substanzen, die sich allgemein durch eine antioxidative Wirkung auszeichneten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Brutschrank | CO ₂ -Inkubator CB 150 | Binder GmbH (Tuttlingen, D) |
| Elektrophoresesystem | Mini Protean® 3 Cell | Bio Rad (München, D) |
| | Mini Sub Cell GT | Bio Rad (München, D) |
| | Power Pac 1000 | Bio Rad (München, D) |
| | Power Pac 300 | Bio Rad (München, D) |
| Elektroporator | Gene Pulser II System | Bio Rad (München, D) |
| Heizblock | Thermomixer comfort | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Kryokontainer | Arpege 55 | Air Liquide (Düsseldorf, D) |
| Kühl-Gefrierkombi | Liebherr comfort | Liebherr (Ochsenhausen, D) |
| Magnetrührer | COLOR SQUID | IKA®-Werke GmbH (Staufen, D) |
| Mikroskop | Eclipse TE300 | Nikon GmbH (Düsseldorf, D) |
| | Eclipse TS100 | Nikon GmbH (Düsseldorf, D) |
| Mixer | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY USA) |
| pH-Meter | Profilab pH 597 | WTW (Weilheim, D) |
| Pipetten | Reference | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| | Research | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| | Multipette stream | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| | Research pro 8-Kanal | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Pipettierhilfe | Pipetus | Hirschmann Laborgeräte GmbH (Eberstadt, D) |
| Plattenfluorometer/ -luminometer | Fluoroskan Ascent FL | Labsystem (Helsinki, Fin) |
| Schüttler | MixMate | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Schüttelinkubator | 3033 | GFL (Wunstorf, D) |
| Spektralphotometer | Ultrospec™ 2100 <i>pro</i> | Amersham / GE Biosciences (Buckinghamshire, UK) |
| Sterilwerkbank | Hera Safe KS12, HSP 12 | Heraeus (Hanau, D) |
| Trockenschrank | Heraeus Kelvitron®t | Heraeus (Hanau, D) |
| UV-Detektionsgerät | Fluorescent Combi-Light | LTF (Wasserburg/B, D) |
| | BioCapt-Software | LTF (Wasserburg/B, D) |
| Waagen | BL 600 | Sartorius (Göttingen, D) |
| | BP 301 S | |
| Wasserbad | 1092 | GFL (Wunstorf, D) |

| | | |
|---------------|---|---|
| Zellzählgerät | CASY® 1 TT | Schärfe (Reutlingen, D) |
| Zentrifugen | Biofuge fresco Universal 16 R Centrifuge 5810R Mini Spin | Heraeus (Hanau, D) Hettich (Tuttlingen, D) Eppendorf (Hamburg, D) Eppendorf (Hamburg, D) |

2.2 Materialien

2.2.1 Verbrauchsmaterial

Die aufgeführten Verbrauchsmaterialien werden zum Teil von den angegebenen Firmen in unterschiedlichen Größen angeboten und entsprechend den experimentellen Anforderungen verwendet. Falls es sich nicht um steriles Einwegmaterial handelte, wurden die Materialien für den Einsatz in der Zellkultur vor der Benutzung autoklaviert.

| | | |
|---------------------------|---------------------------------|--|
| 96-Well-Mikrotiterplatten | Nunclon™ Δ Surface | Fisher Scientific (Schwerte, D) |
| Casy Cups | | Schärfe (Reutlingen, D) |
| Falcon | | Sarstedt (Nürmbrecht, D) |
| Handschuhe | Diamond Grip Plus Supreno SE | Microflex Corp. (Wien, A) Microflex Corp. (Wien, A) |
| Halbmikro Einmalküvetten | | Plastibrand, Wertheim |
| Kryoröhrchen | | TPP (Trasadingen, CH) |
| Parafilm | M | Pechiney Plastic Packaging (Chicago, Ill., USA) |
| Pasteurpipetten | | Roth (Karlsruhe, D) |
| Pipettenspitzen | | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Reaktionsgefäße | | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Serologische Pipetten | | Sarstedt (Nürmbrecht, D) |
| Sterilfilter | | TPP (Trasadingen, CH) |
| Zellkulturschalen | untersch. Größe | TPP (Trasadingen, CH) |
| Zellschaber | Cell Scraper 25 cm | Sarstedt (Nürmbrecht, D) |

2.2.2 Reagenzien, Biochemikalien

| | |
|------------------|---|
| 1 kb DNA Ladder | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |
| 2-Log DNA Ladder | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |

| | |
|--|--|
| Agar | Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK) |
| Agarose | Biodeal Laboratories (Wadhwan City, India) |
| Alamar Blue [®] | AdB Serotec (Kidlington, UK) |
| Ampicillin | AppliChem GmbH (Darmstadt, D) |
| L-Ascorbinsäure (Natriumsalz) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O) | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| L-Carnitin-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Casyclean | Schärfe (Reutlingen, D) |
| Casyton | Schärfe (Reutlingen, D) |
| (+)-Catechin-Hydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Dulbecco's MEM | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| EDTA Dinatriumsalz Dihydrat | Roth (Karlsruhe, D) |
| (-)-Epigallocatechingallat (EGCG) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Essigsäure | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethanol | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe, D) |
| Fötales Rinderserum (FBS) | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Genistein | AppliChem GmbH (Darmstadt, D) |
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | Merck KGaA (Darmstadt, D) |
| Glycerol | Roth (Karlsruhe, D) |
| Hefeextrakt | Roth (Karlsruhe, D) |
| HEPES | Roth (Karlsruhe, D) |
| 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure (Trolox) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merk (Darmstadt, D) |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7H ₂ O) | Roth (Karlsruhe, D) |
| MEM Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA) | Invitrogen/Gibco |

| | |
|--|--|
| Methylviologenhydrat (Paraquat) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Orange Loading Dye (6X) | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Quercetin-Dihydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| 12- <i>O</i> -Tetradecanoyl-phorbol-13-Acetate (TPA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D) |
| Tris | Roth (Karlsruhe, D) |
| Trypsin/EDTA Lösung (10.000 U/ml) | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Trypton/Pepton aus Casein | Roth (Karlsruhe, D) |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Roth (Karlsruhe, D) |

2.2.3 Kits

| | |
|--|--|
| CellPfect Transfection Kit | Amersham / GE Biosciences (Buckinghamshire, UK) |
| Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System | Promega GmbH (Mannheim, D) |
| E.Z.N.A. [™] Plasmid Miniprep Kit I | Omega Bio-Tek, Inc. (Doraville, GA USA) |
| GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit | Amersham / GE Biosciences (Buckinghamshire, UK) |
| HiSpeed [®] Plasmid Midi Kit | QIAGEN GmbH (Hilden, D) |
| MicroElute Gel Extraction Kit | Omega Bio-Tek, Inc. (Doraville, GA USA) |

2.2.4 Lösungen, Puffer

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich entionisiertes Wasser (Wasser, H₂O) verwendet. Für den Einsatz in zell- oder molekularbiologischen Arbeiten wurden die entsprechenden Puffer und Lösungen vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert (Porengröße 0,45 µm oder 0,22 µm).

Kultivierung von Bakterien

LB-Medium 950 ml Wasser
 10 g Trypton/Pepton aus Casein
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt

 pH 7,0 mit NaOH einstellen, auf 1 l mit Wasser auffüllen,
 Zugabe von Ampicillin vor Gebrauch (Endkonzentration: 100 µg/ml);
 Lagerung bei +4 °C

LB-Agar-Platten 1 l LB-Medium
 15 g Agar

 Nach dem Autoklavieren unter Rühren auf 60 °C abkühlen, Zugabe von
 Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml), in 10-cm-Zellkulturschalen
 gießen und aushärten lassen; Lagerung bei +4 °C für maximal 4 Wo-
 chen

Glucose-Lösung 2 M Glucose

 in H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei RT

Mg²⁺-Lösung 24,65 g MgSO₄ x 7H₂O
 20,33 g MgCl₂ x 6H₂O

 Ad 100 ml H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei RT

S.O.C.-Medium 2,0 g Trypton/Pepton aus Casein
 0,5 g Hefeextrakt
 1 ml 1 M NaCl
 0,25 ml 1 M KCl
 97 ml H₂O

 autoklaviert, Lagerung bei RT, unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von:

 1 ml 2 M Glucose-Lösung
 1 ml 2 M Mg²⁺-Lösung

Kultivierung von tierischen Zellen

1X DMEM 54,16 g Dulbecco's MEM
 6,0 g NaHCO₃
 19,08 g HEPES

 ad 4 l H₂O, pH 7,4, sterilfiltriert, Lagerung bei +4 °C

Kulturmedium
(IEC-18, V79)

| | |
|-----------|--|
| 89 % | 1X DMEM (4,5 g/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 1,5 g/l NaHCO ₃) |
| 10 % | FBS |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

Lagerung bei +4 °C

Kulturmedium
(CaCo2)

| | |
|-----------|--|
| 88 % | 1X DMEM (4,5 g/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 1,5 g/l NaHCO ₃) |
| 10 % | FBS |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 1 % | MEM Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA) |

Lagerung bei +4 °C

Serumfreies Medium (SFM)

| | |
|--|--|
| | 1X DMEM (4,5 g/l Glucose, 4 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 1,5 g/l NaHCO ₃) |
| | 100 U/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |

Lagerung bei +4 °C

PBS

| | |
|---------|---|
| 137 mM | NaCl |
| 5,36 mM | KCl |
| 1,47 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 8 mM | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O |

in H₂O, pH 7,4, autoklaviert, Lagerung ungeöffnet bei Raumtemperatur, anschließend bei +4 °C

Transfektionspuffer

CaCl₂-Lösung

| | |
|-----|-------------------|
| 1 M | CaCl ₂ |
|-----|-------------------|

in H₂O, autoklaviert, Lagerung bei +4 °C

Phosphatpuffer

| | |
|---------|--|
| 50 mM | HEPES (pH 7,05 bei 23 °C) |
| 1,26 mM | Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O |
| 140 mM | NaCl |

in H₂O, autoklaviert, Lagerung bei +4 °C

| | | |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <u>15 % Glycerol in isotonischem HEPES</u> | 0,238 g 80 ml | HEPES H ₂ O |
| | Titration mit NaOH auf pH 7,5 | |
| | 18,9 g 0,877 g ad 100 ml | Glycerol NaCl H ₂ O |
| | steril filtriert, Lagerung bei +4 °C | |

Sonstige Puffer und Lösungen

| | | |
|---|--|----------------------------------|
| <u>50X Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)</u> | 2 M 5,71 % 0,05 mM | Tris Essigsäure (v/v) EDTA |
| | in H ₂ O, pH 8,0, Lagerung bei RT | |

| | | |
|-------------------------------------|--|--------------|
| <u>Tris EDTA-Puffer (TE-Puffer)</u> | 10 mM 1 mM | Tris EDTA |
| | in H ₂ O, pH 8,0, Lagerung bei RT | |

Ethidiumbromidbad 0,5 µg Ethidiumbromid/ml 1 x TAE-Puffer

2.2.5 Enzyme und dazugehörige Puffer

Restriktionsenzyme

| | |
|-----------------|---|
| <i>Bgl</i> II | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |
| <i>Dra</i> III | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |
| <i>Hind</i> III | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |
| <i>Kpn</i> I | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| <i>Xba</i> I | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| <i>Xho</i> I | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |

Puffer für Restriktionsenzyme

| | |
|---------------------|---|
| Buffer KpnI (10X) | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| Buffer Tango™ (10X) | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) |
| NEBuffer 2 (10X) | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |
| NEBuffer 4 (10X) | New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA USA) |

Sonstige

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| T4-DNA-Ligase | Promega GmbH (Mannheim, D) |
| Rapid Ligation Buffer (2X) | Promega GmbH (Mannheim, D) |

2.2.6 Plasmide

| | |
|--|----------------------------|
| pGL3-Basisvektor, pGL3-Kontrollvektor, pGL4.83[<i>hRlucP</i> /Puro] | Promega GmbH (Mannheim, D) |
|--|----------------------------|

| | |
|------------------------------------|---|
| pGL3-SOD, pGL3-GPX, pGL3-CAT | zur Verfügung gestellt von S. Toyokuni, MD/PhD (Department of Pathology and Biology of Diseases, Graduate School of Medicine, Kyoto University) (Toyokuni 2003) |
|------------------------------------|---|

| | |
|---------|--|
| phRL-TK | zur Verfügung gestellt von Dr. A. Steege (Institut für Vegetative Physiologie, Charité Berlin) |
|---------|--|

| | |
|----------|---|
| pEYFP-N1 | zur Verfügung gestellt von Dr. habil. F. Neuschäfer-Rube (Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam) |
|----------|---|

2.2.7 Bakterienstämme

| | |
|--------------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | elektrokompetent zur Verfügung gestellt von Dr. habil. F. Neuschäfer-Rube (Inst. f. Ern.wiss., Universität Potsdam) |
|--------------------------------------|--|

| | |
|-------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | chemokompetent zur Verfügung gestellt von Dr. A. Steege (Institut für Vegetative Physiologie, Charité Berlin) |
|-------------------------------|--|

2.2.8 Tierische Zelllinien

| | |
|-------|--|
| CaCo2 | humane Kolonadenokarzinomzellen zur Verfügung gestellt von der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal) |
|-------|--|

| | |
|--------|--|
| IEC-18 | Ileumepithel der Ratte American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) |
|--------|--|

V79

Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GmbH (Braunschweig, D)

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmide

Tabelle 2.1 gibt einen kurzen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Ausführliche Vektorkarten finden sich im Anhang 1. Der pGL4-TK-Vektor wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert. Die anderen Vektoren wurden entweder vom Hersteller bezogen oder von anderen Arbeitsgruppen erworben (s. Kap. 2.2.6).

| Plasmid | Reportergen | Promotor/Enhancer (Regulation des Reportergens) | Resistenzgen |
|----------------------------|---------------|---|--------------------------------------|
| <i>pGL3-Basisvektor</i> | <i>luc+</i> | ohne Promotor/Enhancer | Amp ^r |
| <i>pGL3-Kontrollvektor</i> | <i>luc+</i> | Promotor/Enhancer des simianen Virus (SV) 40 | Amp ^r |
| <i>pGL3-CAT</i> | <i>luc+</i> | Promotor der Rattenkatalase (-2631 bis +3, GenBank AH004967) | Amp ^r |
| <i>pGL3-GPX</i> | <i>luc+</i> | Promotor der humanen zytosolischen Glutathion-Peroxidase (-1389 bis -565, GenBank M83094) | Amp ^r |
| <i>pGL3-SOD</i> | <i>luc+</i> | Promotor der humanen Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (-1499 bis +27, GenBank AP001711) | Amp ^r |
| <i>pGL4-TK</i> | <i>hRlucP</i> | Thymidinkinase-(TK)-Promotor des Herpes-simplex-Virus (HSV) | Amp ^r , Puro ^r |
| <i>pGL4.83</i> | <i>hRlucP</i> | ohne Promotor/Enhancer | Amp ^r , Puro ^r |
| <i>phRL-TK</i> | <i>hRluc</i> | Thymidinkinase-(TK)-Promotor des Herpes-simplex-Virus (HSV) | Amp ^r |
| <i>pEYFP-N1</i> | <i>EYFP</i> | Zytomegalievirus-(CMV)-Promotor | Kan ^r , Neo ^r |

Tabelle 2-1: Übersicht über die Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

luc+ = rekombinantes *Firefly*-Luciferase-Gen, *hRlucP*, *hRluc* = rekombinante *Renilla*-Luciferase-Gene, EYFP = *Enhanced-Yellow-Fluorescent-Protein*-Gen, Amp^r = β -Lactamase-Gen (vermittelt Ampicillin-Resistenz), Puro^r = Puromycin-*N*-Acetyltransferase-Gen (vermittelt Puromycin-Resistenz), Kan^r/Neo^r = Neomycin-Phosphotransferase-Gen (vermittelt Kanamycin- und Neomycin-Resistenz)

2.3.1.1 Klonierung von pGL4-TK

Als Grundgerüst diente der pGL4.83, der für die *Renilla*-Luciferase, die Ampicillin-Resistenz sowie die Puromycin-Resistenz für die Vermehrung in eukaryontischen Zellen kodiert. Letzteres ermöglicht die Generierung stabil transfizierter Zelllinien und die spätere Übertragung des Versuchs in dieses System. Vor das *Renilla*-Luciferase-Gen wurde der HSV-TK-Promotor eingebaut, um eine konstitutive Expression des Gens in eukaryontischen Zellen

zu garantieren. Als Donor für den HSV-TK-Promotor diente das vorliegende phRL-TK-Plasmid. Zunächst wurden beide Plasmide einer gleichzeitigen Fragmentierung mit *Bgl*II und *Hind*III unterzogen (s. Kap. 2.3.4.2). Beim phRL-TK-Plasmid flankierten die Schnittstellen für die Enzyme den HSV-TK-Promotor und setzten diesen somit frei. Beim pGL4.83-Vektor lagen die Schnittstellen für die Enzyme in der multiplen Klonierungsstelle (MCS, engl. *multiple cloning site*), so dass das Plasmid unter Freisetzung eines sehr kleinen DNA-Fragments geöffnet wurde. Gleichzeitig entstanden an den Enden Überhänge, die komplementär zu denen des HSV-TK-Promotors waren, so dass ein gerichteter Einbau des Promotors in das Vektorgerüst gewährleistet war.

Nach Beendigung der DNA-Fragmentierung wurden die vollständigen Ansätze im Agrose-Gel aufgetrennt (s. Kap. 2.3.5). Die Banden, die den HSV-TK-Promotor und den geschnittenen pGL4.83 repräsentierten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die entsprechende DNA eluiert (s. Kap. 2.3.3.2).

Zum Einbau des HSV-TK-Promotors in den geschnittenen pGL4.83 wurden 0,75 µl Wasser, 1 µl des Vektors (≈ 99 ng) und 0,25 µl des Inserts (≈ 33 ng) gemischt, womit ein molares DNA-Verhältnis von annähernd 1:2 gegeben war. Hinzu kamen 5 µl des 2X Rapid Ligation Buffer sowie 3 µl T4-DNA-Ligase (= 3 U). Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert anschließend in chemokompetente TOP10 transformiert (s. Kap. 2.3.2). Zur Überprüfung des Erfolgs der Klonierung erfolgten Fragmentierungen der isolierten DNA (s. Kap. 2.3.4.3).

2.3.2 Transformation von Bakterien

Zur Vervielfältigung der verwendeten Plasmide wurden kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (DH5 α , TOP10) transformiert. Unter Transformation versteht man die Fähigkeit von Prokaryonten, unter geeigneten Bedingungen freie DNA aufzunehmen. Bei Kultivierung der Bakterien wird die eingeschleuste DNA mittels bakterieller DNA-Replikationsmechanismen vervielfältigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kompetente Gefrierkulturen des apathogenen *E. coli*-Stamms DH5 α zur Transformation von pGL3-Basisvektor, pGL3-Kontrollvektor, pGL3-SOD, pGL3-GPX und pGL3-CAT verwendet. TOP10-Bakterien dienten zur Transformation des pGL4-TK-Vektors. Bei der Elektroporation werden die Bakterien kurzzeitig einer hohen Spannung ausgesetzt. Bei der chemischen Transformation werden die Zellen schnellen Tem-

peraturwechseln unterzogen. In beiden Fällen werden die Zellen gestresst und damit die Durchlässigkeit ihrer Membranen erhöht, so dass DNA eingeschleust werden kann.

Elektroporation

50 µl der gefrorenen DH5α-Suspension wurden auf Eis angetaut, mit 1 ng DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde in die Apparatur gestellt und für einige Sekunden eine Spannung von 2500 Volt angelegt. Unmittelbar darauf wurden 950 µl vorgewärmtes S.O.C.-Medium zugegeben und zweimal resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert.

Chemische Transformation

100 µl der gefrorenen TOP10-Suspension wurden auf Eis angetaut und mit dem Ligationsansatz (133 ng DNA) verrührt. Der Ansatz wurde zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann für 30 s einem Hitzeschock unterzogen (42 °C, Heizblock) und wiederum 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl vorgewärmtes S.O.C.-Medium zugesetzt und die Bakteriensuspension für 45 min bei 37 °C unter Schütteln (300 rpm) im Heizblock inkubiert.

2.3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Um sicherzustellen, dass ausschließlich transformierte Bakterien vermehrt wurden, erfolgte die Kultivierung der Bakterien unter Ampicillin-Selektion (100 µg/ml). Zur Vermeidung von Kontaminationen der Kulturen wurden der Arbeitsplatz und die Hände mit 70 %igem Ethanol besprüht und alle Arbeiten unter der Brennerflamme vorgenommen. Das Kulturmedium wurde stets im Wasserbad auf 37 °C vortemperiert.

Direkt nach der Transformation wurden 100 – 500 µl der Bakteriensuspension auf sterilen LB-Agar-Platten ausplattiert und unter der Brennerflamme getrocknet. Daraufhin wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und über Kopf bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze abgenommen, in 5 ml autoklaviertes LB-Medium überführt und als Suspensionskultur für 8 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (160 rpm) vermehrt. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden von dieser Starterkultur 100 µl in 50 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (160 rpm) vermehrt.

2.3.2.2 Anlegen von Bakterienstammkulturen

Zur Anlegung von Bakterienstammkulturen wurden 750 µl einer getrübbten Übernachtskultur retransformierter *E. coli*-Bakterien mit 250 µl autoklaviertem Glycerol (60 %) in einem Reaktionsgefäß gemischt, womit sich eine Endkonzentration von 15 % Glycerol ergab. Das Gemisch wurde gevortext, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurden Kits verschiedener Anbieter genutzt. Allen gemein ist die alkalische Lyse der Bakterien, Bindung der DNA an eine anbieterspezifische Säulenmatrix, wodurch RNA, Proteine und niedermolekulare Kontaminanten abgetrennt werden, und die Aufnahme der DNA in Lösungen mit geringer Salzkonzentration (z. B. entionisiertes Wasser, TE-Puffer), damit die DNA für nachfolgende Experimente (z. B. Transfektion) eingesetzt werden kann.

Plasmid-DNA wurde mit dem HiSpeed[®] Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben aus den Bakterien isoliert. Wurden nur geringe Mengen der Vektoren benötigt, wurde die Plasmid-DNA mittels E.Z.N.A.[™] Plasmid Miniprep Kit I der Firma Omega Bio-Tek, Inc. oder dem GFX *Micro* Plasmid Prep Kit der Firma GE Healthcare Bio-Sciences Ltd. gewonnen.

Isolierte Plasmid-DNA wurde entsprechend den Herstelleranweisungen in Elutionspuffer oder TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Plasmid-DNA wurde maximal zwei Tage bei +4 °C und längerfristig bei -20 °C gelagert.

2.3.3.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Im Rahmen der Klonierung wurde Plasmid-DNA fragmentiert und im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kap. 2.3.5). Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel erfolgte unter Verwendung des MicroElute Gel Extraction Kits der Firma Omega Bio-Tek, Inc. entsprechend der Herstelleranweisung. Die extrahierte DNA wurde in Elutionspuffer gelöst.

2.3.3.3 Photometrische Quantifizierung, Reinheitsbestimmung

Die Konzentration von Lösungen isolierter DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Nukleinsäuren bedingt durch die aromatischen Ringe der Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Weiterhin ermöglicht dieses Verfahren eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung. Während Nukleinsäuren maximal bei 260 nm absorbieren, haben Proteine ein Maximum bei 280 nm. Der Quotient E_{260}/E_{280} ist folglich umso niedriger je stärker die Lösung mit Proteinen kontaminiert ist.

Die DNA-Lösung wurde 1:50 verdünnt. Als Nullwert diente je nach Lösungsmittel der DNA Wasser oder 1:50 verdünnter TE-Puffer. Mittels Spektralphotometer wurde die Absorption (E) der Lösung bei 230, 260, 280 und 320 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration (c) ergibt sich nach der Formel:

$$c = E_{260} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \text{ (vom Gerät berechnet)}$$

Eine Lösung galt als rein, wenn der Quotient E_{260}/E_{280} zwischen 1,7 und 1,9 lag.

2.3.4 **Enzymatische Fragmentierung von Plasmiden**

In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Fragmentierung von Plasmiden zur Überprüfung der Identität isolierter Plasmid-DNA sowie zur Klonierung von Plasmid-DNA angewandt. Endonucleasen bakteriellen Ursprungs spalten hydrolytisch doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Je nach Lage dieser Sequenzen auf dem DNA-Molekül ergeben sich Fragmente definierter Länge, die mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und im Vergleich mit einem Längenstandard einer ungefähren Größe zugeordnet werden können.

2.3.4.1 Kontrolle und Charakterisierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Identität isolierter DNA wurden die Vektoren pGL3-SOD, pGL3-GPX, pGL3-CAT, pGL4-TK sowie pGL3-Basis- und pGL3-Kontrollvektor einer Fragmentierung mit *XbaI* unterzogen. Dazu wurde ein 20- μl -Ansatz aus 1 μg DNA, 10 U *XbaI*, Buffer TangoTM sowie Wasser erstellt. Dieser wurde über Nacht bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Enzym durch eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert, um eine unspezifische Spaltung zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.3.5). Anzahl und Größe der entstandenen Fragmente bei neu isolierter DNA wurde mit denen von der Original-DNA oder vorherigen Isolaten verglichen, um fehlerhaftes Synthetisieren auszuschließen.

2.3.4.2 Fragmentierung von pGL4.83 und phRL-TK

Im Zuge der Klonierung des pGL4-TK-Vektors (s. Kap. 2.3.1.1) wurden die Plasmide pGL4.83 und phRL-TK einer Doppelfragmentierung durch *Bgl*III und *Hind*III unterzogen. Damit wurde die HSV-TK-Promotor-Region aus dem phRL-TK-Vektor freigesetzt und der pGL4.83-Vektor geöffnet. Zudem wurden bei beiden Fragmenten die entsprechenden Überhänge für einen gerichteten Einbau des HSV-TK-Promotors in das pGL4.83-Gerüst geschaffen.

Dazu wurden je 3 µg DNA, je 10 U von *Bgl*III und *Hind*III sowie NEBuffer 2 mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kap. 2.3.5). Anschließend wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel isoliert (s. Kap. 2.3.3.2).

2.3.4.3 Kontrolle von pGL4-TK

Nach Klonierung des pGL4-TK-Vektors (s. Kap. 2.3.1.1) wurden nach Transformation von Bakterien und Isolierung der Plasmid-DNA aus mehreren Klonen zwei Kontrollfragmentierungen zur Überprüfung der Identität der isolierten DNA durchgeführt.

Zunächst wurde eine Doppelfragmentierung der isolierten Plasmid-DNA mit *Bgl*III und *Hind*III als Umkehr der Klonierung durchgeführt, so dass pGL4.83-Grundgerüst und HSV-TK-Promotor wieder voneinander getrennt wurden. Dazu wurden Ansätze mit je 1 µg DNA, 5 U von *Bgl*III, 10 U *Hind*III sowie 2X Buffer TangoTM zusammen pipettiert. Diese wurden für 3,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kap. 2.3.5).

Zudem wurde die DNA mit *Dra*III gespalten, um sicherzugehen, dass tatsächlich das gewünschte Konstrukt pGL4-TK (zwei Schnittstellen für *Dra*III) und nicht der Ausgangsvektor phRL-TK (eine Schnittstelle für *Dra*III) vorlag. Die Reaktionsansätze enthielten je 1 µg DNA, 10 U *Dra*III sowie NEBuffer 3 in einfacher Konzentration. Sie wurden für 3,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt (s. Kap. 2.3.5).

2.3.5 **Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen basiert auf der Tatsache, dass DNA über einen großen pH-Bereich konstant negativ geladen ist und somit im

elektrischen Feld zur Anode wandert. Die Mobilität der DNA in einer festen Gelmatrix ist einerseits abhängig von der Molekülgröße. Kleine DNA-Moleküle bewegen sich schneller durch die Poren des Gels. Zum anderen spielt bei zirkulären DNA-Molekülen auch die Form eine Rolle. Lineare Plasmide beispielsweise wandern mit geringerer Geschwindigkeit durch die Poren des Gels als superhelikale Plasmide.

Agarose-Gelelektrophoresen wurden in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung von DNA-Fragmentierungen, zur schnellen Charakterisierung der Art und Menge der DNA sowie zum Vergleich von isolierter DNA und dem Ausgangsmaterial eingesetzt. Eine exakte Größenbestimmung war dabei nicht notwendig, so dass ausschließlich Mini-Gele mit einer Laufstrecke von 10 cm verwendet wurden.

Vor dem Auftragen der DNA wurde sie mit dem Auftragspuffer 6X Orange Loading Dye (Fermentas) versetzt. Damit erhöhte sich die DNA-Dichte, was das Absinken der DNA in die Auftragstasche förderte und ihre Diffusion in den Laufpuffer verhinderte. Zudem enthielt der Auftragspuffer anionische Farbstoffe, so dass der Experimentator optisch auf den Fortgang der DNA-Wanderung schließen konnte. Zur Größenbestimmung der DNA-Moleküle wurde parallel zu den Proben ein Längenstandard aufgetragen. Als Längenstandard wurden die 1 kb DNA Ladder (NEB) oder die 2-Log DNA Ladder (NEB) eingesetzt, womit DNA-Größen von 0,1 bzw. 0,5 bis 10 Kilobasenpaaren abgedeckt wurden.

Zur Sichtbarmachung der DNA in den Agarose-Gelen nach Beendigung der Elektrophorese kam der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zur Anwendung. Diese Substanz kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden, wobei sich die Intensität der Fluoreszenz im interkalierten Zustand deutlich erhöht.

Zur Herstellung eines 1 %igen (w/v) Agarose-Gels wurden 0,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 50 ml 1X TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst. Die klare, schlierenfreie Agarose-Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen. Zur Ausbildung von Auftragstaschen im Gel wurde ein Kamm eingesetzt. Das Gel härtete innerhalb von etwa 30 min bei Raumtemperatur aus. Anschließend wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt, der Kamm entfernt und das Gel mit 1X TAE-Puffer übergossen. Pro Probe wurden 1 µl Auftragspuffer mit 50 – 100 ng DNA gemischt, mit Wasser auf ein Volumen von 6 µl aufgefüllt und in die Auftragstasche pipettiert. Als Längenstandard wurde in eine der Geltaschen eine Lösung aus 1 µl Auftragspuffer, 1 µl Längenstandard und 4 µl Wasser aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei konstant 100 Volt über einen Zeitraum von 60 min. Im Anschluss daran wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad überführt und für 15 min inkubiert. Das Ethidiumbromid wurde im UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, das Gel fotografiert und anschließend ausgewertet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Standardmethoden der Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurden drei adhärent wachsende Säugetierzelllinien kultiviert. IEC-18-Zellen sind immortalisierte Epithelzellen des Ileums der Ratte (Quaroni 1979). Sie sind nicht transformiert, zeigen aber keine ausgeprägten morphologischen oder funktionellen Charakteristika von ausdifferenzierten Enterozyten (Sambuy 2001). Die Zelllinie Ca-Co2 ist aus einem humanen Kolonadenokarzinom hervorgegangen (Fogh 1977). Es handelt sich damit um transformiertes Kolonepithel, dennoch gelten die Zellen als stark differenziert, zeigen morphologische und funktionelle Eigenschaften von reifen Enterozyten und werden deshalb häufig als Modell für die intestinale Barriere verwendet (Sambuy 2005). V79-Zellen sind durch spontane Transformation aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters hervorgegangen (Robbins 1967). Sie sind weder humanen noch intestinalen Ursprungs. Allerdings handelt es sich um eine anerkannte Modellzelllinie, die häufig und weltweit in toxikologischen Untersuchungen angewendet wird (OECD 1997).

Alle Zellkulturarbeiten wurden an der Sterilwerkbank unter Verwendung von Handschuhen, Kittel und 70 %igem Ethanol durchgeführt. Zum Subkultivieren, Waschen und Behandeln von Zellen wurden die Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Vor und nach jeder Behandlung wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Konfluenzgrad oder möglicher Kontamination beurteilt.

2.4.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von tierischen Zellen

Die Zellen wurden in entsprechendem Kulturmedium im Brutschrank bei 37 °C (ist das Temperaturoptimum für tierische Zellen), 95 % Luftfeuchtigkeit (dient als Verdunstungsschutz) und 5 % CO₂ (bildet ein Puffersystem mit Bikarbonat im Medium) gehalten. Je nach Fragestellung erfolgte die Kultivierung in sterilen Kulturschalen mit unterschiedlich großen Wachstumsflächen. Ein Wechsel des Mediums erfolgte spätestens nach 72 h beziehungsweise auch dann, wenn die Notwendigkeit durch den Umschlag des im Kulturmedium enthaltenen Farbindikators Phenolrot nach gelb gegeben war. Hierzu wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und durch eine entsprechende Menge an frischem Kulturmedium ersetzt. Zwischengeschaltetes Waschen mit PBS, was erneuten Stress für die Zellen bedeutete, erfolgte nur, wenn Behandlungen beendet werden sollte, d.h. Testsubstanzen möglichst vollständig von den Zellen entfernt werden sollten.

| Plattenformat | Kulturmedium-Volumen | PBS-Volumen zum Waschen |
|---------------|----------------------|-------------------------|
| 15 cm | 30 ml | 12 ml |
| 10 cm | 12 ml | 5 ml |
| 3,5 cm | 2 ml | 1 ml |
| 6-Well | 2 ml | 1 ml |
| 96-Well | 0,2 ml | 0,1 ml bzw. 0,25 ml |

Tabelle 2-2: Übersicht über die Volumina an Kulturmedium und PBS bei der Kultivierung von tierischen Zellen in Abhängigkeit des Plattenformats.

Auftauen kryokonservierter Zellen

Die verwendeten Zelllinien lagen als Gefrierkulturen vor. Jedes Aliquot enthielt eine Million Zellen in 1 ml Medium (70 % Kulturmedium, 20 % FBS, 10 % DMSO) und wurde in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen einer solchen Kryokultur wurden zunächst 12 ml Kulturmedium in eine 10 cm-Kulturschale pipettiert. Anschließend wurde ein Aliquot aus dem Stickstoffbehälter genommen, bei 37 °C aufgetaut, in das vorgelegte Medium überführt und die Zellen durch horizontales Schwenken der Kulturschale gleichmäßig über die Platte verteilt. Bei V79- und IEC-18-Zellen erfolgte 4 h später ein Mediumwechsel, um tote Zellen und das restliche DMSO zu entfernen. CaCo2-Zellen benötigten mehr Zeit zur Anheftung an das Kulturgefäß. Deshalb wurden zunächst weitere 8 ml Kulturmedium zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte am Folgetag.

Subkultivierung von tierischen Zellen

Sobald adhärent wachsende Zellen einen geschlossenen Zellrasen bilden – also keine freie Gefäßoberfläche mehr erkennbar ist und die Zellen sich berühren – spricht man von Konfluenz. In diesem Stadium kommt es zu Stoffwechselveränderungen der Zellen und bei nicht transformierten Zellen meist zu einer Kontaktinhibition des Wachstums. Für experimentelle Arbeiten sollte Konfluenz vermieden und die Kulturen rechtzeitig ausgedünnt werden.

Die Ablösung der Zellen von der Gefäßoberfläche erfolgte mit Hilfe der Protease Trypsin. Zunächst wurde das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Dies galt der Entfernung von abgestorbenen Zellen sowie von Mediumresten, da letztere die Trypsinaktivität hemmen. Dann wurde eine entsprechende Menge an Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen pipettiert und die Zellen für einige Minuten bei 37 °C inkubiert (Tab. 2.3 und 2.4). Nach Ablauf der Zeit wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes laterales Klopfen

fen der Schale unterstützt. Es folgte die Zugabe von Kulturmedium in einer Menge, die mindestens dreimal so hoch war wie die des Trypsins. Im Kulturmedium enthaltenes Serum enthält Komponenten, die die Trypsinaktivität hemmen und somit die Reaktion abbrechen. Die Zellen wurden anschließend ausführlich im Medium resuspendiert. Ein Teil davon wurde mit neuem Medium vermischt und neu eingesät.

Für die Subkultivierung wurde ein Zehntel (CaCo2) oder ein Zwanzigstel (IEC-18, V79) der Zellsuspension aus einer subkonfluenten Kulturschale auf eine neue übertragen. Bei der Einsaat für Experimente wurde zunächst die Zellzahl der vorhandenen Zellsuspension bestimmt (s. Kap. 2.4.1.2). Anschließend wurde eine Suspension definierter Zellzahl hergestellt, mittels Magnetrührer gut gemischt und auf Kulturschalen eingesät (unter Verwendung von Dispensierpipetten bei 96-Well-Platten).

| Plattenformat | Trypsin/EDTA-Volumen | Medium-Volumen zum Abstoppen |
|---------------|----------------------|------------------------------|
| 15 cm | 3 ml | 9 ml |
| 10 cm | 1 ml | 4 ml |
| 3,5 cm | 0,2 ml | 0,8 ml |

Tabelle 2-3: Übersicht über die Volumina an Trypsin/EDTA und Kulturmedium bei der Subkultivierung von tierischen Zellen in unterschiedlichen Plattenformaten.

| Zelllinie | Inkubationszeit des Trypsins |
|-----------|------------------------------|
| CaCo2 | 10 min |
| IEC-18 | 6 min |
| V79 | 4 min |

Tabelle 2-4: Übersicht über die Trypsin-Inkubationszeit bei tierischen Zellen.

2.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Kontrolle des Wachstumsverhaltens sowie zur Einsaat definierter Zellzahlen musste die Zellzahl vorliegender Kulturen bestimmt werden. Dazu wurde durch Trypsinierung und Resuspendieren eine Zellsuspension hergestellt. Bei hoher Zellkonzentration wurde die Suspension unter Umständen mit weiterem Medium verdünnt, damit die Zellzahl die Obergrenze des Zellszählgeräts nicht überstieg.

Von der Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen, mit 10 ml Casyton versetzt und durch Invertieren gemischt. Entsprechend der Herstelleranweisung wurde die Zellzahl mit

dem Zellzählgerät CASY[®] 1 TT unter Berücksichtigung aller Partikel der Größe von 8 bis 40 μm bestimmt.

2.4.2 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit

Unter der Populationsverdopplungszeit (t_v) wird die Zeitspanne verstanden, in der sich die Zellzahl verdoppelt und somit jede Zelle einmal den Zellzyklus vollständig durchlaufen hat. Sie gilt als wichtiges Charakteristikum von Zelllinien. Ihre Bestimmung ermöglicht die Berechnung von Zellkonzentrationen für zukünftige Zeitpunkte, so dass sichergestellt ist, dass die Zellen im exponentiellen Wachstum kultiviert werden.

Unter dem Wachstum von Kulturzellen versteht man die Zunahme der Zellzahl. Es gliedert sich in drei Phasen. Am Anfang steht die *lag*-Phase, in der sich die Zellen an die neue Umgebung gewöhnen. Sie ist durch eine geringe Teilungsrate gekennzeichnet. Es folgt eine Phase, in der die Zellen mit maximaler Geschwindigkeit wachsen und somit die Zellzahl exponentiell zunimmt. Diese Phase wird als *log*-Phase bezeichnet. Mit zunehmender Dichte der Zellen in der Kulturschale sinkt die Teilungsrate wieder. Die Zunahme der Zellzahl reduziert sich bis hin zur Stagnation, was als stationäre oder – dem Verlauf der Kurve entsprechend – als Plateau-Phase bezeichnet wird.

Zur Ermittlung von Wachstumskurven von CaCo₂-, IEC-18- und V79-Zellen wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen in 3,5-cm-Schalen eingesät, wobei für jeden Messpunkt drei Schalen vorgesehen wurden. Die Gesamtzellzahl an jedem Zählzeitpunkt ergab sich somit als Mittelwert aus drei Einzelzählungen. Die erste Zellzahlbestimmung erfolgte cirka fünf Stunden nach der Einsaat (IEC-18, V79) oder am Folgetag (CaCo₂). An den folgenden Tagen wurde jeweils morgens und abends gemessen. Das Kulturmedium wurde alle 48 h gewechselt, sofern indiziert auch einmal in 24 h, wobei zwischen Mediumwechsel und Zellzählung mindestens 24 h lagen. Mit Verlassen der *log*-Phase wurde die Wachstumskurve abgebrochen.

Die Populationsverdopplungszeit wurde aus der *log*-Phase ermittelt. Die Zellzahlen wurden zur Basis 2 logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen. Das Reziprok des Anstiegs (m) der Regressionsgerade ergab die Verdopplungszeit (t_v). Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde das Experiment wiederholt. Die jeweils erhaltenen Populationsverdopplungszeiten wurden gemittelt.

2.4.3 Bestimmung der Reporterenzym-Aktivität

Zur Untersuchung der Aktivierung von Promotoren wurden in der vorliegenden Arbeit Reportergene verwendet. Zunächst wurden mit Hilfe des Reporterenzym EYFP (engl. *enhanced yellow fluorescent protein*) die Bedingungen für die transiente Transfektion von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen eingestellt. Aus dem Ergebnis dieses Versuchsteil wurde eine Zelllinie für die Transfektion der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Reporterengenvektoren ausgewählt. Anschließend erfolgte für die gewählte Zelllinie die Einstellung der Bedingungen für die Bestimmung der Reporterenzym-Aktivität. Getestet wurden dabei die Kultivierung in unterschiedlichen Plattenformaten sowie die Transfektion unterschiedlicher DNA-Mengen.

2.4.3.1 Transiente Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Dafür steht eine Vielzahl an verschiedenen Methoden zur Verfügung, deren Effizienz stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen abhängt.

Die Calciumphosphat-Kopräzipitation wurde von Graham et al. zur Transformation von Säugetierzellen durch virale DNA entwickelt (Graham 1973) und ist bis heute eine der meist verbreiteten Methoden, da sie einfach durchgeführt werden kann, sehr kostengünstig ist und keiner speziellen Apparaturen bedarf. Das Prinzip der Methode ist die Mischung von gereinigter DNA mit einer Calciumchloridlösung und anschließender Zugabe eines phosphathaltigen Puffers. In Gegenwart der Phosphat-Lösung bildet sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat, welcher leicht mit Hilfe des Mikroskops als schwarze Körnchen zu sehen oder als Trübung der Lösung mit bloßem Auge sichtbar ist. Die DNA, die auch Phosphatgruppen enthält, fällt bei dieser Methode mit aus. Die Kristalle werden durch die Zielzellen vermutlich per Endozytose aufgenommen. Die Effizienz dieser Methode liegt je nach Zelltyp bei 5 – 30 %, wobei die Zellen bei transienter Transfektion ihr Expressionsmaximum 48 – 72 h nach Transfektion erreichen.

Transiente Transfektion von pEYFP-N1 zur Optimierung der Transfektion

Für die vorliegende Arbeit wurde anhand der Transfektion von pEYFP-N1 geprüft, ob bzw. wie gut CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen mit verschiedenen Methoden transfizierbar sind. Das Plasmid pEYFP-N1 kodiert für das *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP). Dabei handelt es sich um eine optimierte, verstärkt gelb-grün fluoreszierende Variante des *Green Fluorescent Protein* (GFP) mit einem Emmissionsmaximum bei einer Wellenlänge von

527 nm. GFP ist ein natürlich fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*. Nach erfolgreicher Transfektion von pEYFP-N1 in die Zellen kann das gebildete EYFP mit einem Fluoreszenzmikroskop (Exzitation: 460 – 500 nm, Emmission: 510 – 560 nm) detektiert werden.

Von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen wurden 6-cm-Schalen sowie eine 96-Well-Platte eingesät und im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 30 – 40 % kultiviert. Pro Zelllinie wurde jeweils eine 6-cm-Schale nach drei verschiedenen Protokollen (Protokoll 1A, 1B und 2A) bzw. je 4 Wells der 96-Well-Platte (Protokoll 2B) transient mit pEYFP-N1 transfiziert. Inkubationszeiten, DNA-Menge, Pufferzusammensetzung und -volumen der einzelnen Protokolle sind in Tabelle 2.5 zusammengestellt.

Einige Zeit vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen. In einem Reaktionsgefäß wurde die entsprechende DNA-Menge auf ein definiertes Volumen mit Wasser verdünnt. Zunächst wurde die Calciumchlorid-Lösung zugegeben, resuspendiert und gegebenenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Phosphatpuffers, wonach ebenfalls resuspendiert und ggf. bei RT inkubiert wurde. Unter vorsichtigem Schwenken der Kulturschale wurde der Transfektionsansatz auf das Medium getropft und die Kulturschale anschließend für mehrere Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zur Beendigung der Transfektion wurden die Zelle mehrmals mit serumfreien Medium (SFM) gewaschen, um das Calciumpräzipitat zu entfernen. Anschließend wurde der Schockpuffer zugegeben, für 3 min bei RT inkubiert und durch erneutes Waschen mit SFM wieder entfernt. Die Zellen wurden dann mit Kulturmedium im Brutschrank inkubiert und 24 bzw. 48 h nach Beginn der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Anzahl an EYFP-exprimierenden Zellen galt dabei als Maß für die Transfektionseffizienz.

| | Protokoll 1 | | Protokoll 2 | |
|--|--------------|------|-------------|----------------|
| | A | B | A | B |
| <i>Plattenformat</i> | 6-cm-Schale | | 6-cm-Schale | 96-Well-Platte |
| <i>Mediumwechsel vor Transfektion</i> | 3 h | | 1 h | |
| <i>DNA-Gehalt (pEYFP-N1)</i> | 4,35 µg | | 4,35 µg | 483 ng |
| <i>dH₂O-Volumen</i> | 120 µl | | 187,5 µl | 7,5 µl |
| <i>Calciumchlorid-Lösung</i> | 120 µl (**) | | 62,5 µl (*) | 2,5 µl (*) |
| <i>Inkubationszeit</i> | 10 min, RT | | --- | |
| <i>Phosphatpuffer</i> | 240 µl (***) | | 250 µl (#) | 10 µl (#) |
| <i>Inkubationszeit</i> | 15 min, RT | | --- | |
| <i>Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes</i> | 480 µl | | 500 µl | 20 µl |
| <i>Inkubationszeit (Brutschrank)</i> | 6 h | 20 h | 5 h | |
| <i>Schockpuffer</i> | 1,5 ml (°°) | | 1 ml (°) | 20 µl (°) |
| <i>Inkubationszeit</i> | 3 min | | 3 min | |

(*) 1 M CaCl₂; (**) 0,5 M CaCl₂ in 0,1 M HEPES Puffer, pH 7,0 (CellPhect)

(#) 50 mM HEPES, pH 7,05, 23 °C; 1,26 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl

(###) 0,28 M NaCl, 0,75 mM NaH₂PO₄, 0,75 mM Na₂HPO₄, in 0,05 M HEPES-Puffer, pH 7,0 (CellPhect)

(°) 15 % (v/v) Glycerol in Kulturmedium, (°°) 15 % Glycerol in isotonischem HEPES-Puffer

Tabelle 2-5: Übersicht über Inkubationszeiten, DNA-Menge, Pufferzusammensetzung und -volumen bei der transienten Transfektion von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen mit pEYFP-N1.

Optimierte Protokolle für die transiente Transfektion

Aus den Ergebnissen dieses Versuchsteils wurden Protokolle entwickelt, die in den nachfolgenden Experimenten zur transienten Transfektion von pEYFP-N1 sowie den Reporter-Genvektoren angewendet wurden. Für die Transfektion von in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurde Protokoll 1A modifiziert. In 96-Well-Platten kultivierte Zellen wurden nach einer abgewandelten Form von Protokoll 2B transfiziert. Zudem wurde sich in Hinblick auf die Weiterentwicklung des Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays für die Fibroblastenlinie V79 entschieden. Damit wurde auch der spätere Zeitraum festgelegt, in dem transient transfizierte Zellen im Rahmen des Reporter-Gen-Assays mit der Testsubstanz stimuliert werden sollten. Da V79-Zellen eine Populationsverdopplungszeit von rund 12 h haben, wurde die Inkubationszeit von 24 h gewählt, was der zweifachen Populationsverdopplungszeit entsprach.

Bei in 6-Well-Platten kultivierten V79-Zellen wurde drei Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt. In Polystyrolröhrchen wurde der Transfektionsansatz vorbereitet. Dazu wurde eine entsprechende Menge Plasmid-DNA mit Wasser auf 60 µl/Well aufgefüllt,

mit 60 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Calciumchlorid-Lösung (0,5 M CaCl_2 in 0,1 M HEPES Puffer, pH 7,0; CellPhect) gemischt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 120 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Phosphat-Puffer (0,28 M NaCl, 0,75 mM NaH_2PO_4 , 0,75 mM Na_2HPO_4 , in 0,05 M HEPES-Puffer, pH 7,0; CellPhect) vorsichtig dazugetropft, während mit einer 2-ml-Pipette und einer Pipettierhilfe Luft zugeführt wurde, um eine homogene Präzipitation im gesamten Ansatz zu gewährleisten. Anschließend wurde erneut einige Sekunden durch Vortexen gemischt und nochmals für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unter vorsichtigem Schwenken der jeweiligen Kulturschale wurden anschließend 240 μl Transfektionsansatz pro *Well* vorsichtig in das Kulturmedium getropft und dies dann über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit SFM gewaschen. Dann wurden je 0,75 ml Schockpuffer (15 % Glycerol in isotonischem HEPES-Puffer) vorsichtig auf die Zellen gegeben, für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut einmal mit SFM gewaschen. Zuletzt wurde Kulturmedium aufgetragen und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

Bei in 96-*Well*-Platten kultivierten V79-Zellen wurde eine Stunde vor der Transfektion das Medium abgesaugt und durch 200 μl frisches Medium ersetzt. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde der Transfektionsansatz vorbereitet. Dazu wurde eine entsprechende Menge DNA mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 $\mu\text{l}/\text{Well}$ aufgefüllt und mit 5 $\mu\text{l}/\text{Well}$ 1 M CaCl_2 -Lösung durch Resuspendieren und nachfolgendes 10sekündiges Vortexen gemischt. Anschließend wurden 20 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Phosphat-Puffer (50 mM HEPES, 1,26 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl) zugegeben und erneut zehn Sekunden durch Vortexen gemischt. Danach wurden vom Transfektionsansatz 40 $\mu\text{l}/\text{Well}$ vorsichtig in das Kulturmedium getropft, die Platte daraufhin geschwenkt oder leicht geklopft und für 5 - 6 h im Brutschrank inkubiert. Zur Beendigung der Transfektion wurde das DNA-haltige Medium abgesaugt und 50 μl Schockpuffer (15 % Glycerol in isotonischem HEPES-Puffer) je *Well* auf die Zellen gegeben. Dieser wurde für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 100 μl SFM gewaschen. Zuletzt wurden je 0,2 ml Kultur- oder Behandlungsmedium aufgetragen und die Zellen unter Standardwachstumsbedingungen inkubiert.

2.4.3.2 Zellyse

Die Lyse der Zellen im Verlauf eines Reporter-gen-Assays war notwendig, um das Reporterenzym freizusetzen, so dass dessen Aktivität bestimmt werden konnte. Zum Einsatz kam der *Passive Lysis Buffer* (PLB) der Firma Promega. Dieser Lysepuffer wurde für Lucife-

rase-Reporter-Gen-Assays dahingehend optimiert, dass eine hohe Aktivität und Stabilität von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase gewährleistet war sowie die Lumineszenzmessung möglichst wenig gestört wurde (z. B. keine Erhöhung der Autolumineszenz von Coelenteramid).

Bei in 6-Well-Platten kultivierten V79-Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Kulturplatte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von je 150 µl 1X PLB wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes mittels Zellschaber abgelöst, mit einer Pipette resuspendiert und das Lysat in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden für 45 s bei maximaler Geschwindigkeit (= 16000 x g) herunter zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl für die Reporterenzym-Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

Bei in 96-Well-Platten kultivierten V79-Zellen wurde das Medium verworfen und der Zellrasen zweimal mit 100 µl (bei vorangegangener Testsubstanzbehandlung mit 250 µl) PBS gewaschen. Die Kulturplatte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden 50 µl PLB pro Well auf die angetauten Zellen gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (450 rpm) sowie weitere 45 min auf Eis inkubiert. Von dem entstandenen Lysat wurden 20 µl für die Reporterenzym-Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

2.4.3.3 Bestimmung von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität

Die Aktivität der Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase wurde anhand der Umsetzung nicht lumineszierender Substanzen in lumineszierende Produkte bestimmt. Da beide Enzyme aus unterschiedlichen Organismen stammen, unterschiedliche Enzymstrukturen besitzen sowie eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen, ist es möglich, die biolumineszierende Reaktion selektiv zu unterscheiden (Abb. 2.1).

Die *Firefly*-Luciferase (EC 1.13.12.7) hat eine Molekülmasse von 61 kDa, ist monomer und ohne posttranslationale Modifikation aktiv. Sie katalysiert die Oxidation von *beetle*-Luciferin unter Verwendung von ATP, Mg²⁺ und O₂, wobei Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert wird. Die Emission erfolgt als Lichtblitz innerhalb einer Sekunde, der schnell stark an Intensität verliert. Die Verwendung von Coenzym A verändert die Kinetik der Reaktion und resultiert in einer intensiveren und andauernden Lichtemission. Die *Renilla*-Luciferase (EC 1.13.12.5) hat eine Molekülmasse von 35 kDa, ist ebenfalls monomer und ohne posttranslationale Prozessierung aktiv. Sie oxidiert Coelenteraten-Luciferin (Coelenterazin) unter Verbrauch von O₂, wobei Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird.

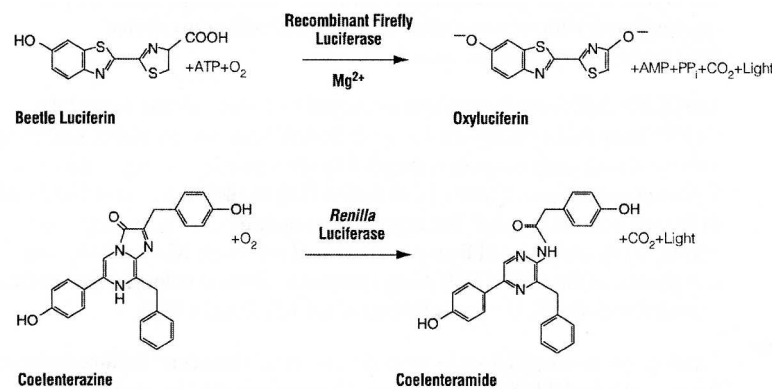


Abbildung 2.1: Firefly- und Renilla-Luciferase-katalysierte Biolumineszenz-Reaktionen. Die *Firefly*-Luciferase (*Photinus pyralis*) oxidiert beetle-Luciferin zum lumineszierenden Oxyluciferin in Gegenwart von ATP, O₂ und Mg²⁺-Ionen. Die in den pGL3-Vektoren kodierte rekombinante *Firefly*-Luciferase katalysiert diese Reaktion unter Verwendung von Coenzym A, wodurch das detektierte Lumineszenzsignal stabilisiert und intensiviert wird. Die *Renilla*-Luciferase (*Renilla reniformis*) oxidiert Coelenterazin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff in das lumineszierende Coelenteramid.

Zunächst galt es herauszufinden, was der ideale Zeitpunkt für die Aktivitätsbestimmung ist, da bei transienter Transfektion die DNA wieder verloren geht. Zudem musste geklärt werden, ob die Lyse der Zellen erfolgreich war und somit die Enzyme für die Aktivitätsbestimmung zugänglich wurden. Ferner musste festgelegt werden, welche DNA-Menge transfiziert und in welchem Verhältnis *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Vektor kotransfiziert werden mussten, um adäquate Signale zu erhalten. Zudem galt es zu überprüfen, ob sich pGL3- und pGL4-Vektor bei Kotransfektion gegenseitig stören. Ferner wurde abgeklärt, wie stabil die Lumineszenzsignale waren und welcher Messzeitraum ideal war.

Dazu wurden *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität 24, 48 und 72 h nach der Transfektion bestimmt sowie verschiedene Messeinstellungen überprüft. V79-Zellen wurden mit dem pGL3-Kontrollvektor (*Firefly*-Luciferase) sowie dem pGL4-TK (*Renilla*-Luciferase) einzeln wie auch in Kombination transfiziert. Bei beiden Vektoren stand das Reportergen unter der Kontrolle eines starken Promotors, SV40- respektive HSV-TK-Promotor, so dass eine starke Expression in den Zellen erwartet werden konnte. Als Kontrolle zur Überprüfung der Transfektion fungierte pEYFP-N1.

Die Reporterenzym-Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels *Dual-Luciferase*[®] Reporter Assay System (Promega) entsprechend der Herstelleranweisung. Dieses lieferte mit dem *Luciferase Assay Reagent II* (LARII) die entsprechende Substrate, Kofaktoren und Bedingungen für die *Firefly*-Luciferase-Reaktion. Die anschließende Zugabe des *Stop & Glo Reagents* (S&GR) resultierte in einer Unterdrückung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität und stellte gleich-

zeitig alle Bedingungen für die *Renilla*-Luciferase-Reaktion zur Verfügung. Somit konnten beide Reporterenzyme sukzessive in der gleichen Probe gemessen werden.

Kultivierung und Transfektion auf 6-Well-Platten

V79-Zellen wurden auf 6-Well-Platten eingesät (50000 Zellen/Well) und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Dann wurden pro Platte je ein *Well* mit 1,5 µg pEYFP-N1, mit 1,5 oder 5 µg pGL3-Kontrollvektor, mit 0,5 oder 5 µg pGL4-TK sowie mit 5 µg pGL3-Kontrollvektor und 0,5 µg pGL4-TK transfiziert (s. Kap. 2.4.3.1 und Abb. 2.2 A). 24, 48 und 72 h nach Beendigung der Transfektion wurden von je einer Platte die Reporterenzym-Aktivitäten bestimmt. Zunächst wurde anhand des *Wells*, welches mit pEYFP-N1 transfiziert wurde, das Gelingen der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop (Ex.: 460 – 500 nm, Em.: 510 – 560 nm) überprüft. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert (s. Kap. 2.4.3.2).

Für die Reporterenzym-Aktivitätsbestimmung wurden von jedem Lysat je zweimal 20 µl auf eine schwarze 96-Well-Platte übertragen, wodurch eine Aussage über die Homogenität bzw. Genauigkeit der Messung getroffen werden konnte. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) entsprechend der Herstelleranweisung. Bei jeder Messung wurden mittels Plattenluminometer 101 Einzelmessungen über 10 s aufgenommen.

Kultivierung und Transfektion auf 96-Well-Platten

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit des Ergebnisses des vorherigen Versuchs, wurde dieses Experiment in modifizierter Form mit Zellen im 96-Well-Format wiederholt. Dazu wurden V79-Zellen auf drei 96-Well-Platten eingesät (4000 Zellen/Well) und bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert. Dann wurden pro Platte je zwei *Wells* mit 400 ng pEYFP-N1, mit 400 oder 1000 ng pGL3-Kontrollvektor sowie mit 400 oder 1000 ng pGL4-TK transient transfiziert (s. Kap. 2.4.3.1 und Abb. 2.2 B). 24, 48 und 72 h nach Beendigung der Transfektion wurde je eine Platte vermessen. Zunächst wurde anhand der *Wells*, welche mit pEYFP-N1 transfiziert wurden, das Gelingen der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop überprüft (Ex.: 460 – 500 nm, Em.: 510 – 560 nm) und die Zellen dann entsprechend Kapitel 2.4.3.2 lysiert.

Für die Reporterenzym-Aktivitätsbestimmung wurden von jedem Lysat 20 µl auf eine schwarze 96-Well-Platte übertragen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) entsprechend der Herstelleranweisung. Bei

jeder Messung wurden vom Plattenluminometer 101 Einzelmessungen über 10 s aufgenommen.

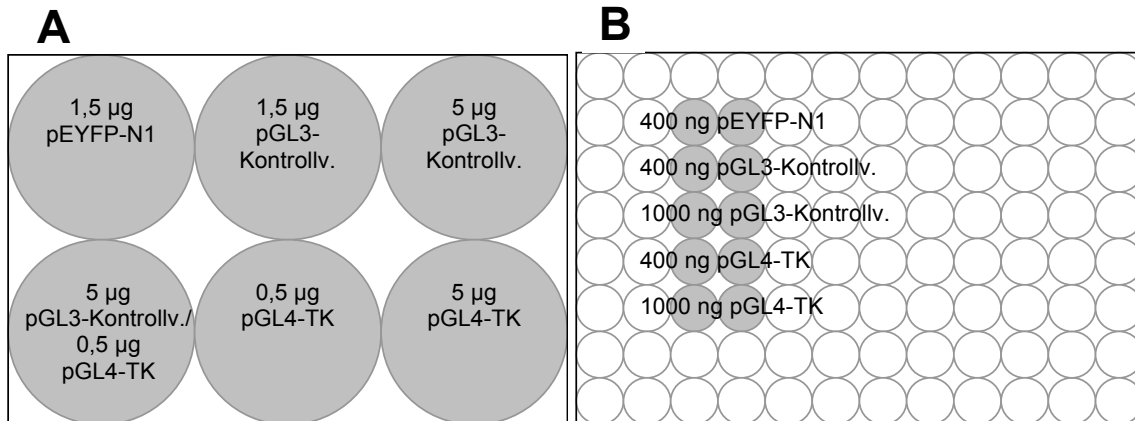


Abbildung 2.2: Transfektionsschema für die Optimierung der Aktivitätsbestimmung von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität. V79-Zellen wurden auf je drei (A) 6-Well-Platten eingesät (50000 Zellen/Well) oder (B) 96-Well-Platten (4000 Zellen/Well) und bis zu einer Konfluenz von 60 - 70 % kultiviert. Dann wurden einzelne Wells entsprechend dem Schema mit dem pGL3-Kontrollvektor und/oder dem pGL4-TK transfiziert (grau hinterlegt). 24, 48 und 72 h nach Beendigung der Transfektion wurde je eine Platte geerntet und lysiert. Die Bestimmung der Aktivität von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase erfolgte mittels *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) entsprechend der Herstelleranweisung.

Für die Entwicklung des Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay bedeuteten die Ergebnisse aus diesem Versuchsteil zum einen, dass die Umsetzung des DLR-Assay im 96-Well-Format möglich war, womit einem möglichst hohen Substanzdurchsatz gerecht wurde. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde auf 1000 ng pGL3-Vektor und 100 ng pGL4-TK festgelegt. Damit ergab sich eine pGL3/pGL4-Verhältnis von 10:1, wodurch die detektierten Lumineszenzsignale aus *Firefly*- und *Renilla*-Aktivität in etwa der gleichen Größenordnung liegen würden. Zudem wurde aufgrund der Tatsache, dass das Expressionsmaximum der Reporter gene 24 h nach der Transfektion lag, entschieden, die Stimulation mit Testsubstanzen direkt an die Transfektion anzuschließen.

2.4.3.4 Endogene Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor

Nach Festlegung der Versuchsbedingungen für den Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay wurden die endogenen Aktivitäten der Promotoren von Ratten-Katalase (CAT), humaner, zytosolischer Glutathion-Peroxidase (GPX1) sowie humaner Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) getestet. Dies ermöglichte einerseits die Kontrolle der gewählten Versuchsbedingungen für Transfektion, Zellyse und Lumineszenzmessung. Zudem diente es der Einordnung der Stärke von SV40-, CAT-, GPX1 und SOD1-Promotor zueinander.

Zur Ermittlung einer maximal tolerierbaren Behandlungskonzentration wurde zunächst ein Resazurin-Test durchgeführt (Glass 1991, Ahmed 1994). Bei *in-vitro*-Zytotoxizitätstests wird die akute toxische Wirkung einer Substanz auf Zellen oder Gewebe untersucht. In dem hier durchgeführten Resazurin-Test wird der zelluläre Redox-Status als Maß für die Anzahl der lebenden Zellen in der Gesamtzellpopulation herangezogen. Hierfür wird das wasserlösliche Resazurin (Alamar Blue[®]) mit den Zellen inkubiert. Es wird angenommen, dass die mitochondrialen Oxidoreduktasen in den lebenden Zellen zur Umwandlung des nicht-fluoreszierenden, blauen Resazurins in das fluoreszierende rote Resorufin führen. Die entstehende Menge an Resorufin ist somit direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen lebenden Zellen. Das entstandene Resorufin kann fluorimetrisch quantifiziert werden. Vermindert sich nach einer Behandlung die Kapazität der Zellen, Resazurin zu reduzieren, zeigt dies eine zytotoxische Wirkung an. Die Ursache für die beobachtete Zytotoxizität (z. B. Apoptose, Nekrose oder Wachstumshemmung) kann anhand des Resazurin-Tests nicht ermittelt werden.

Ausgehend von einer subkonfluent bewachsenen 10-cm-Kulturschale wurden V79-Zellen auf 96-Well-Platten mit einer Dichte von 8000 Zellen/Well eingesät und anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Jede Testsubstanz wurde in 7 Konzentrationen getestet (Tab. 2.6). Die Auswahl der Konzentrationen richtete sich nach in der Literatur verwendeten Größen und sollte die maximal tolerierbare Behandlungskonzentration ermitteln. Die Lösungsmittelkontrolle bestand aus der in der höchsten Testsubstanz-Konzentration eingesetzten Menge des Lösungsmittels. Um sicherzugehen, dass das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) selbst keinen zytotoxischen Effekt zeigten, wurde auch dieses in Konzentrationen von 0,01 bis 10 % (v/v) getestet.

Zur Behandlung der Zellen wurde testsubstanzhaltiges Medium in entsprechenden Mengen und Konzentrationen angesetzt. Dann wurde das Medium abgesaugt, durch testsubstanzhaltiges Medium ersetzt (4 Wells pro Testsubstanzkonzentration) und die Zellen erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert. Ein Behandlungsschema ist exemplarisch in Abbildung 2.4 dargestellt.

Als Positivkontrolle diente die zytotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid (0,5 – 80 mM) über 30 min. Dazu wurde 30 min vor Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit bei bis dahin unbehandelten Zellen das Medium abgesaugt, durch wasserstoffperoxidhaltiges Medium ersetzt und die Zellen für 30 min inkubiert. Anschließend wurde von allen Wells das Behandlungsmedium abgenommen, 200 µl resazurinhaltes Medium (10 % v/v) zugegeben und für weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Das in diesen drei Stunden gebildeten Re-

sorufin konnte zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Messung erfolgte am Plattenfluorometer (Exzitation: 530 nm, Emission: 590 nm), wobei pro *Well* eine Einzelmessung mit einer Integrationszeit von 100 ms durchgeführt wurde. Anhand der Ergebnisse wurde je eine Behandlungskonzentration für den Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay festgelegt.

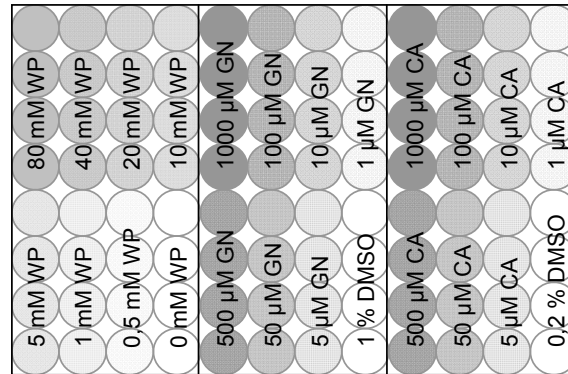


Abbildung 2.4: Beispiel für ein Behandlungsschema beim Resazurin-Test. V79-Zellen wurden auf 96-Well-Platten eingesät. 24 h später wurde das Medium abgesaugt, durch testsubstanzhaltiges Medium ersetzt (4 Wells pro Testsubstanzkonzentration) und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert (GN = Genistein, CA = Catechin). Als Positivkontrolle diente die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ (WP, 0 – 80 mM) über 30 min. Dazu wurde 30 min vor Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit bei bis dahin unbehandelten Zellen das Medium abgesaugt, durch H₂O₂-haltiges Medium ersetzt und die Zellen für 30 min inkubiert. Anschließend wurde von allen Wells das Behandlungsmedium abgenommen, 200 µl resazurinhaltiges Medium (10 % v/v) zugegeben und für weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Das in den drei Stunden gebildeten Resorufin wurde fluorometrisch quantifiziert.

| Substanz | Lösungsmittel- kontrolle | Behandlungskonzentrationen | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|---------|
| TPA | 0,025 % DMSO | 0,001 µM | 0,005 µM | 0,01 µM | 0,05 µM | 0,1 µM | 0,5 µM | 1 µM |
| H ₂ O ₂ | 0 | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Paraquat | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| L-Carnitin | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Genistein | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Catechin | 0,2 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| EGCG | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Trolox | 0,2 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Na-Ascorbat | 0,5 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| Quercetin | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| DMSO | 0 | 0,01 % | 0,05 % | 0,1 % | 0,5 % | 1 % | 5 % | 10 % |

Tabelle 2-6: Übersicht über die im Resazurin-Test getesteten Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen. TPA = 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat, H₂O₂ = Wasserstoffperoxid, EGCG = Epigallocatechin-gallat, DMSO = Dimethylsulfoxid

2.4.5 Beeinflussung der Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor

Nach Festlegung der endgültigen Versuchsparameter für den Reporteragen-Assay und einer geeigneten Behandlungskonzentration mittels Resazurin-Test galt es nun den Einfluss dieser zehn Substanzen auf die Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor zu untersuchen. Ziel war die Identifizierung induzierender Substanzen.

Hierzu wurden drei *Firefly*-Luciferase-Reporteragenkonstrukte mit den entsprechenden Promotoren (pGL3-CAT, pGL3-SOD, pGL3-GPx) sowie pGL3-Basisvektor (kein Promotor) als Negativkontrolle und der pGL3-Kontrollvektor (SV40-Promotor) als Positivkontrolle transient in V79-Zellen transfiziert. Zur Minimierung experimenteller Schwankungen wurde jeweils das *Renilla*-Luciferase-Konstrukt pGL4-TK im Verhältnis 10:1 kotransfiziert.

Zunächst wurde ein Aliquot der kryokonservierten V79-Zellen auf eine 10-cm-Schale aufgetaut. Vierundzwanzig Stunden später erreichte diese Kultur eine Konfluenz von 30 – 40 % und je zwei Fünftel der vollständig resuspendierten Zellen wurden auf zwei 15-cm-Schalen überführt und für weitere 72 h inkubiert bis eine Konfluenz von 70 – 80 % erreicht wurde. Aus den abgelösten und resuspendierten Zellen wurden 96-Well-Platten mit einer Dichte von 8000 Zellen/Well eingesät. Weitere 24 h später wurden drei *Firefly*-Luciferase-Reporteragenkonstrukte mit den entsprechenden Promotoren (pGL3-CAT, pGL3-SOD, pGL3-GPX) sowie pGL3-Basisvektor (kein Promotor) als Negativkontrolle und der pGL3-Kontrollvektor (SV40-Promotor) als Positivkontrolle transient in V79-Zellen transfiziert (s. Kap. 2.4.3.1). Von jedem pGL3-Plasmid wurden je 1000 ng DNA pro Well eingesetzt. Pro Plasmid und Behandlung wurden je 4 Wells transfiziert. Als interner Standard wurden jeweils 100 ng des *Renilla*-Luciferase-Reporteragen-Konstrukts pGL4-TK kotransfiziert. Abbildung 2.5 zeigt ein Beispiel für ein Transfektions- und Behandlungsschema.

Der Transfektionsansatz wurde für 6 h inkubiert und mittels Glycerolschock die Transfektion beendet. Zu den mit pGL3-SOD, -GPX, -CAT oder -Basisvektor transfizierten Zellen wurde testsubstanzhaltiges Medium pipettiert. Mit dem Lösungsmittel wurden daneben auch nicht transfizierte Zellen (NTC, engl. *non-transfected cells*) sowie Zellen, die mit dem pGL3-Kontrollvektor transfiziert waren, behandelt (s. Tab. 2.7). Pro Konstrukt und pro Testsubstanz wurden je vier Wells behandelt.

Das testsubstanzhaltige Medium wurde für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 250 µl PBS gewaschen, entsprechend Kapitel 2.4.3.2 lysiert und je 20 µl des Lysats für die Bestimmung der Reporterenzym-Aktivität abgenommen. Die Bestimmung von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität erfolgte mittels *Dual-Luciferase*[®]

Reporter Assay System (Promega) entsprechend der Herstelleranweisung. Die Messung erfolgte im Plattenluminometer bei automatischer Injektion der Substrate und mit einer Integrationszeit von 1 s.

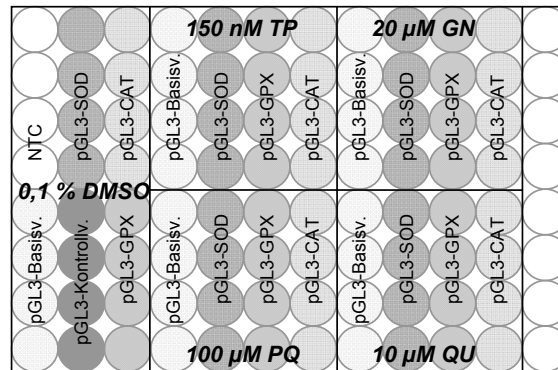


Abbildung 2.5: Beispiel für ein Transfektions- und Behandlungsschema für den Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay. V79-Zellen wurden in 96-Well-Platten eingesät und 24 h später transient mit 1000 ng eines *Firefly*-Luciferase-Reporter-Genkonstrukts (pGL3-CAT, pGL3-GPX, pGL3-SOD, pGL3-Basis-, pGL3-Kontrollv.) sowie 100 ng des *Renilla*-Luciferase-Konstrukts pGL4-TK transfiziert. Je vier Wells pro Platte blieben nicht transfiziert (NTC = *non-transfected cells*). Nach Beendigung der Transfektion wurden die Zellen mit verschiedenen Testsubstanzen (TP = TPA, GN = Genistein, PQ = Paraquat, QU = Quercetin) oder dem Lösungsmittel (DMSO = Dimethylsulfoxid) in Kulturmedium stimuliert.

| Lösungsmittelkontrolle | Testsubstanz |
|------------------------|---|
| 0,1% DMSO | Catechin [50 µM] |
| | Genistein [20 µM] |
| | Paraquat [100 µM] |
| | Quercetin [10 µM] |
| | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat, TPA [150 nM] |
| 1 % DMSO | Trolox [10 µM] |
| | L-Carnitin [1 mM] |
| H ₂ O | Epigallocatechingallat [50 µM] |
| | Natrium-Ascorbat [500 µM] |
| | Wasserstoffperoxid [10 und 50 µM] |

Tabelle 2-7: Übersicht über die verschiedenen Testsubstanzen, ihre Konzentrationen und ihre entsprechende Lösungsmittelkontrolle.

2.5 Statistische Auswertung

Alle nachfolgend aufgeführten statistischen Verfahren erfolgten unter Zuhilfenahme der Software Microsoft EXCEL und des Statistikprogrammes SPSS für Windows V11.

2.5.1 Überprüfung auf Normalverteilung

Die in den Experimenten erhobenen Daten wurden auf Normalverteilung hin überprüft. Dies diente der Entscheidung, welche Kenngrößen für eine deskriptive Statistik berechnet werden sollen und welche analytischen Tests für eine statistische Bewertung geeignet sind. Da in allen Experimenten relativ kleine Fallzahlen zu bewerten waren, eignete sich hier der Kolmogorov-Smirnov-Test. Durch die Berechnung einer Prüfgröße konnte in Abhängigkeit der Fallzahl entschieden werden, ob eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorlag.

2.5.2 Deskriptive Statistik

Zur Beschreibung der Daten wurden entsprechend Lokalisationsparameter (Mittelwert oder Median) und Dispersionsparameter (Standardabweichung oder halber Quartilsabstand) errechnet. Eingesetzt wurden die EXCEL-Funktionen MITTELWERT, STABW, MEDIAN und QUARTILE.

2.5.3 Stichprobenvergleich

Alle Vergleiche von Stichproben erfolgten mittels der Software SPSS für Windows V11. Bei vorliegender Normalverteilung der Stichproben (s. 2.5.1) erfolgte eine Varianzanalyse (Levene-Test), um eine Aussage über die Homo- bzw. Heterogenität der Varianzen zu treffen. Anschließend wurde zum Vergleich zweier Stichproben bei Varianzenhomogenität ein t-Test nach Student durchgeführt, womit auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen geprüft wurde.

Zum Vergleich mehrerer Stichproben erfolgte bei Varianzenhomogenität eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zur Klärung, ob signifikante Unterschiede der Mittelwerte zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden. Bei positiven Ergebnis ($p \leq 0,05$) wurde mit Post-hoc-Tests paarweise getestet, welche Gruppen hinsichtlich ihrer Mittelwerte

signifikante Unterschiede zueinander aufwiesen. Sollten verschiedene Behandlungsgruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden, kam der Dunnett-Test zur Anwendung. Ansonsten erfolgte der Vergleich mittels Scheffé-Test.

Nicht-normalverteilte Stichproben oder Gruppen mit Varianzenheterogenität wurden einem H-Test nach Kruskal und Wallis unterzogen, um hier Gruppenunterschiede aufzuzeigen. Bei Vorliegen von Unterschieden ($p \leq 0,05$) folgte ein U-Test nach Mann und Whitney, um auch hier zu zeigen welche Gruppen sich hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz signifikant voneinander unterschieden.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay zum Nachweis der Induktion von Katalase (CAT), Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) und zytosolischer Glutathion-Peroxidase (GPX1) etabliert. Dazu wurden die humane Kolonadenokarzinomzelllinie CaCo2, die Ileumepithelzelllinie der Ratte IEC-18 sowie die Fibroblastenzelllinie des chinesischen Hamsters V79 hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht. Anhand der Transfektionseffizienz wurde eine geeignete Zelllinie für den DLR-Assay ausgewählt. Nach Einstellung der Versuchsbedingungen wurden zehn Substanzen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen im DLR-Assay getestet. Die zytotoxischen Konzentrationen wurden anhand des Resazurintests ermittelt.

3.1 Wachstumsverhalten von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen

Zur Einschätzung des Wachstumsverhaltens der CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen wurden Wachstumskurven aufgenommen. Mit Hilfe der daraus errechneten Populationsverdopplungszeit ließen sich für nachfolgende Experimente geeignete Zellzahlen für die Zelleinsaat und Inkubationszeiten bestimmen.

Die Zellen wurden auf 3,5-cm-Schalen eingesät. Zweimal täglich wurde auf je drei Schalen pro Zelllinie die Zellzahl bestimmt. Die drei Einzelwerte pro Messzeitpunkt wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Die Teilung der Zellen wurde bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphasen dokumentiert. Die Erstellung der Wachstumskurve wurde für jede Zelllinie einmal wiederholt. Abbildung 3.1 A zeigt exemplarisch das Ergebnis einer der Messungen für jede Zelllinie.

Die Wachstumskurven gliedern sich in die anfängliche *lag*-Phase, in der die Zellen nur langsam proliferieren, die anschließende exponentielle Phase, in der sich die Zellen mit maximaler Geschwindigkeit teilen, sowie die Plateau-Phase, in die die Zellen nach Erreichen der Konfluenz eintreten und nicht mehr proliferieren. Die Dauer der einzelnen Phasen ist zelllinienspezifisch.

Logarithmiert man die Zellzahlen aus der exponentiellen Phase zur Basis 2, wird die Kurve in diesem Bereich linearisiert (Abb. 3.1 B). Aus dem Anstieg (m) der Trendlinie des linearen Bereichs ergibt sich die Populationsverdopplungszeit (t_v) nach folgender Gleichung:

$$t_v = \frac{1}{m}$$

Die Populationsverdopplungszeit wurde für jede Zelllinie in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Einzelergebnisse wurden gemittelt und sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

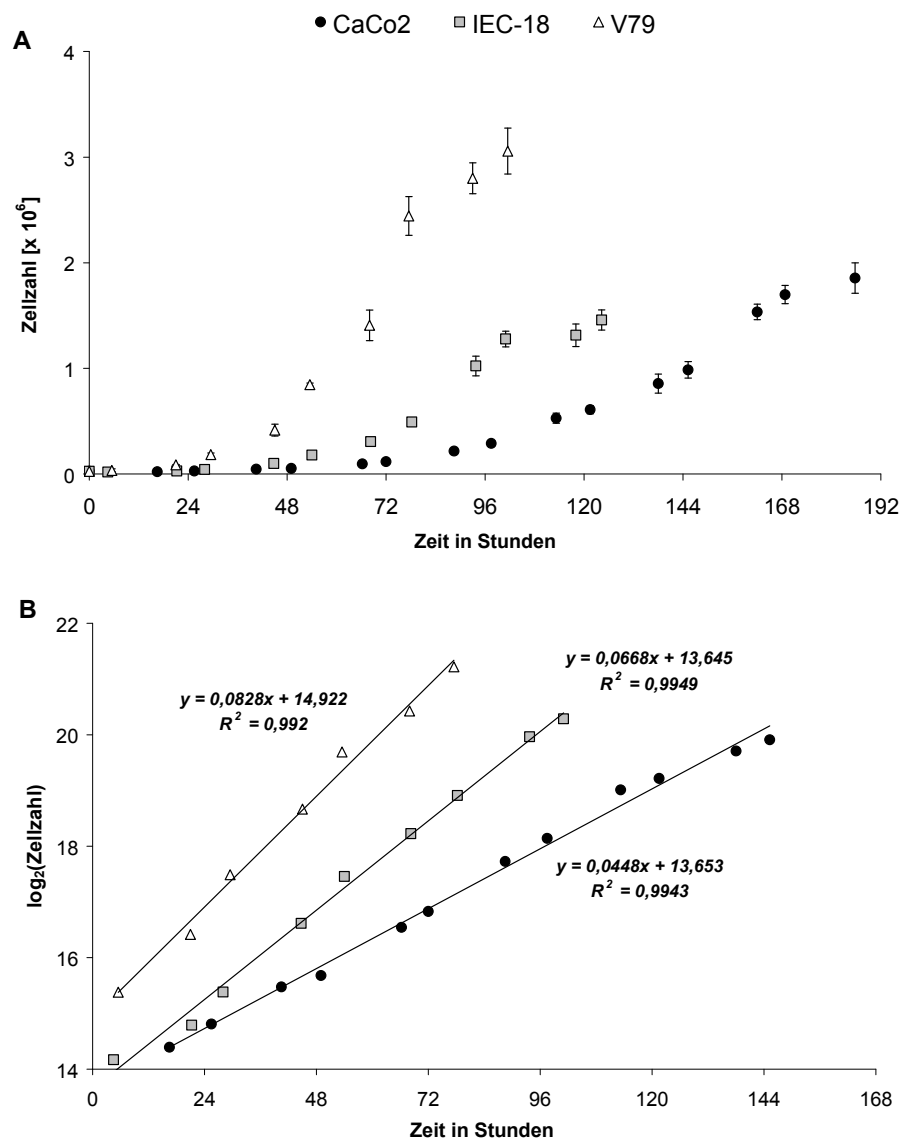


Abbildung 3.1: Wachstumskurve CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen. Die Abbildung stellt das Wachstumsverhalten von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen über mehrere Tage dar. Gezeigt ist jeweils exemplarisch eine von zwei erstellten Wachstumskurven. (A) In einem Punktdiagramm sind der Mittelwert der bestimmten, absoluten Zellzahlen sowie deren Standardabweichung im Zeitverlauf dargestellt. (B) Im Punktdiagramm sind die zur Basis 2 logarithmierten Zellzahlen der exponentiellen Wachstumsphase im Zeitverlauf dargestellt. Für diesen Bereich sind die Trendlinie sowie die zugehörige Funktionsgleichung gezeigt (Geradengleichung: $y = mx + b$; Korrelationskoeffizient: R^2). Das Reziprok des Anstiegs (m) ergab die Populationsverdopplungszeit.

| Zelllinie | t_{v1} [h] | t_{v2} [h] | MW [h] | SD |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------|------|
| CaCo2 | 22,32 | 21,51 | 21,91 | 0,58 |
| IEC-18 | 15,95 | 14,97 | 15,46 | 0,69 |
| V79 | 12,08 | 12,59 | 12,34 | 0,37 |

Tabelle 3-1: Populationsverdopplungszeit von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen. Die Zellen wurden auf 3,5-cm-Schalen eingesät. Zweimal täglich wurde von je drei Schalen die Zellzahl bestimmt und die Einzelmesswerte gemittelt. Die Teilung der Zellen wurde bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphasen dokumentiert. Der Logarithmus der Zellzahl zur Basis 2 wurde gegen die Zeit aufgetragen. Mit dem Reziprok des Anstiegs der Regressionsgeraden wurde die Populationsverdopplungszeit (t_v) berechnet. Angegeben sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) in Stunden (h) aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2 Entwicklung des Dual-Luciferase-Reportergen-Assays

Zur Untersuchung der Promotoraktivierung durch exogene Faktoren mittels Reportergen-Assay werden Plasmide verwendet, in denen die Expression des Reportergens durch den zu untersuchenden Promotor reguliert ist. Nach Transfektion der Plasmide und Expression des Reportergens durch die Wirtszelle wird die Reporterenzymaktivität als Maß für die Promotoraktivierung bestimmt.

Die für den in der vorliegenden Arbeit zu etablierenden Dual-Luciferase-Reportergen-Assay benötigten Plasmide wurden erworben bzw. selbst konstruiert (s. Kap. 2.3.1). Mit Hilfe eines für das *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) kodierenden Vektors wurden die Bedingungen für die transiente Transfektion von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen eingestellt. Aus dem Ergebnis dieses Versuchsteils wurde die Zelllinie V79 für die Transfektion der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Reportergenvektoren ausgewählt. Anschließend erfolgte die Einstellung der Bedingungen für die gewählte Zelllinie zur Bestimmung der Reporterenzymaktivität, wobei u.a. die Kultivierung in unterschiedlichen Plattenformaten sowie die Transfektion unterschiedlicher DNA-Mengen getestet wurden.

3.2.1 Reportergenvektoren

Drei *Firefly*-Luciferase-Reportergenkonstrukte mit den Promotoren der Ratten-CAT (pGL3-CAT), der humanen SOD1 (pGL3-SOD) sowie der humanen GPX1 (pGL3-GPX) wurden von Dr. S. Toyokuni (Kyoto University) zur Verfügung gestellt. Ferner wurden als Negativkontrolle der pGL3-Basisvektor (kein Promotor) ohne Luciferaseaktivität und als Po-

sitivkontrolle der pGL3-Kontrollvektor (SV40-Promotor) mit konstitutiver Luciferaseaktivität eingesetzt. Beide Plasmide wurden vom Hersteller (Promega) bezogen.

Als interner Standard diente die Aktivität der *Renilla*-Luciferase. Die Normalisierung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die der *Renilla*-Luciferase sollte experimentelle Schwankungen berücksichtigen. Bei der Klonierung des pGL4-TK diente der phRL-TK (Promega) als Donor für den HSV-TK-Promotor. Das *Renilla*-Luciferase-Gen lieferte der pGL4.83-Vektor (Promega).

3.2.1.1 Klonierung des Plasmids pGL4-TK

Für die Klonierung des pGL4-TK-Vektors wurden zunächst pGL4.83- und phRL-TK-Vektor einer Doppelfragmentierung durch *Bgl*III und *Hind*III unterzogen. Das Ergebnis der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel zeigt Abbildung 3.2. Die beiden Banden in Bahn 1 stellen die beiden DNA-Fragmente dar, die aus dem Plasmid phRL-TK hervorgegangen sind. Die obere Bande repräsentierte das phRL-Grundgerüst mit einer Größe von 3286 bp, während es sich bei der unteren Bande um die 759 bp große HSV-TK-Promotor-Region handelte. In Bahn 2 wurde der fragmentierte pGL4.83-Vektor aufgetragen. Die Bande bei 4796 bp zeigt das geöffnete pGL4.83-Grundgerüst an. Das zweite Fragment ist nicht vorhanden, da es mit einer Größe von 19 bp das Gel zu schnell passiert hat.

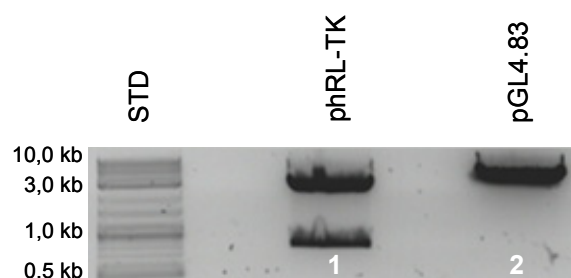


Abbildung 3.2: Gelelektrophoretische Analyse nach Fragmentierung von pGL4.83 und phRL-TK durch *Bgl*III und *Hind*III.

Der HSV-TK-Promotor (Abb. 3.2: Bahn 1, unteres Fragment) und der geschnittene pGL4.83-Vektor (Abb. 3.2: Bahn 2) ausgeschnitten, aus dem Agarose-Gel isoliert und anschließend enzymatisch verknüpft. Nach Transformation von *E. coli* TOP10 und Isolierung der Plasmid-DNA aus sechs Bakterienklonen wurden zwei Kontrollfragmentierungen zur Überprüfung der Identität der isolierten DNA durchgeführt.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel ist in Abbildung 3.3 gezeigt. In den Bahnen 1 bis 6 wurde DNA aus den sechs verschiedenen Bakterienklonen verwendet. Alle verhielten sich gleich. Bei der gleichzeitigen Fragmentierung durch *Bgl*III und *Hind*III (s. Abb. 3.3, links) entstanden zwei Fragmente, die 4796 und 759 bp groß waren. Nach der Fragmentierung mit *Dra*III (s. Abb. 3.3, rechts) waren jeweils drei Banden zu erkennen. Die obere Bande bei 5,5 kb repräsentierte das ungeschnittene Plasmid. Die beiden unteren Banden stellten zwei Fragmente der Größe 3826 sowie 1729 bp dar. Dies entsprach dem Ergebnis, das für pGL4-TK erwartet wurden, da dieser Vektor zwei Schnittstellen für *Dra*III hat. Bei Vorliegen des pHRL-TK wäre der Vektor durch das Enzym linearisiert worden und hätte eine einzige Bande bei 4045 bp ergeben.

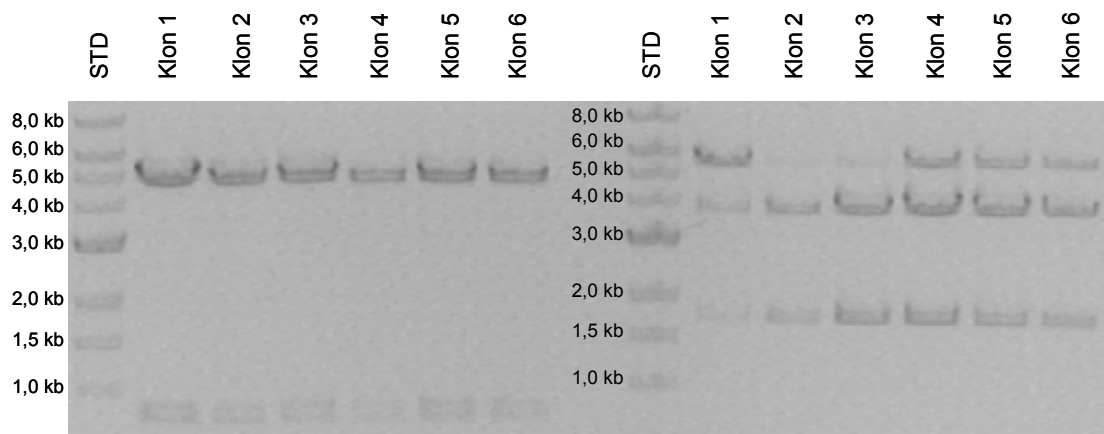


Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Analyse der Fragmentierung von Plasmid-DNA, die aus sechs, mit dem pGL4-TK transformierten Bakterienklonen isoliert wurde.

Die Abbildung zeigt zwei Kontrollfragmentierungen zur Überprüfung der Identität des klonierten pGL4-TK. Untersucht wurde Plasmid-DNA, die aus sechs, mit dem pGL4-TK transformierten Bakterienklonen isoliert wurde. **Links:** Doppelfragmentierung der Plasmid-DNA mit *Bgl*III und *Hind*III. **Rechts:** Fragmentierung der Plasmid-DNA mit *Dra*III

3.2.1.2 Nachweis der in Bakterien vermehrten Plasmide

Zur Überprüfung der Identität isolierter DNA wurden pGL3-Basisvektor, pGL3-Kontrollvektor, pGL3-SOD, pGL3-GPX, pGL3-CAT sowie pGL4-TK einer Fragmentierung mit *Xba*I unterzogen. Somit konnte einerseits die erfolgreiche Transformation der *E. coli* DH5 α mit den pGL3-Vektoren nachgewiesen werden. Zum anderen konnte fehlerhaftes Synthetisieren bei späterer Anzucht transformierter Bakterien aus Stammkulturen und anschließender Isolation der Plasmid-DNA ausgeschlossen werden.

Abbildung 3.4 A zeigt die elektrophoretische Auftrennung der nach Inkubation der Plasmide pGL3-SOD, pGL3-CAT und pGL3-GPX mit *Xba*I entstandenen DNA-Fragmente. In den Bahnen 1 bis 3 wurde die von Dr. Toyokuni (Kyoto University) zur Verfügung gestell-

te und dann fragmentierte DNA aufgetragen („Toyokuni“), in den Bahnen 4 bis 6 die entsprechend aus transformierten Bakterien isolierte DNA („Eigenpräparation“). Durch Vergleich der Position der Banden mit dem Längenstandard konnte eine ungefähre Fragmentgröße abgelesen werden.

In den Bahnen 1 und 4 wurde der fragmentierte pGL3-SOD-Vektor aufgetrennt. Es fanden sich jeweils zwei Banden der Größe 4,0 und 2,0 kb. Die Bahnen 2 und 5 stellten den fragmentierten pGL3-CAT-Vektor dar. Auch hier zeigten sich jeweils zwei Banden, eine bei 5,5 und eine weitere bei 1,9 kb. In den Bahnen 3 und 6 wurde der fragmentierte pGL3-GPX-Vektor aufgetragen. Es war jeweils nur eine Bande auf der Höhe von 6,7 kbp zu erkennen, die den linearisierten Vektor repräsentierte. Da das Ergebnis der Fragmentierung der von Dr. Toyokuni (Kyoto University) zur Verfügung gestellten DNA mit dem der aus transformierten Bakterien isolierten DNA übereinstimmte, konnte die Transformation der Bakterien und die Gewinnung der DNA als gelungen angesehen werden.

Abbildung 3.4 **B** zeigt die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente, die nach Inkubation der Plasmide pGL3-Basisvektor, pGL3-Kontrollvektor und pGL4-TK mit *Xba*I entstanden. In den Bahnen 1 und 2 wurde der fragmentierte pGL3-Kontrollvektor aufgetragen. Es fand sich jeweils eine Bande bei 5,2 kb. Die Bahnen 3 und 4 zeigen den fragmentierten pGL3-Basisvektor, wobei je eine Bande bei 4,8 kb zu erkennen war. Die Bahnen 1 und 3 stellten dabei die Ergebnisse für die von Promega bezogene DNA dar („Promega“), während Proben in den Bahnen 2 und 4 jeweils aus transformierten Bakterien isolierte DNA zu Grunde lag („Eigenpräparation“). In beiden Fällen war das Ergebnis identisch, womit die erfolgreiche Transformation der *E. coli* DH5 α sowie der DNA-Isolierung nachgewiesen wurde.

In den Bahnen 5 und 6 wurde das fragmentierte pGL4-TK-Plasmid aufgetragen. Es war je eine Bande bei 5,5 kb erkennbar. Bei der in Bahn 5 aufgetragenen Probe diente die nach der Klonierung und Retransformation des Vektors gewonnene DNA als Ausgangsgrundlage („Erstpräparation“). In Bahn 6 wurde fragmentierte DNA aufgetragen, die nach Anzucht aus der Bakterienstammkultur zu einem späteren Zeitpunkt gewonnen wurde („Folgepräparation“). Beide Ergebnisse waren identisch, was zeigte, dass die Fragmente der neu isolierten DNA mit denen der alten übereinstimmte.

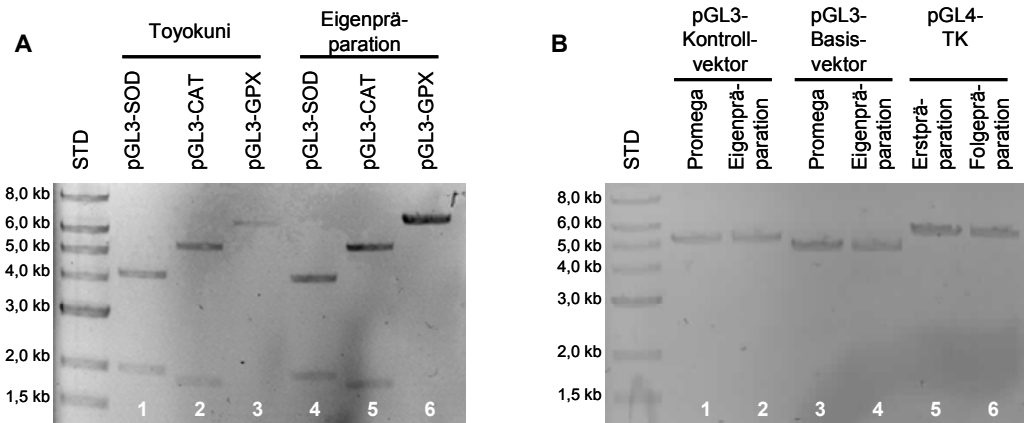


Abbildung 3.4: Gelelektrophoretische Analyse nach Fragmentierung mit *Xba*I zur Kontrolle von aus Bakterien isolierter DNA. Die Abbildung zeigt (A) die Fragmentierung der Plasmide pGL3-SOD, pGL3-CAT und pGL3-GPX mit *Xba*I; verglichen wurden die Ergebnisse von der durch Dr. S. Toyokuni erworbenen DNA („Toyokuni“) mit der in *E.coli* transformierten und isolierten DNA („Eigenpräparation“); sowie (B) die Fragmentierung der Plasmide pGL3-Kontrollvektor, pGL3-Basisvektor und pGL4-TK mit *Xba*I; verglichen wurden die Ergebnisse von der durch Promega bezogenen DNA („Promega“) bzw. direkt nach der Klonierung des pGL4-TK isolierten DNA („Erstpräparation“) mit der zum späteren Zeitpunkt in *E. coli* transformierten und isolierten DNA („Eigen-/Folgepräparation“).

3.2.2 Transiente Transfektion

Für die vorliegende Arbeit sollte anhand der Transfektion von pEYFP-N1 geprüft werden, ob bzw. wie gut CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation transfizierbar sind. In diesem Plasmid ermöglicht die Regulation des EYFP-Gens durch den CMV-Promotor die konstitutive Expression des EYFP in vielen Zelllinien. Das gebildete EYFP kann mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden und gilt als Maß für die erfolgreiche Transfektion. Ziel war die Auswahl einer Zelllinie sowie der optimalen Bedingungen für die transiente Transfektion im Rahmen des Reporteragen-Assays.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation wurden CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen in 6-cm-Schalen eingesät und nach drei verschiedenen Protokollen mit pEYFP-N1 transfiziert, wobei sich Pufferzusammensetzung und Inkubationszeiten bei Präzipitatbildung und Transfektion unterschieden (Protokolle 1A, 1B und 2A, s.a. Tab. 2-5). Die Schalen wurden 24 und 48 h nach Beginn der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop auf EYFP-Fluoreszenz ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Nach Transfektion von pEYFP-N1 in IEC-18-Zellen exprimierten nur sehr wenige Zellen das Gen. Unabhängig vom Protokoll konnten bei konfluenter 6-cm-Schale maximal zehn EYFP-synthetisierende Zellen ausgemacht werden.

Nach Transfektion von pEYFP-N1 in CaCo2- und V79-Zellen bildeten bis zu 20 % der Zellen das gewünschte Protein. Mit den verwendeten Methoden ist es also möglich, DNA erfolgreich in diese Zelllinien einzuschleusen. Es fiel auf, dass bei gleicher Anzahl exprimierender Zellen die Intensität der EYFP-Fluoreszenz in V79-Zellen deutlich stärker war als bei CaCo2-Zellen. Zudem war der prozentuale Anteil der exprimierenden Zellen 24 h nach Beginn der Transfektion höher als nach 48 h, da die Gesamtzellzahl stieg, während die Zahl der transfizierten Zellen stagnierte. Eine Ausnahme bildeten hier die Schalen, die nach Protokoll 1B transfiziert wurden, wo die Effizienz gleich blieb oder sogar noch anstieg.

Im Vergleich der Protokolle untereinander resultierte die Transfektion nach Protokoll 1A bei CaCo2- und V79-Zellen mit jeweils 20 % in der höchsten Transfektionseffizienz.

| | Konfluenz | | Transfektionseffizienz | |
|---------------|-----------|------------|------------------------|--------|
| | + 24 h | + 48 h | + 24 h | + 48 h |
| V79 | | | | |
| Protokoll 1A | 60 - 70 % | 90 - 100 % | 20 % | 5 % |
| Protokoll 1B | 60 % | 90 % | 5 % | 5 % |
| Protokoll 2A | 60 % | 90 - 100 % | 10 % | < 5 % |
| IEC-18 | | | | |
| Protokoll 1A | 80 - 90 % | 100 % | < 1 % | < 1 % |
| Protokoll 1B | 80 - 90 % | 100 % | < 1 % | < 1 % |
| Protokoll 2A | 90 % | 100 % | < 1 % | 0 % |
| CaCo2 | | | | |
| Protokoll 1A | 70 % | 80 - 90 % | 20 % | 10 % |
| Protokoll 1B | 70 % | 80 % | 5 % | 10 % |
| Protokoll 2A | 70 % | 90 % | 5 % | 5 % |

Tabelle 3-2: Übersicht über die Transfektionseffizienz nach Transfektion von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen nach unterschiedlichen Protokollen. CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen wurden in 6-cm-Schalen eingesetzt, bei einer Konfluenz von 30 – 40 % mit pEYFP-N1 nach drei verschiedenen Protokollen transfiziert und 24 sowie 48 h nach Beginn der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der Bildung von EYFP begutachtet. Die Tabelle zeigt sowohl den Grad der Konfluenz als auch die Transfektionseffizienz, d.h. den Anteil an EYFP-exprimierenden Zellen, für beide Messzeitpunkte. Die Prozentangaben sind Schätzwerte.

Ferner wurde die Transfektionseffizienz bei Kultivierung und Transfektion der drei Zelllinien in 96-Well-Platten untersucht (Protokoll 2B, s.a. Tab. 2-5). Auch hier erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop 24 und 48 h nach Beginn der Transfektion. Tabelle 3-3 zeigt einen Überblick über die Transfektionseffizienz.

Auch bis 48 h nach Transfektion von pEYFP-N1 in IEC-18-Zellen synthetisierten nur einige wenige bis gar keine Zellen das gewünschte Protein.

Demgegenüber bildeten nach Transfektion von pEYFP-N1 in CaCo2- und V79-Zellen bis zu 10 bzw. 20 % der Zellen das gewünschte Protein. Es war mit der vorliegenden Methode also möglich, DNA mit ähnlich guter Effizienz in diese Zelllinien einzuschleusen wie zuvor bei Kultivierung und Transfektion der Zellen in 6-cm-Schalen. Auch hier zeigte sich eine verminderte Fluoreszenzintensität des von CaCo2 gebildeten EYFP als bei V79-Zellen sowie eine Abnahme des prozentualen Anteils der EYFP-exprimierenden Zellen aufgrund der Zunahme der Gesamtzellzahl.

| | Konfluenz | | Transfektionseffizienz | |
|---------------|-----------|--------|------------------------|--------|
| | + 24 h | + 48 h | + 24 h | + 48 h |
| V79 | 60 % | 90 % | 20 % | 5 % |
| IEC-18 | 90 % | 100 % | < 1 % | < 1 % |
| CaCo2 | 70 % | 90 % | 10 % | 5 % |

Tabelle 3-3: Übersicht über die Transfektionseffizienz nach Kultivierung und Transfektion von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen in 96-Well-Platten. CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen wurden in 96-Well-Platten eingesät, bei einer Konfluenz von 30 – 40 % mit pEYFP-N1 transfiziert (Protokoll 2B) und 24 sowie 48 h nach Beginn der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der Bildung von EYFP begutachtet. Die Tabelle zeigt sowohl den Grad der Konfluenz als auch die Transfektionseffizienz, d.h. den Anteil an EYFP-exprimierenden Zellen, für beide Messzeitpunkte. Die Prozentangaben sind Schätzwerte.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchsteils wurden Protokolle entwickelt, die in den nachfolgenden Experimenten zur transienten Transfektion von pEYFP-N1 sowie den Reporter-genvektoren angewendet wurden. Für die Transfektion von in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurde Protokoll 1A modifiziert. In 96-Well-Platten kultivierte Zellen wurden nach einer angepassten Form von Protokoll 2B transfiziert.

Zudem wurde im Hinblick auf die Weiterentwicklung des Dual-Luciferase-Reporter-gen-Assays die Fibroblastenlinie V79 ausgewählt. Diese Linie zeigte sich effizient transfizierbar, ist im Gegensatz zur CaCo2-Zelllinie keine Tumorzelllinie und wird als anerkannte Modellzelllinie in vielen toxikologischen Untersuchungen angewendet. Da V79-Zellen eine Populationsverdopplungszeit von rund 12 h haben, wurde der spätere Zeitraum, in dem transient transfizierte Zellen im Rahmen des Reporter-gen-Assays mit der Testsubstanz stimuliert werden sollten, auf 24 h festgelegt, was der zweifachen Populationsverdopplungszeit entsprach.

3.2.3 Lumineszenzmessung

Des Weiteren galt es, allgemeine Parameter für den DLR-Assay festzulegen. So wurde einerseits der Einfluss des Plattenformats (6-Well- vs. 96-Well-Format) auf die Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase untersucht. Zudem wurde überprüft, welche Menge der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Reportergenkonstrukte in V79-Zellen transfiziert werden muss, um adäquate Lumineszenzsignale zu erhalten, und ob die Reporterenzyme nach der Lyse für die Aktivitätsbestimmung überhaupt zugänglich sind. Es galt zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt die Reporterenzyme maximal exprimiert werden, ob sich pGL3-Kontrollvektor und pGL4-TK bei Kotransfektion gegenseitig beeinflussen oder wie stabil die Lumineszenzsignale sind. Dazu wurden V79-Zellen mit dem pGL3-Kontrollvektor (konstitutive Expression der *Firefly*-Luciferase) sowie dem pGL4-TK (konstitutive Expression der *Renilla*-Luciferase) einzeln wie auch in Kombination transient transfiziert. 24, 48 und 72 h nach der Transfektion wurden *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität mittels *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz fungierte das Plasmid pEYFP-N1.

Kultivierung und Transfektion auf 6-Well-Platten

Auf 6-Well-Platten kultivierte V79-Zellen wurden mit pEYFP-N1, pGL3-Kontrollvektor, pGL4-TK oder pGL3-Kontrollvektor und pGL4-TK transient transfiziert. 24, 48 und 72 h nach Beendigung der Transfektion wurden die Reporterenzymaktivitäten bestimmt. Bei jeder Messung wurden mittels Plattenluminometer 101 Einzelmessungen über 10 s aufgenommen. Mit jeder Platte, d.h. Messzeitpunkt, stand jeweils ein *Well* pro Behandlung zur Verfügung. Pro Behandlung wurden jeweils zwei Aliquots des Lysats vermessen und daraus Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet. Aufgrund der niedrigen Fallzahl konnten die beobachteten Unterschiede statistisch nicht gesichert werden.

Wie exemplarisch in Abbildung 3.5 gezeigt, streuten die detektierten Biolumineszenzsignale stark, was auf Geräteungenauigkeiten zurückgeführt wurde. Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität lag über das gesamte Messintervall auf einem konstanten Niveau. Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität hingegen war weniger stabil. Innerhalb der 10 s nahm sie rund 10 % gegenüber dem Ausgangswert ab.

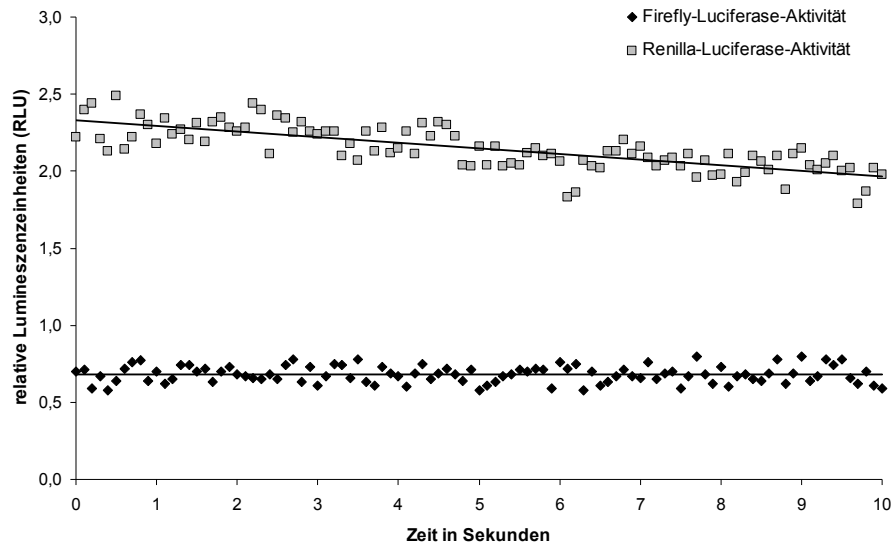


Abbildung 3.5: Zeitliche Änderung der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität. Die Abbildung zeigt die zeitliche Veränderung der Lumineszenzmesswerte für die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität am Beispiel von zwei Proben. In 6-Well-Platten kultivierte V79-Zellen wurden transient mit 5 µg pGL3-Kontrollvektor oder 5 µg pGL4-TK transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und anschließend *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität blieb über 10 s konstant. Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität nahm innerhalb der 10 s um ca. 10 % gegenüber dem Ausgangswert ab.

Die mikroskopische Kontrolle des jeweiligen Wells, das mit pEYFP-N1 transfiziert wurde, zeigte eine Transfektionseffizienz von 10 – 20 %. Dies lag im Rahmen der Ergebnisse der Etablierung der Transfektion (s. Kap. 3.2.2).

Die Expression der Reportergene *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase variierte über drei Tage (Abb. 3.6 A). Zellen, die mit pEYFP-N1 oder dem pGL4-TK allein transfiziert wurden, zeigten bei der Bestimmung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität ein sehr niedriges Signal, was als Gerätehintergrund gewertet wurde. Zellen, die mit dem pGL3-Kontrollvektor transfiziert wurden, wiesen demgegenüber deutlich höhere Messwerte auf. Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität war dabei abhängig von der Menge an transfizierter Plasmid-DNA. Sie war über 48 h stabil und nahm nach 72 h deutlich ab.

Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität war wie zu erwarten nur in mit pGL4-TK transfizierten Zellen nachzuweisen (Abb. 3.6 B). Wiederum wurde beobachtet, dass mit steigender transfizierter DNA-Menge die Reporterenzymaktivität zunahm. Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität nahm zudem bereits nach 48 h stark gegenüber der Messung bei 24 h nach der Transfektion ab.

Die Kotransfektion von pGL3-Kontrollvektor und pGL4-TK schien die Expression des *Firefly*-Luciferase-Gens zu beeinflussen, denn der zeitliche Verlauf der Expression differierte von dem bei ausschließlicher Transfektion des pGL3-Kontrollvektors. So hatte die *Firefly*-Luciferase-Aktivität ihr Maximum bei 24 h nach Transfektion und nahm stetig ab. Die Kot-

ransfektion hatte jedoch keinen Einfluss auf die *Renilla*-Luciferase-Genexpression, denn die kotransfizierten Zellen zeigten die gleiche *Renilla*-Luciferase-Aktivität wie die mit der gleichen Menge an pGL4-TK transfizierten Zellen.

Weiterhin ist festzuhalten, dass die Transfektion von 5 μg pGL4-TK ein rund viermal höheres Lumineszenzsignal bewirkte, als die Transfektion der gleichen Menge des pGL3-Kontrollvektors.

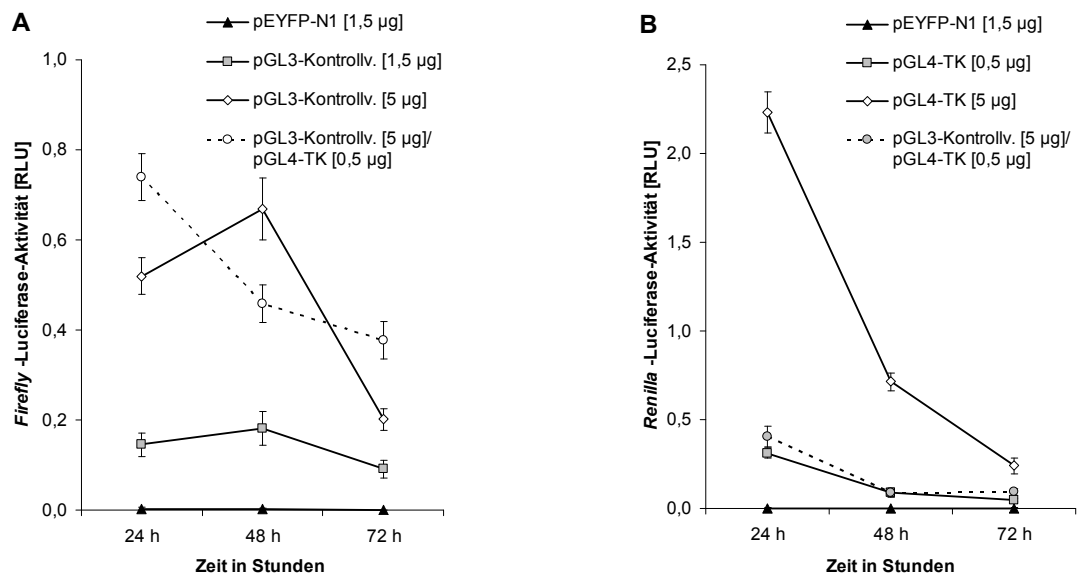


Abbildung 3.6: Zeitliche Änderung der Reporterexpression bei Kultivierung und Transfektion von V79-Zellen in 6-Well-Platten. Die Abbildung zeigt die zeitliche Änderung der Expression der Reportergene *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase. In 6-Well-Platten kultivierte V79-Zellen wurden transient mit 1,5 μg pEYFP-N1, 1,5 bzw. 5 μg pGL3-Kontrollvektor, 0,5 bzw. 5 μg pGL4-TK oder 5 μg pGL3-Kontrollvektor und 0,5 μg pGL4-TK transfiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und anschließend (A) *Firefly*- und (B) *Renilla*-Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Pro Messzeitpunkt stand jeweils ein Well pro Behandlung zur Verfügung. Pro Behandlung wurden jeweils zwei Aliquots des Lysats vermessen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 2$).

Kultivierung und Transfektion auf 96-Well-Platten

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit des Ergebnisses in 6-Well-Platten, wurde dieses Experiment in modifizierter Form mit Zellen im 96-Well-Format wiederholt. Auf 96-Well-Platten kultivierte V79-Zellen wurden mit pEYFP-N1, pGL3-Kontrollvektor oder pGL4-TK transfiziert. Auf die Kotransfektion wurde diesmal verzichtet, da die Ergebnisse aus dem vorherigen Versuchsteil zwar auf eine geringe Beeinflussung aber nicht auf eine gravierende Störung der Reporterexpression hinwiesen. 24, 48 und 72 h nach Beendigung der Transfektion wurden in jeweils einer Platte die Reporterenzym-Aktivitäten bestimmt. Pro Platte, d.h. Messzeitpunkt, standen jeweils zwei Wells pro Behandlung zur Verfügung. Von jedem Well wurde jeweils ein Aliquot Lysat vermessen. Von den

Messwerten beider Wells wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Aufgrund der kleinen Fallzahl ($n = 2$) war eine Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen nicht möglich.

Wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist, ergab sich bei Kultivierung und Transfektion der V79-Zellen im 96-Well-Format ein vergleichbares Ergebnis wie im vorherigen Versuchsteil. So wurde eine Proportionalität zwischen transfizierter DNA-Menge und detektierter Biolumineszenz beobachtet. Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität blieb über 48 h nach Transfektion stabil und nahm nach 72 h stark ab (Abb. 3.7 A). Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität hatte zum Zeitpunkt 24 h ihr Maximum und nahm stetig ab (Abb. 3.7 B). Es fiel auf, dass die absoluten Messwerte um etwa eine Zehnerpotenz niedriger als im vorhergehenden Experiment lagen. Allerdings wurden hier auch geringere DNA-Mengen transfiziert.

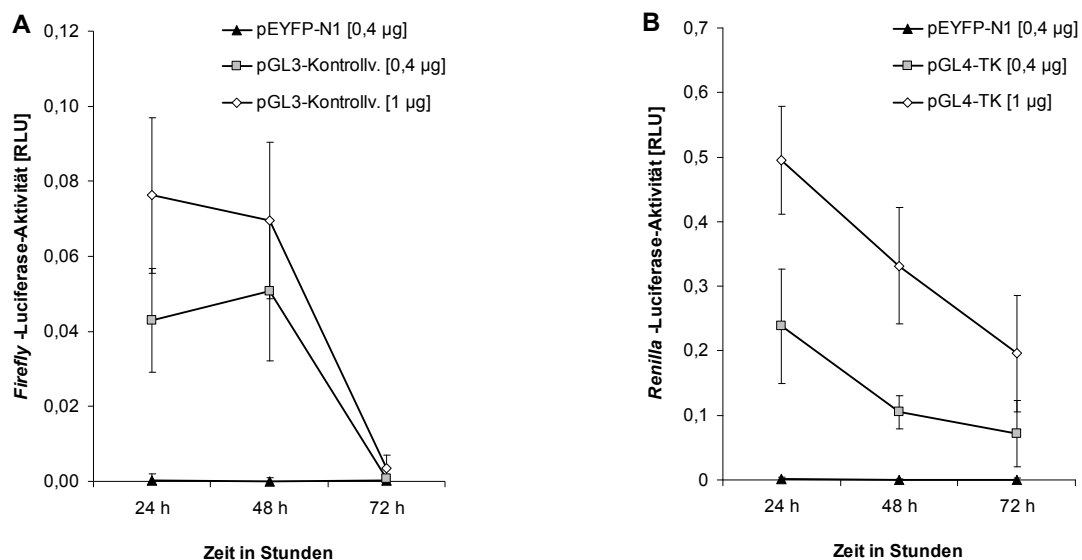


Abbildung 3.7: Zeitliche Änderung der Reporterexpression bei Kultivierung und Transfektion der V79-Zellen in 96-Well-Platten. Die Abbildung zeigt die zeitliche Änderung der Expression der Reportergene *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase. In 96-Well-Platten kultivierte V79-Zellen wurden transient mit 400 ng pEYFP-N1, 400 bzw. 1000 ng pGL3-Kontrollvektor oder 400 bzw. 1000 ng pGL4-TK transfiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen lysiert und anschließend (A) *Firefly*- und (B) *Renilla*-Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Pro Messzeitpunkt standen jeweils zwei Wells pro Behandlung zur Verfügung. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 2$).

Für die Entwicklung des Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay bedeuteten die Ergebnisse aus diesem Versuchsteil zum einen, dass die Umsetzung des DLR-Assay im 96-Well-Format möglich war. Damit wurde man einem möglichst hohen Substanzdurchsatz gerecht. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde auf 1000 ng pGL3-Vektor und 100 ng pGL4-TK festgelegt. Damit ergab sich eine pGL3/pGL4-Verhältnis von 10:1, wodurch die detektierten Lumineszenzsignale aus *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität in etwa der

gleichen Größenordnung lagen. Zudem wurde aufgrund der Tatsache, dass das Expressionsmaximum der Reportergene 24 h nach der Transfektion lag, entschieden, die Stimulation mit den Testsubstanzen direkt an die Transfektion anzuschließen.

3.2.4 Endogene Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor

Nach Festlegung der Versuchsbedingungen für den Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay wurden die endogenen Aktivitäten der Promotoren von Ratten-Katalase (CAT), humaner, zytosolischer Glutathion-Peroxidase (GPX1) sowie humaner Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) getestet. Dies ermöglichte einerseits die Kontrolle der gewählten Versuchsbedingungen für Transfektion, Zellyse und Lumineszenzmessung. Zudem diente es der Einordnung der Stärke von SV40-, CAT-, GPX1 und SOD1-Promotor zueinander.

Dafür wurden V79-Zellen auf einer 96-Well-Platte eingesät und mit fünf verschiedenen *Firefly*-Luciferase-Reportergen-Konstrukten transient transfiziert. Dazu zählten der promotorlose pGL3-Basisvektor, der pGL3-Kontrollvektor (SV40-Promotor) sowie die Plasmide pGL3-CAT (Ratten-CAT-Promotor), pGL3-GPX (humaner GPX1-Promotor) und pGL3-SOD (humaner SOD1-Promotor). Pro Plasmid wurden 4 *Wells* transfiziert. Als interner Standard wurde jeweils das *Renilla*-Luciferase-Reportergen-Konstrukt pGL4-TK kotransfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität bestimmt.

Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität als Maß für die Promotoraktivität wurde durch Division für jede Probe auf die entsprechende *Renilla*-Luciferase-Aktivität normiert. Statistisch signifikante Unterschiede der relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivität zwischen den Gruppen wurden entsprechend Kapitel 2.5 berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

In mit dem pGL3-Basisvektor transfizierten Zellen wurde nur eine geringe *Firefly*-Luciferase-Aktivität nachgewiesen. Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität hingegen entsprach der der anderen Gruppen. Die höchste relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität zeigte sich mit 1,1 in mit dem pGL3-Kontrollvektor transfizierten Zellen, womit der SV40-Promotor der stärkste hier untersuchte Promotor war. SOD1-, GPX1- und CAT-Promotor stellten sich als relativ starke Promotoren dar. Zwar zeigten sie eine höchst signifikant geringere Aktivität als der SV40-Promotor. Mit einer relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivität von 0,5 (SOD1-Promotor) bzw. 0,7 (GPX1-, CAT-Promotor) sind sie dennoch als stark einzuordnen.

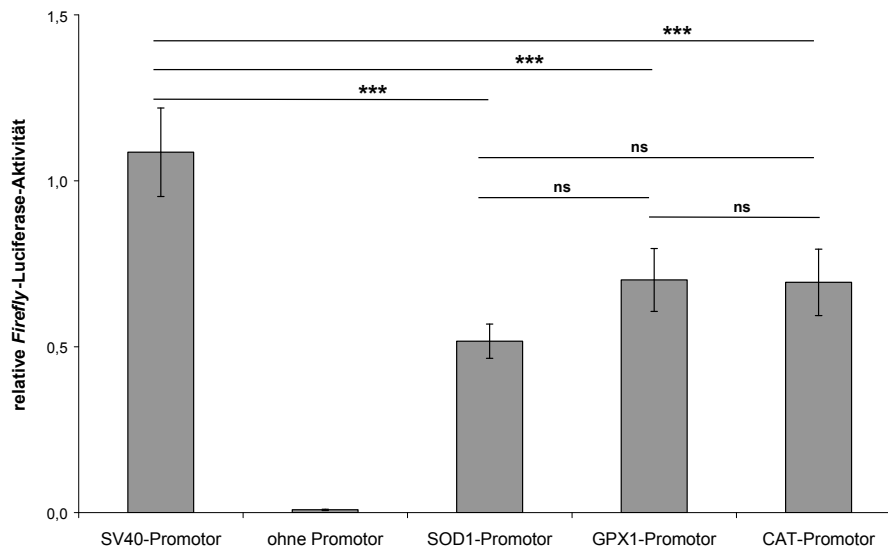


Abbildung 3.8: Endogene Aktivität von SV40-, CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor in V79-Zellen. V79-Zellen wurden mit 1 µg pGL3-Kontroll-, pGL3-Basisvektor, pGL3-CAT, pGL3-GPX oder pGL3-SOD transient transfiziert und für 24 h in Kulturmedium inkubiert. Nach Lyse der Zellen folgte die Bestimmung der relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivität als Maß für die Stärke des regulierenden Promotors. Dargestellt sind MW ± SD; Levene-Test: Varianzhomogenität ($p = 0,124$), ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen ($p = 0,000$), Post-Hoc-Test nach Scheffé: SV40-Prom. vs. SOD1-Prom. $p = 0,000$, vs. GPX1-Prom. $p = 0,001$, vs. CAT-Prom. $p = 0,000$; SOD1-Prom. vs. GPX1-Prom. $p = 0,124$, vs. CAT-Prom. $p = 0,149$; GPX1-Prom. vs. CAT-Prom. $p = 1,000$ [ns = nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$] ($n = 4$).

Entsprechend dem vorherigen Versuchsteil bestätigte sich die Transfizierbarkeit von in 96-Well-Platten kultivierten V79-Zellen mit den Reporter-gen-Konstrukten sowie die Nachweisbarkeit von Reporterenzymaktivitäten nach 24-stündiger Inkubationszeit. Damit galt der DLR-Assay als etabliert und konnte genutzt werden, um die Auswirkung exogener Faktoren auf die Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor zu untersuchen.

3.3 *in-vitro*-Zytotoxizitätstest

Zunächst galt es auszuschließen, dass die Substanzen während der 24-stündigen Inkubation auf mit den Reporter-gen-vektoren transfizierten V79-Zellen eine zytotoxische oder proliferationshemmende Wirkung entfalten. Dazu wurde der Resazurin-Test durchgeführt.

In 96-Well-Platten eingesäte V79-Zellen wurden für 24 h mit Testsubstanzen in je sieben verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Dieser Zeitraum entsprach für V79-Zellen etwa zwei Zellteilungen und war die gewünschte Inkubationszeit für den DLR-Assay. Anschließend wurde resazurinhaltes Kulturmedium zugegeben und die Absorption des gebildeten Resorufins in einer einmaligen Messung fluorometrisch erfasst. Die Überprüfung auf statistische Unterschiede zwischen der Absorption von Kontroll- und Behandlungsgruppe erfolgte entsprechend Kapitel 2.5.

Alle Messwerte wurden durch Division auf den Mittelwert (bei Varianzenhomogenität) oder den Median (bei Varianzenheterogenität) der Kontrollgruppe standardisiert. Ausgewählte Ergebnisse zeigt Abbildung 3.9, eine Gesamtübersicht findet sich in Anhang 2. Ein Absinken der relativen Absorption um mehr als 0,2 wurde als stark zytotoxisch betrachtet. Diese Konzentrationen wurden in nachfolgenden Experimenten nicht mehr verwendet. Eine Reduktion der relativen Absorption um maximal 0,1 hingegen galt als nicht zytotoxisch und der Einsatz der Substanzen in diesen Konzentrationen als unbedenklich. Eine Verringerung des relativen Resazurinumsatzes auf 0,8 bis 0,9 galt als moderat zytotoxisch und wurde im Einzelfall toleriert.

Fast alle Testsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Um einen Einfluss auf den Resazurinumsatz durch DMSO auszuschließen, wurde auch diese Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (Abb. 3.9 **K**). Bis zu einer Konzentration von 1 % (v/v) DMSO war die Kapazität der Zellen, Resazurin zu reduzieren, nicht eingeschränkt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen. Bei 5 % (v/v) DMSO nahm der Resazurinumsatz drastisch ab, woraus folgt, dass DMSO in dieser Konzentration stark zytotoxisch oder proliferationshemmend ist. Bei der Stimulation von V79-Zellen mit Testsubstanzen konnte folglich eine absolute DMSO-Konzentration von maximal 1 % eingesetzt werden.

Nach 24-stündiger Vorinkubation mit Catechin, L-Carnitin sowie 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) kam es zu keiner signifikanten Verminderung des Resazurinumsatzes durch V79-Zellen über den getesteten Konzentrationsbereich (Abb. 3.9 **A**, **B**, **C**). Catechin wirkt in einer Konzentration von 50 μM stark antioxidativ, wie sein Einsatz im Lipidperoxidationsassay zeigt (Schulze Pröbsting 2007). So wurde diese Konzentration für den anschließenden DLR-Assay gewählt. Bei L-Carnitin wurde sich in Hinblick auf den DLR-Assay für die höchste getestete Konzentration (1 mM) entschieden. Vom TPA wurde die Aktivierung des SOD1-Promotors durch 150 nM beschrieben (Minc 1999, Toyokuni 2003). Deshalb kam auch diese Konzentration hier zum Einsatz.

Die Behandlung mit Natrium-Ascorbat bis zu einer Konzentration von 500 μM verringerte die Resorufin-Bildung nicht (Abb. 3.9 **D**). In einer Konzentration von 1 mM nahm sie auf 0,8 ab. Die Einzelmesswerte schwankten jedoch stark, was anhand der relativ großen Standardabweichung zu erkennen war. Der Abfall war statistisch nicht signifikant. Für den nachfolgenden DLR-Assay wurde sich dennoch für eine Konzentration von 500 μM entschieden.

Nach 24-stündiger Vorinkubation mit Epigallocatechingallat (EGCG), Genistein, H₂O₂, Paraquat, Quercetin sowie Trolox kam es in höheren Konzentrationen zu einer Abnahme des Resazurinumsatzes gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Die Substanzen hatten dann zytotoxische oder proliferationshemmende Wirkung. Im DLR-Assay sollten sie in einer möglichst hohen, aber wenig zytotoxischen Konzentration eingesetzt werden.

EGCG wirkte auf V79-Zellen bis zu einer Konzentration von 50 µM nicht zytotoxisch (Abb. 3.9 E). Bei 100 µM EGCG kam es zu einer Reduktion der relativen Absorption auf 0,7, was als stark zytotoxisch galt. Für die Stimulation von V79-Zellen mit EGCG im DLR-Assay wurde folglich eine Konzentration von 50 µM eingesetzt.

Wurden V79-Zellen mit Genistein stimuliert, kam es bis zu einer Konzentration von 5 µM zu keiner signifikanten Änderung des Resazurinumsatzes gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.9 F). Bei 10 µM Genistein kam es zu einem signifikanten Abfall auf 0,9. Damit waren diese Konzentrationen nicht zytotoxisch. Bei 50 µM Genistein sank die relative Absorption des Resorufins auf 0,77, womit diese Konzentration als zytotoxisch galt. Genistein wurde zuvor in *in-vitro*-Untersuchungen zum Nachweis der Regulation von AOE-Aktivitäten eingesetzt. Eine Steigerung der mRNA-Spiegel von GPX1 wurde durch Stimulation von Kulturzellen mit 100 µM Genistein (Suzuki 2002) sowie von CAT- und SOD1-Aktivität bei Behandlung mit 50 und 100 µM Genistein nachgewiesen (Choi 2003). In diesen Konzentrationen wirkte die Substanz im vorliegenden Versuch stark zytotoxisch. Deshalb wurde Genistein im DLR-Assay mit 20 µM eingesetzt.

Nach einer 24-stündigen Präinkubation mit H₂O₂ zeigte sich keine Veränderung des relativen Resazurinumsatzes bis zu einer Konzentration von 10 µM (Abb. 3.9 G). 50 µM H₂O₂ dagegen wirkten moderat, 100 µM H₂O₂ stark zytotoxisch. Eine Induktion der Katalase wurde durch Toyokuni et al. bei einer Konzentration von 10 µM gezeigt (Toyokuni 2003). Da diese Konzentration nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zytotoxisch war, kam sie im DLR-Assay zum Einsatz. Zudem erfolgte die Stimulation mit 50 µM H₂O₂.

Die 24-stündige Inkubation mit Paraquat veränderte die Resorufin-Bildung bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht signifikant (Abb. 3.9 H). Bei 500 µM Paraquat wurde eine stark zytotoxische Wirkung beobachtet. Nach Röhrdanz et al. soll Paraquat bereits ab 100 µM die Expression von CAT und SOD *in vitro* beeinflussen (Röhrdanz 2000), so dass in Übereinstimmung mit dem Resazurin-Test diese Konzentration für den Reporter-Gen-Assay gewählt wurde.

Die Stimulation mit 1 und 5 µM Quercetin beeinflusste das Reduktionsverhalten der V79-Zellen nicht (Abb. 3.9 I). Die Quercetinkonzentration 10 µM zeigte sich moderat zytoto-

xisch. Konzentrationen von 50 μM und mehr waren stark zytotoxisch und somit für nachfolgende Zellkulturexperimente nicht geeignet. Für den DLR-Assay wurde 10 μM Quercetin gewählt.

Die Behandlung mit Trolox zeigte keine Abweichung des Resazurinumsatzes von der Kontrolle bis zu einer Konzentration von 100 μM (Abb. 3.9 J). In höheren Konzentrationen wirkte die Substanz zytotoxisch. Trolox ist ein starkes Antioxidanz und findet (auch in dieser Arbeitsgruppe) bei der Bestimmung antioxidativer Eigenschaften als Referenzsubstanz Anwendung. In der Arbeitsgruppe wird Trolox im ABTS-Assay mit 10 μM verwendet (Schulze Pröbsting 2007), so dass es von Interesse war, ob in dieser Konzentration auch ein Einfluss auf die CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Aktivität zu erkennen war.

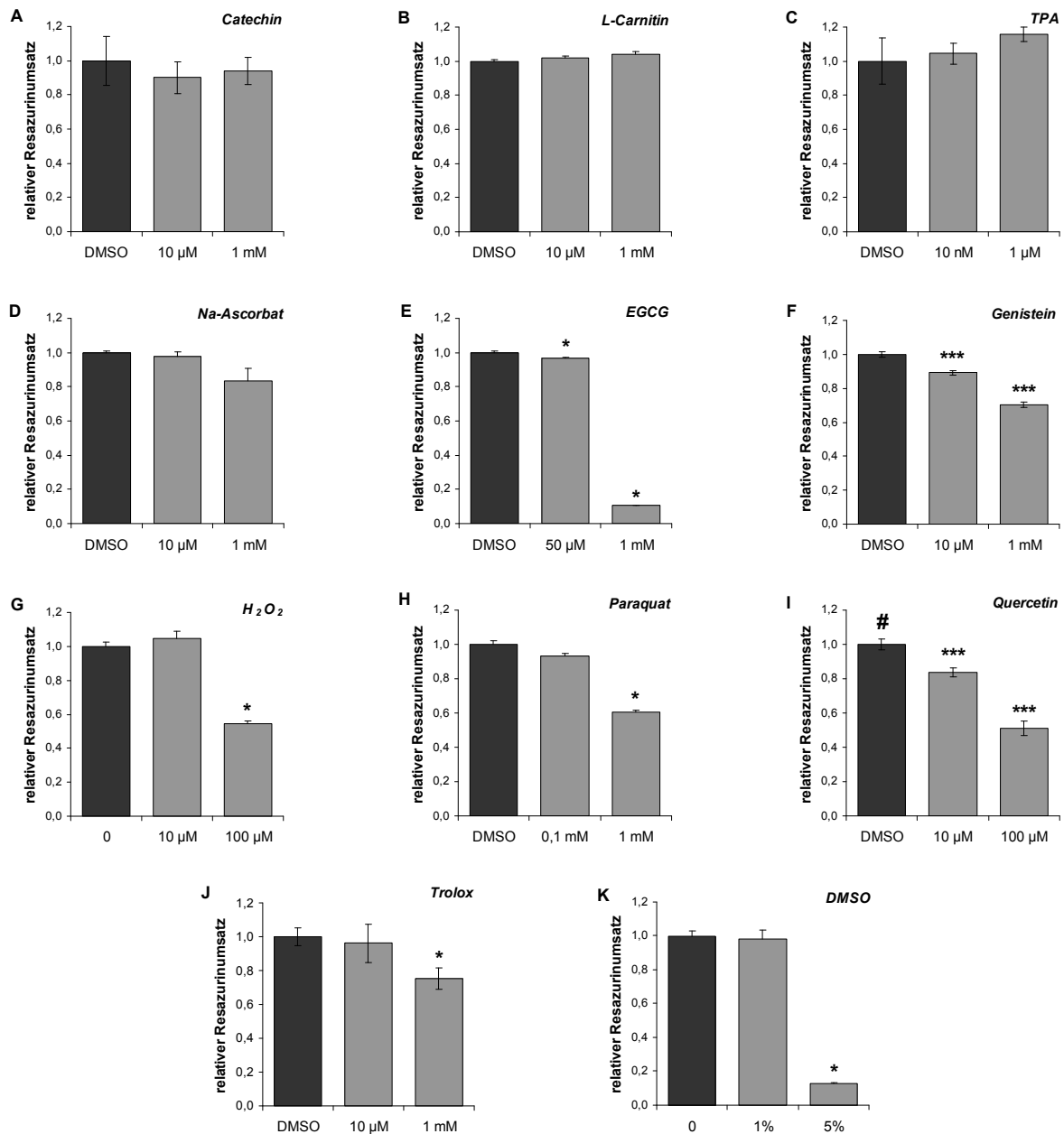


Abbildung 3.9: Resazurinumsatzverhalten von V79-Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation mit verschiedenen Testsubstanzen. In Säulendiagrammen ist der Resazurinumsatz durch V79-Zellen innerhalb von drei Stunden nach 24-stündiger Vorinkubation mit Catechin (A), L-Carnitin (B), 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA, C), Natrium-Ascorbat (D), Epigallocatechingallat (EGCG, E), Genistein (F), Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , G), Paraquat (H), Quercetin (I), Trolox (J) oder dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO, K) gezeigt. Resazurin wird in lebenden Zellen zu Resorufin reduziert. Die entstehende Menge an Resorufin ist somit direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen lebenden Zellen. Dargestellt sind jeweils die Lösungsmittelkontrolle sowie beispielhaft je eine niedrige und eine hohe Behandlungskonzentration.

Catechin (A), L-Carnitin (B), TPA (C) und Natrium-Ascorbat (D) führten zu keinem signifikanten Abfall der Resazurin-Reduktion durch die Zellen über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich. Bei EGCG (E), Genistein (F), H_2O_2 (G), Paraquat (H), Quercetin (I), Trolox (J) und DMSO (K) zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall des Resazurinumsatzes.

Alle Messwerte wurden auf den Mittelwert oder den Median der Kontrollgruppe (H_2O oder DMSO) normiert.

In den Diagrammen A, C, F, I, J sind dargestellt: Mittelwert \pm Standardabweichung; ANOVA, Post-Hoc-Test nach Dunnett, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle ($n = 4$; # $n = 3$).

In den Diagrammen B, D, E, G, H, K sind dargestellt: Median + halber Quartilsabstand; Kruskal-Wallis-Test, Post-Hoc-Test nach Mann und Whitney, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle ($n = 4$).

3.4 Beeinflussung der SOD1-, GPX1- und CAT-Promotor-Aktivität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Einfluss von 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), Paraquat und H₂O₂ auf die Ratten-CAT-, humane GPX1- und humane SOD1-Promotor-Aktivität untersucht, da sie bereits als Induktor für mindestens eines der Enzyme beschrieben worden waren. Zudem wurden mit Genistein, Quercetin, Catechin und Epigallocatechingallat (EGCG) vier antioxidative Nahrungsflavonoide getestet, von denen eine regulierende Wirkung auf die Aktivität dieser Enzyme (z. B. Steigerung der mRNA-Spiegel) berichtet worden war und die deshalb als potentielle Induktoren betrachtet wurden. Ferner wurden mit Trolox, Natrium-Ascorbat und L-Carnitin drei weitere Antioxidanzien geprüft, von denen bisher kein induktiver Effekt auf diese Enzyme nachgewiesen worden war.

Nach Festlegung der Versuchsbedingungen für den Dual-Luciferase-Reporter-Gen-(DLR)-Assay und der Auswahl einer geeigneten Konzentration mittels *in-vitro*-Zytotoxizitätstest wurden diese zehn Substanzen auf ihr Potential zur Induktion von CAT, GPX1 sowie SOD1 getestet. Ziel war die Identifizierung einer positiven sowie einer negativen Referenzsubstanz.

Firefly-Luciferase-Reporter-Genkonstrukte mit CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor wurden transient in V79-Zellen transfiziert. Als interner Standard erfolgte die Kotransfektion des *Renilla*-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukts pGL4-TK. Danach wurden die Zellen für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die gemessene *Firefly*-Luciferase-Aktivität als Maß für die Promotoraktivität wurde für jede Probe durch die entsprechende *Renilla*-Luciferase-Aktivität dividiert. Statistisch signifikante Unterschiede der relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten von Kontroll- und Behandlungsgruppen wurden entsprechend Kapitel 2.5 berechnet.

Jede Substanz wurde in drei (Natrium-Ascorbat und EGCG in zwei) unabhängigen Experimenten getestet. Die Abbildungen 3.10, 3.11 und 3.12 zeigen für jeden Promotor exemplarisch das Ergebnis einer der Messungen. Alle Ergebnisse im Überblick finden sich im Anhang 3. Angegeben ist die relative Promotoraktivität, wobei alle Messwerte durch den Mittelwert (bei Varianzenhomogenität) oder den Median (bei Varianzenheterogenität) der Kontrolle dividiert wurden (s. a. Kap. 2.5).

SOD1-Promotor-Aktivität

Die Aktivität des SOD1-Promotors konnte durch drei der zehn Testsubstanzen gesteigert werden. 20 µM Genistein, 10 µM Quercetin und 100 µM Paraquat führten in mehreren

unabhängigen Experimenten zu einem signifikanten Anstieg der SOD1-Promotor-Aktivität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, welche die basale Promotoraktivität repräsentierte. Dieser Anstieg war bei Genistein in allen drei Experimenten signifikant. Der Faktor schwankte zwischen 1,5 und 3,0. Die Stimulation mit Quercetin wiederum steigerte die relative SOD1-Promotor-Aktivität signifikant auf 2,1 und 3,0. Im dritten Experiment hingegen war keine signifikante Veränderung sichtbar. Die Präinkubation mit Paraquat resultierte ebenfalls in einer signifikanten Erhöhung der relativen SOD1-Promotor-Aktivität auf 2,2 und 2,4. Bei der dritten Testung lag sie bei 1,1, womit kein signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle bestand.

Es fiel auf, dass die SOD1-Promotor-Aktivität bei den drei Substanzen im dritten Versuch deutlich niedriger lag, als in den ersten beiden Versuchen. So ergab sich bei Paraquat und Quercetin keine signifikante Steigerung, was den ersten Versuchen widersprach. Es sei dabei zu beachten, dass die drei Substanzen immer im gleichen Versuch getestet und somit auf die gleiche Lösungsmittelkontrolle bezogen wurden. Die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität der Kontrollgruppe war im dritten Experiment etwa dreimal so hoch wie in den vorhergehenden Experimenten. Die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität der Behandlungsgruppen hingegen war nur anderthalb bis zweifach erhöht, womit die relative SOD1-Promotor-Aktivität deutlich niedriger lag als in den vorherigen Versuchen.

Nach Vorinkubation mit 50 μM Epigallocatechingallat (EGCG) und 1 mM L-Carnitin wiederum wurde eine signifikante Verringerung der SOD1-Promotor-Aktivität beobachtet. L-Carnitin reduzierte die relative SOD1-Promotor-Aktivität signifikant auf 0,8. Bei Wiederholung des Experiments konnte jedoch mit 0,8 und 1,0 keine signifikante Veränderung gezeigt werden. EGCG verminderte die relative SOD1-Promotor-Aktivität hoch signifikant auf 0,7. In einem zweiten Versuch blieb sie unverändert.

Keinen signifikanten Einfluss auf die SOD1-Promotor-Aktivität hatte die Stimulation transient transfizierter V79-Zellen mit 150 nM 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), 10 μM Trolox, 10 μM H₂O₂, 500 μM Natrium-Ascorbat und 50 μM Catechin.

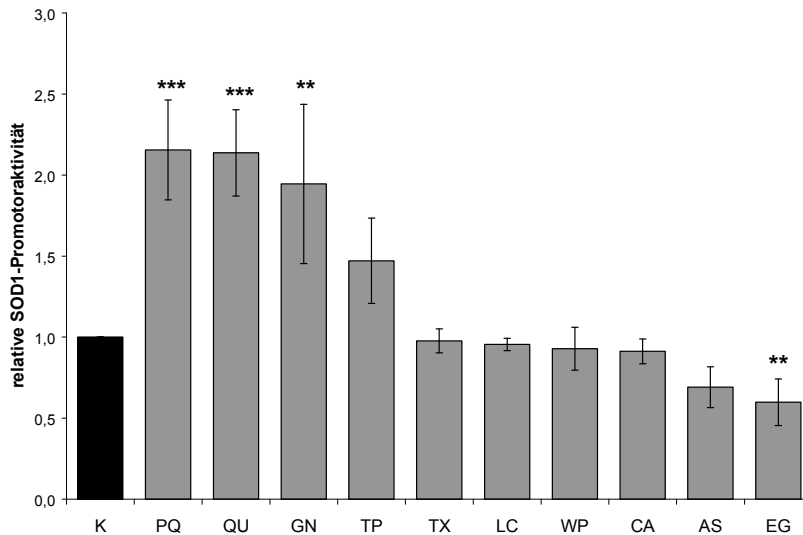


Abbildung 3.10: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität des SOD1-Promotors. Verschiedene Substanzen wurden mittels Reporter-Gen-Assay auf ihren Einfluss auf den SOD1-Promotor getestet. Dazu wurden V79-Zellen mit 1 μg pGL3-SOD transient transfiziert. Nach Beendigung der Transfektion wurden die Zellen mit 100 μM Paraquat (PQ), 10 μM Quercetin (QU), 20 μM Genistein (GN), 150 nM TPA (TP), 10 μM Trolox (TX), 1 mM L-Carnitin (LC), 10 μM H₂O₂ (WP), 50 μM Catechin (CA), 500 μM Natrium-Ascorbat (AS) oder 50 μM EGCG (EG) für 24 h in Kulturmedium stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Messung. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (K, DMSO oder H₂O) normiert. Dargestellt: Mittelwert \pm Standardabweichung; ANOVA, Post-Hoc-Test nach Dunnett, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle (n = 4).

GPX1-Promotor-Aktivität

Auch die Aktivität des GPX1-Promotors in transient transfizierten V79-Zellen konnte durch 20 μM Genistein, 10 μM Quercetin und 100 μM Paraquat in mehreren unabhängigen Experimenten gesteigert werden. Dieser Anstieg war bei Quercetin in den drei Experimenten statistisch signifikant. Der Faktor schwankte zwischen 1,4 und 2,4. Durch die Behandlung mit Genistein stieg die relative GPX1-Promotor-Aktivität höchst signifikant auf 2,4 und 2,5. Im ersten Versuch bestand jedoch mit 1,1 kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Paraquat wiederum resultierte in einer hoch signifikanten Steigerung der relativen GPX1-Promotor-Aktivität auf 1,6 bzw. 1,7. Im ersten Experiment hingegen wurde eine hoch signifikante Reduktion auf 0,7 beobachtet.

Zudem verursachte die Vorinkubation mit 50 μM Epigallocatechingallat (EGCG) eine höchst signifikante Steigerung der GPX1-Promotor-Aktivität auf das 1,4fache. Bei Wiederholung des Experiments hingegen blieb sie mit 1,1 unverändert.

Demgegenüber wurde eine höchst signifikante Reduktion der GPX1-Promotor-Aktivität im ersten Versuch nach Behandlung mit 150 nM TPA beobachtet. Bei den folgenden Experimenten zeigten sich jedoch keine Abweichungen von der Kontrollgruppe.

Durch die Stimulation transient transfizierter V79-Zellen mit 50 μM Catechin kam es mit 0,5 bis 1,2 zu keiner signifikanten Veränderung der GPX1-Promotor-Aktivität. Die Behandlung mit 10 μM Trolox resultierte im ersten Versuch in einer signifikanten Reduktion der Aktivität auf 0,4. Bei zwei folgenden Versuchen wurden jedoch keine Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle verzeichnet. Auch Catechin und Trolox wurden immer zusammen getestet und mit der gleichen Lösungsmittelkontrolle verglichen. Die beobachtete Reduktion der GPX1-Promotor-Aktivität im ersten Versuch, die den Ergebnissen der folgenden Experimente widersprach, beruhte auf einer mehr als zweifach erhöhten relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivität in der Kontrollgruppe, die sich zusätzlich durch eine außergewöhnlich hohe Streuung auszeichnete ($0,751 + 0,202^{\text{a}}$ vs. $0,283 \pm 0,032^{\text{b}}$ und $0,379 \pm 0,025^{\text{b}}$). Die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität der Behandlungsgruppen in diesem Versuch hingegen lag in den Größenordnungen der Folgeversuche (z. B. Trolox: $0,319 + 0,003^{\text{a}}$ vs. $0,318 \pm 0,055^{\text{b}}$ und $0,383 \pm 0,042^{\text{b}}$).

Keinen signifikanten Einfluss auf die relative GPX1-Promotor-Aktivität hatte die Stimulation transient transfizierter V79-Zellen mit 1 mM L-Carnitin, 10 μM H_2O_2 und 500 μM Natrium-Ascorbat.

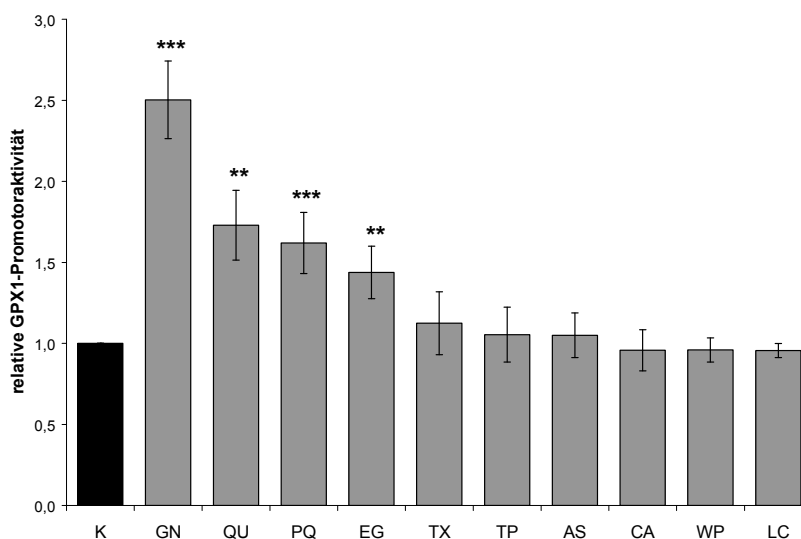


Abbildung 3.11: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität des GPX1-Promotors. Verschiedene Substanzen wurden mittels Reporter-Gen-Assay auf ihren Einfluss auf den GPX1-Promotor getestet. Dazu wurden V79-Zellen mit 1 μg pGL3-GPX transient transfiziert. Nach Beendigung der Transfektion wurden die Zellen mit 20 μM Genistein (GN), 10 μM Quercetin (QU), 100 μM Paraquat (PQ), 50 μM EGCG (EG), 10 μM Trolox (TX), 150 nM TPA (TP), 500 μM Natrium-Ascorbat (AS), 50 μM Catechin (CA), 10 μM H_2O_2 (WP) oder 1 mM L-Carnitin (LC) für 24 h in Kulturmedium stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Messung. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (K, DMSO oder H_2O) normiert. Dargestellt: Mittelwert \pm Standardabweichung; ANOVA, Post-Hoc-Test nach Dunnett, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle ($n = 4$).

^{a)} Median + halber Quartilsabstand

^{b)} Mittelwert \pm Standardabweichung

CAT-Promotor-Aktivität

Im Gegensatz zum SOD1- und GPX1-Promotor war die Aktivität des CAT-Promotors weniger stark von den Testsubstanzen regulierbar. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bewirkte in der Konzentration 50 μM einen hoch signifikanten Anstieg der relativen CAT-Promotor-Aktivität auf 1,5. Dieses Experiment wurde aufgrund der Zytotoxizität jedoch nicht wiederholt. In der Konzentration 10 μM wurden mit 0,9 bis 1,1 keine signifikanten Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle verzeichnet.

20 μM Genistein, 10 μM Quercetin und 100 μM Paraquat, die sowohl SOD1- als auch GPX1-Promotor-Aktivität steigern konnten, zeigten in den ersten beiden Experimenten keine modulierenden Effekte auf die relative CAT-Promotor-Aktivität. Allerdings kam es im dritten Versuch bei diesen Substanzen zu einem signifikanten Anstieg auf 1,8, 1,2 bzw. 1,3.

Eine signifikante Reduktion der relativen CAT-Promotor-Aktivität hingegen wurde einmalig durch die Stimulation mit 150 nM TPA registriert. Die Aktivität sank dabei signifikant auf 0,6. In den folgenden Experimenten wurden mit relativen CAT-Promotor-Aktivitäten von 0,7 und 1,0 keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

Keinen signifikanten Einfluss auf die relative CAT-Promotor-Aktivität hatte die Stimulation mit 50 μM Catechin, 10 μM Trolox, 50 μM EGCG, 500 μM Natrium-Ascorbat sowie 1 mM L-Carnitin.

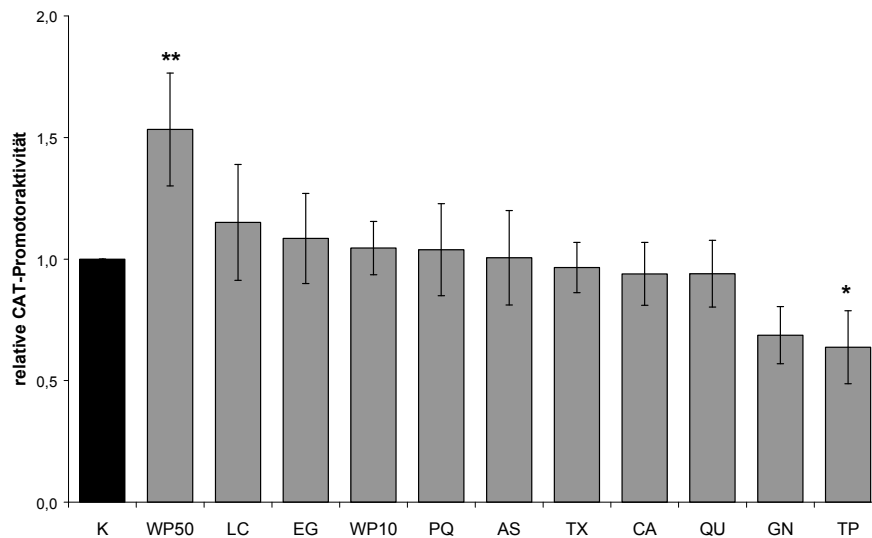


Abbildung 3.12: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität des CAT-Promotors. Verschiedene Substanzen wurden mittels Reporter-Gen-Assay auf ihren Einfluss auf den CAT-Promotor getestet. Dazu wurden V79-Zellen mit 1 µg pGL3-CAT transient transfiziert. Nach Beendigung der Transfektion wurden die Zellen mit 50 µM H₂O₂ (**WP50**), 1 mM L-Carnitin (**LC**), 50 µM EGCG (**EG**), 10 µM H₂O₂ (**WP10**), 100 µM Paraquat (**PQ**), 500 µM Natrium-Ascorbat (**AS**), 10 µM Trolox (**TX**), 50 µM Catechin (**CA**), 10 µM Quercetin (**QU**), 20 µM Genistein (**GN**) oder 150 nM TPA (**TP**) für 24 h in Kulturmedium stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Messung. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle (**K**, DMSO oder H₂O) normiert. Dargestellt: Mittelwert ± Standardabweichung; ANOVA, Post-Hoc-Test nach Dunnett, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 vs. Kontrolle (n = 4).

4 Diskussion

Aufgrund der Rolle von oxidativem Stress in der Entstehung altersassoziierter Erkrankungen (z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neurodegeneration, Atherosklerose) wird seit vielen Jahren zur Behandlung oder Vorbeugung der Einsatz von Antioxidanzien diskutiert. Während dabei in den letzten Jahrzehnten niedermolekulare, radikalfangende oder ROS-reduzierende Substanzen (z. B. Vitamine C und E) im Vordergrund standen, rücken derzeit die antioxidativen Enzyme ins Blickfeld der Forschung. Durch die Überexpression antioxidativer Enzyme in transgenen Zellen oder Organismen gelang es, die Resistenz der Tiere gegenüber oxidativen Stressoren zu erhöhen (White 1991, Orr 1992, Mena 1997, Schriener 2005). Aufbauend darauf beschäftigte sich die vorliegende Arbeit damit, inwiefern die Enzymaktivität durch exogene Faktoren (z. B. Nahrungsbestandteile) gezielt hoch reguliert und somit die antioxidative Kapazität von Zellen gesteigert werden kann. Es wurde ein *in-vitro*-Testsystem in Form eines Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assays entwickelt, das den Nachweis der Induktion von Katalase (CAT), zytosolischer Glutathion-Peroxidase (GPX1) und Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) mit hohem Substanzdurchsatz ermöglicht.

Reportergenvektoren

Die erfolgreiche Klonierung des für den Reportergen-Assay notwendigen pGL4-TK-Plasmids konnte durch zwei Kontrollfragmentierungen (*Bgl*III/*Hind*III, *Dra*III) nachgewiesen werden. Des Weiteren gelang durch DNA-Fragmentierung mit dem Enzym *Xba*I der Nachweis über eine erfolgreiche Transformation von *Escherichia coli* DH5 α und TOP10 mit den Plasmiden pGL3-CAT, pGL3-GPX, pGL3-SOD, pGL3-Basisvektor, pGL3-Kontrollvektor und pGL4-TK sowie der Ausschluss von fehlerhaftem Synthetisieren bei späterer Kultivierung transformierter Bakterien aus Stammkulturen und anschließender Isolation der Plasmid-DNA.

Wachstumsverhalten von CaCo2-, IEC-18- und V79-Zellen

Von drei adhärent wachsenden Säugetierzelllinien wurden Wachstumskurven aufgenommen und die jeweilige Populationsverdopplungszeit ermittelt. Für V79-Zellen, die durch spontane Transformation aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters hervorgegangen sind (Robbins 1967), wurde eine Verdopplungszeit von 12,3 h ermittelt. Bei IEC-18-Zellen handelt es sich um immortalisierte Epithelzellen des Ileums der Ratte (Quaroni 1979). Sie teilten sich einmal in 15,5 h. Die Zelllinie CaCo2 ist aus einem humanen Kolonadenokarzi-

nom hervorgegangen (Fogh 1977). Ihre Populationsverdopplungszeit lag bei 21,9 h. Dieses Charakteristikum ermöglichte die Berechnung von Zellzahlen für nachfolgende Experimente und diente der Festlegung der Behandlungsdauer im Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay.

Transiente Transfektion

Anschließend wurde geprüft, ob bzw. wie gut die drei Zelllinien mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation (Graham 1973) transfizierbar sind. Der Nachweis erfolgte anhand des Plasmids pEYFP-N1 welches für das *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) kodiert. Das Gen wird in diesem Plasmid durch den Zytomegalievirus-(CMV)-Promotor kontrolliert, der eine konstitutive Expression in vielen Zelllinien ermöglicht. Das EYFP wurde 24 und 48 h nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass CaCo2- und V79-Kulturzellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transient transfizierbar sind. Der Anteil an exprimierenden Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz lag bei ihnen in Abhängigkeit des verwendeten Protokolls zwischen 5 und 20 %. Bei der Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation kann eine maximale Effizienz von 50 % erreicht werden (Sambrook 2001). Der Durchschnitt liegt aber bei 10 bis 20 % (Neurath 1997). Die erzielten Ergebnisse für CaCo2- und V79-Zellen liegen damit im Durchschnitt. Es fiel auf, dass bei gleicher Anzahl an exprimierenden Zellen die Intensität der EYFP-Fluoreszenz in V79-Zellen stärker war als bei CaCo2-Zellen. Möglicherweise haben die V79-Zellen mehr DNA aufgenommen oder bei gleicher DNA-Menge eine höhere Expressionsrate aufgewiesen. Eine stärkere Syntheserate des EYFP in V79-Zellen ist entweder auf die geringere Verdopplungszeit und die damit höhere Stoffwechselaktivität dieser Zelllinie oder auf eine stärkere Aktivierung des CMV-Promotors in V79-Zellen zurückzuführen.

Die Beobachtung, dass der prozentuale Anteil der exprimierenden Zellen 24 h nach Beginn der Transfektion höher war als nach 48 h, ergab sich vermutlich aufgrund steigender Gesamtzellzahl und gleichzeitig stagnierender Zahl an transfizierten Zellen. Eine Ausnahme bildeten die Schalen, die nach Protokoll 1B transfiziert wurden, bei denen die Effizienz gleich blieb oder sogar noch anstieg. Aufgrund der langen Inkubationszeit des Transfektionsansatzes ist möglicherweise die Expression des EYFP-Gens gegenüber den anderen Ansätzen verzögert worden. 48 h nach Beginn der Transfektion entsprach die Transfektionseffizienz derjenigen von Protokoll 1A, bei dem die gleichen Puffer bei einer deutlich kürzeren Inkubationszeit verwendet wurden.

Bei IEC-18-Zellen betrug die Transfektionseffizienz weniger als 1 %. Diese Rate ist für den Einsatz im Reporter-Gen-Assay zu gering.

Das Format der Kulturschalen, in denen die Zellen kultiviert und transfiziert wurden, hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Für beide Varianten (6-cm-Schale, 96-Well-Platte) konnte je ein Protokoll ermittelt werden. Sie unterschieden sich in Pufferzusammensetzung und Inkubationszeiten bei der Präzipitatbildung, lieferten aber vergleichbar gute Ergebnisse. Diese wurden für die transiente Transfektion der Reportergenvektoren genutzt.

Zudem diente dieser Versuchsteil der Auswahl einer geeigneten Zelllinie für den Dual-Luciferase-Reportergen-Assay. Da sich die Verwendung einer intestinalen Zelllinie empfiehlt, wenn es um die Beurteilung von Nahrungsbestandteilen geht, wurden die Linien IEC-18 (ileales Epithel) und CaCo2 (Kolonadenokarzinom) untersucht. Die IEC-18 sind nicht transformiert, zeigen aber keine ausgeprägten morphologischen oder funktionellen Charakteristika von ausdifferenzierten Enterozyten (Sambruy 2001). Zudem sind sie nicht humanen Ursprungs, somit ist die Übertragbarkeit auf den Menschen limitiert. Bei der Zelllinie CaCo2 handelt es sich damit um transformiertes Kolonepithel, dennoch gelten die Zellen als stark differenziert, zeigen morphologische und funktionelle Eigenschaften von reifen Enterozyten und werden deshalb häufig als Modell für die intestinale Barriere verwendet (Sambuy 2005). Die Absorption von Nahrungsbestandteilen erfolgt *in vivo* jedoch im Dünndarm, nicht im Kolon, so dass die Relevanz der Ergebnisse beschränkt ist. Die dritte untersuchte Linie V79 ist durch spontane Transformation aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters hervorgegangen (Robbins 1967). Die Zellen sind somit weder humanen noch intestinalen Ursprungs.

IEC-18-Zellen schieden durch die geringe Transfizierbarkeit aus. CaCo2- und V79-Zellen zeigten sich ähnlich effizient transfizierbar. V79 wurde der Vorrang gegeben, da sie im Gegensatz zur CaCo2-Zelllinie keine Tumorzelllinie ist. Zudem wird sie als anerkannte Modellzelllinie häufig und weltweit in toxikologischen Untersuchungen angewendet (OECD 1997).

Mit der Entscheidung für eine Zelllinie, wurde auch der spätere Zeitraum, mit der transient transfizierte Zellen im Rahmen des Reportergen-Assays mit der Testsubstanz stimuliert werden sollten entschieden. Da V79-Zellen eine Populationsverdopplungszeit von rund 12 h haben, wurde die Inkubationszeit von 24 h gewählt, was der zweifachen Populationsverdopplungszeit entsprach. Damit wurde sichergestellt, dass jede Zelle zweimal den gesamten Zellzyklus durchlaufen hatte.

Lumineszenzmessung

Als nächstes wurden V79-Zellen mit dem pGL3-Kontrollvektor (*Firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors) sowie dem pGL4-TK (*Renilla*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des HSV-TK-Promotors) einzeln wie auch in Kombination transient transfiziert. Dies ermöglichte es, den Einfluss des Plattenformats, die Zugänglichkeit der Reporterenzyme nach der Lyse, die Stabilität der generierten Lumineszenzsignale, den Zusammenhang zwischen transfizierter DNA-Menge und Luciferasenaktivität sowie die Kinetik der Expression der Reporterenzyme zu beurteilen. Die Enzymaktivitäten wurden in zwei unabhängigen Experimenten anhand der Umsetzung von Luciferin in Oxyluciferin durch die *Firefly*-Luciferase sowie der Umsetzung von Coelenterazin in Coelenteramid durch die *Renilla*-Luciferase lumineszenzmetrisch bestimmt.

Die Zugabe luciferinhaltigen Substrats (Promega) zu den Zelllysaten resultierte in einer messbaren Biolumineszenz ausschließlich bei pGL3-Kontrollvektor transfizierten Zellen. Nach Zugabe von coelenterazinhaltigem Substrat (Promega) wurde Biolumineszenz nur in mit pGL4-TK transfizierten Zellen detektiert. Damit war nachgewiesen, dass die Vektoren erfolgreich in V79-Zellen transfiziert werden konnten, die entsprechenden Reporterenzyme *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase in den Zellen synthetisiert worden und durch die Lyse für die Aktivitätsbestimmung zugänglich waren.

Die detektierte Biolumineszenz aus der Umsetzung von Luciferin und Coelenterazin verhält sich proportional zur Aktivität von *Firefly*- bzw. *Renilla*-Luciferase (Bronstein 1994). Die Kinetik der Reporterenzymaktivitäten wurde anhand von 101 Einzelmessungen innerhalb von 10 s nach Zugabe der Substrate untersucht. Die Einzelmesswerte streuten stark, was auf eine Geräteungenauigkeit zurückgeführt wurde. Die *Firefly*-Luciferase-Aktivität blieb in allen Proben konstant, wohingegen die *Renilla*-Luciferase-Aktivität leicht linear abnahm. Dies bestätigte die Herstelleranweisungen (Sherf 1996, Promega 2006). Zudem wurde daraus die Notwendigkeit geschlossen, die Substrate automatisch zu injizieren, so dass ein konstanter zeitlicher Abstand zwischen Injektion und Messung gewährleistet war und Schwankungen minimiert werden konnten.

Bereits Graham et al. beschrieben eine Proportionalität zwischen transfizierter DNA-Menge und dem Ausmaß der Plaquebildung bei Transfektion viraler DNA in Säugetierzellen (Graham 1973). Auch im vorliegenden Fall zeigte sich bei Transfektion von pGL3-Kontroll- und pGL4-TK-Vektor in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen eine dosisabhängige Biolumineszenz. Je höher die eingesetzte DNA-Menge, desto höher die Lichtemission. Dieses Phänomen trat sowohl bei Kultivierung und Transfektion von V79-Zellen im 6-Well-Platten

als auch in 96-Well-Platten auf. Aufgrund niedriger Fallzahlen in beiden hierzu durchgeführten Experimenten war dieser Zusammenhang statistisch nicht gesichert.

Zudem wurde wiederholt beobachtet, dass die *Renilla*-Luciferase-Aktivität bei gleicher transfizierter DNA-Menge vielfach höher war als die *Firefly*-Luciferase-Aktivität. Beide Enzyme besitzen die gleiche spezifische Enzymaktivität, d.h. bei gleicher Enzymmenge wird die gleiche Biolumineszenz hervorgerufen (Sherf 1996). Die Expression der *Firefly*-Luciferase wird im pGL3-Kontrollvektor durch den Promotor des simianen Virus (SV) 40 reguliert. Die Expression der *Renilla*-Luciferase des pGL4-TK-Vektors steht unter der Kontrolle des Thyminkinase-(TK)-Promotors des Herpes simplex Virus (HSV). Beide Promotoren sind starke virale Promotoren, die die Genexpression in vielen Zelllinien und Säugetiergeweben aktivieren (Gluzman 1981, Wagner 1985, Stewart 1987). Die Stärke der Promotoraktivierung schwankt jedoch in Abhängigkeit von Gewebe und Zelltyp. Zudem ist der Grad der Aktivierung des SV40-Promotors stark beeinflusst vom Vorhandensein des SV40 Large T Antigen (SV40 Tag) im Genom der Wirtszelle (Gluzman 1981, Promega 2007). Der beobachtete Unterschied in der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität ist vermutlich auf eine stärkere Aktivierung des HSV-TK-Promotors in V79-Zellen im Vergleich zum SV40-Promotor zurückzuführen. Möglicherweise liegen die Beobachtungen aber auch in einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz begründet, so dass trotz gleicher eingesetzter DNA-Menge in den Proben unterschiedlich hohe DNA-Mengen aufgenommen wurden. Zudem ist denkbar, dass aufgrund von Modifikationen des Herstellers pGL4-basierte Reportergene stärker exprimiert werden als pGL3-Vektoren.

Der Verlauf der Expression des Reporterenzym in transient transfizierten Zellen unterliegt verschiedenen Faktoren wie der Transfektionsmethode, der DNA-Stabilität oder spezifischen Eigenschaften des Reportergens hinsichtlich mRNA- und Proteinstabilität (Maxwell 1988, Alam 1990). Der Zeitraum für die maximale Expression ist aufgrund der Instabilität der Fremd-DNA begrenzt. Bei der Stimulation von Zellen mit transkriptionsinduzierenden oder -hemmenden Agenzien nach Überschreiten der maximalen Transkriptionsrate würde der Einfluss der Agenzien unterbewertet bzw. als falsch positiv oder negativ bewertet. Unter Umständen könnte der Promotor gänzlich unempfindlich für die Stimulation erscheinen. Zur Beobachtung maximaler Induktion ist es deshalb erforderlich, die Testsubstanzzugabe unmittelbar an die Transfektion anzuschließen, um die Phase der maximalen Transkriptionsrate einzuschließen (Alam 1990). Zur Beurteilung der Kinetik der Expression von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase in transient transfizierten V79-Zellen wurden die Enzymaktivitäten 24, 48 und 72 h nach der Transfektion in zwei unabhängigen Experimenten luminometrisch bestimmt. So

wurde gezeigt, dass die *Firefly*-Luciferase-Aktivität bis 48 h nach der Transfektion konstant maximal war. Nach 72 h sank sie. Die *Renilla*-Luciferase-Aktivität nahm von 24 bis 72 h ab. Aufgrund der geringen Fallzahl konnten die Ergebnisse statistisch nicht gesichert werden. Die allgemeine Tendenz wurde reproduziert. Als Konsequenz aus diesem Ergebnis wurde die Stimulation mit Testsubstanzen direkt an die Transfektion angeschlossen, so dass die Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme 24 h nach Beendigung der Transfektion erfolgen konnte.

Wie schon bei der Transfektion hatte auch bei der Bestimmung von *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität das Format der Kulturschalen, in denen die V79-Zellen kultiviert und transfiziert wurden, keinen Einfluss auf die Qualität des Ergebnisses. Die absoluten Messwerte lagen bei Verwendung von 96-*Well*-Platten um etwa eine Zehnerpotenz niedriger als bei 6-*Well*-Platten. Dies war nicht verwunderlich aufgrund der geringeren Wachstumsfläche und somit niedrigeren Zellzahlen. Zudem wurden geringe DNA-Mengen transfiziert. Die Umsetzung des Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay im 96-*Well*-Format schien machbar.

Endogene Aktivität von CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor

Nach den so festgelegten Versuchsbedingungen wurden die endogenen Aktivitäten der Promotoren von Ratten-CAT, humaner GPX1 sowie humaner SOD1 bestimmt. Dies ermöglichte einerseits die Kontrolle der gewählten Versuchsbedingungen für Transfektion, Zelllyse und Lumineszenzmessung. Zudem diente es der Einordnung der Stärke von SV40-, CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor zueinander. Der SV40-Promotor gilt als ein sehr starker Promotor, der eine konstitutiv hohe Expression von Genen in eukaryontischen Zellen bewirkt (Gluzman 1981). Erwartungsgemäß zeigte sich hier die höchste relative *Firefly*-Luciferase-Aktivität als Maß für die Promotoraktivität in den mit dem SV40-Promotor-Reporter-Gen-konstrukt (pGL3-Kontrollvektor) transfizierten Zellen. Demgegenüber lagen die Aktivitäten von SOD1-, GPX1- und CAT-Promotor höchst signifikant niedriger. Mit 48 % (SOD1-Promotor) bis 65 % der SV40-Promotor-Aktivität (GPX1-, CAT-Promotor) waren sie dennoch als stark einzuordnen.

Zudem bestätigten sich die Ergebnisse des vorherigen Versuchsteils. Es war mit den vorliegenden Protokollen möglich, V79-Zellen (96-*Well*-Platten) mit den Reporter-Gen-Konstrukten zu transfizieren, und nach 24-stündiger Inkubationszeit die Reporterenzymaktivitäten zu bestimmen. Zwar schwankten die Einzelmesswerte um 10 bis 12 % vom jeweiligen Mittelwert. Geringe Unterschiede zwischen den Mittelwerten wie zwischen SOD1- und GPX1- bzw. CAT-Promotor-Aktivität konnten damit statistisch nicht belegt werden. Dennoch war es möglich starke Unterschiede wie zwischen dem SV40-Promotor und SOD1-, GPX1-

bzw. CAT-Promotor statistisch signifikant nachzuweisen. Damit galt der DLR-Assay als etabliert.

Ermittlung einer Referenzsubstanz zur Steigerung der CAT-, GPXI- und SOD1-Promotor-Aktivität

Anschließend wurden zehn Substanzen mit diesem DLR-Assay auf ihr Potential zur Induktion von CAT, GPX1 und SOD1 getestet. Dabei galt es zu ermitteln, inwiefern eine 24-stündige Stimulation mit testsubstanzhaltigem Medium die Promotoraktivitäten beeinflusste. Ziel war die Identifizierung einer positiven und einer negativen Referenzsubstanz für jeden Promotor, die ihre Wirkung in nicht-zytotoxischen Konzentrationen entfalteten.

Zur Auswahl einer geeigneten Konzentration galt es auszuschließen, dass die Substanzen in der gewählten Konzentration während der 24-stündigen Inkubation eine zytotoxische oder proliferationshemmende Wirkung auf die Zellen entfalteten. Dies wurde im Vorfeld durch den Resazurintest abgeklärt, in dem die Kapazität zur Umsetzung von Resazurin durch V79-Zellen bzw. deren Änderung nach 24-stündiger Präinkubation mit den Testsubstanzen untersucht wurde. Ein Reduktionspotential, das größer oder gleich 0,9 der Kontrolle war, galt als nicht zytotoxisch und der Einsatz der Substanzen in diesen Konzentrationen als unbedenklich. Ein Absinken des Potentials auf unter 0,8 gegenüber der Kontrolle wurde als stark zytotoxisch betrachtet. Diese Konzentrationen wurden im Reporter-gen-Assay nicht verwendet. Eine Verringerung des relativen Resazurinumsatzes auf 0,8 bis 0,9 galt als moderat zytotoxisch und wurde im Einzelfall toleriert.

Im Reporter-gen-Assay getestet wurden Substanzen, die als Induktor für mindestens eines der Enzyme beschrieben worden waren. Dies waren 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), Paraquat und H₂O₂. Zudem wurden die Flavonoide Genistein, Quercetin, Catechin und Epigallocatechingallat (EGCG) geprüft, die modulierende Wirkung auf die Enzymaktivitäten von CAT, GPX oder SOD entfalteten, welche möglicherweise auf eine Promotoraktivierung zurückzuführen war. Als letzte Gruppe kamen mit L-Carnitin, Ascorbat und Trolox Substanzen zum Einsatz, die als Antioxidanzien gelten, von denen es jedoch keine Hinweise auf die Induktion antioxidativer Enzyme gab.

Bekannte Induktoren von CAT, GPXI und SOD1

12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)

Der Phorboldiester 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) ist der potenteste einer Reihe von Tumorpromotoren, die aus Krotonöl isoliert wurden (Hecker 1967). TPA ist in der

Lage, die Expression des SOD1-Gens, das für die humane Cu,Zn-Superoxid-Dismutase kodiert, zu steigern und fand deshalb in Reporteragen-Assays zur Untersuchung der SOD1-Promotor-Aktivierung mehrfach Anwendung als Modell-Agonist. In mit pGL2-SOD1-Promotor-Konstrukten transient transfizierten humanen, epithelialen Zervixcarcinomzellen (HeLa) führte die 16-stündige Inkubation mit 150 nM TPA zur Vervierfachung der SOD1-Promotor-Aktivität (Minc 1999). Bei der gleichen Behandlung (150 nM TPA, 16 h) von mit pGL3-SOD1-Promotor-Konstrukten transient transfizierten Fibroblastenzellen aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (COS-7) wurde eine Verdopplung der SOD1-Promotor-Aktivität beobachtet (Toyokuni 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde TPA zunächst im Resazurin-Test auf Zytotoxizität untersucht. Getestet wurden Konzentrationen von 0,001 bis 1 μ M TPA. Es kam zu keiner Einschränkung des Reduktionsvermögens der Zellen. Einem Einsatz der Substanz im DLR-Assay in jeder der geprüften Konzentrationen stand damit nichts im Wege. Entsprechend den Ergebnissen von Minc et al. und Toyokuni et al. (s. o.) wurde die Konzentration 150 nM für den Reporteragen-Assay ausgewählt.

Im Reporteragen-Assay führte TPA in drei unabhängigen Experimenten zu einem Anstieg der SOD1-Promotor-Aktivität auf das 1,2 – 1,9fache der Kontrolle. Dieser Anstieg war jedoch in keinem der Experimente signifikant. Damit konnte das induktive Potential (Minc 1999, Toyokuni 2003) in diesem Zellsystem nicht gezeigt werden. TPA hatte zudem keinen Einfluss auf die GPX1- und CAT-Promotor-Aktivität.

Paraquat

Das Kontaktherbizid Paraquat (Methylviologen) gehört chemisch zur Klasse der Bipyridyle. Die toxische Wirkung von Paraquat auf Pflanzen- und Tierzellen beruht auf der Bildung von Superoxid-Anionen (Farrington 1973, Krall 1988), welche hochreaktiv sind und zu massiven Zellschädigungen führen. Paraquat ist in der Lage, die Expression des SOD1-Gens zu steigern. Transient transfizierte humane Hepatomzellen (HepG2) wurden für 0 bis 4 h mit 50 μ M Paraquat stimuliert. Mittels Reporterenzym Chloramphenicol-Acetyltransferase wurde anschließend ein Anstieg der Ratten-SOD1-Promotor-Aktivität (maximal 3,5fach nach 1 h) verzeichnet (Yoo 1999B). Ferner wurde ein Anstieg der mRNA-Spiegel von CAT und SOD1 nach 20-stündiger Stimulation mit Paraquat (0,1 – 1 mM) in primären Rattenhepatozyten nachgewiesen werden (Röhrdanz 2000). Die Behandlung von humanen Zahnfleisch-Fibroblasten (Gin-1) mit 0,25 – 2 mM Paraquat über 24 h resultierte in einer Erhöhung der SOD- und CAT-Aktivität und einem Abfall der GPX-Aktivität (Stevens 1988). Diese Ergeb-

nisse ließen neben der nachgewiesenen SOD1-Induktion auch eine Induktion der CAT und eine Repression der GPX vermuten.

Im Reazurin-Test zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials von Paraquat im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bis zu einer Konzentration von 100 μM keine Zytotoxizität festgestellt. In der nächsthöheren Konzentration 500 μM wirkte die Substanz stark zytotoxisch, so dass Übereinstimmung mit den Literaturangaben (50 μM bis 2 mM) die Konzentration 100 μM für den Reporteragen-Assay ausgewählt wurde.

Die Präinkubation von transient transfizierten V79-Zellen mit 100 μM Paraquat resultierte beim DLR-Assay in einer signifikanten Erhöhung der relativen SOD1-Promotor-Aktivität in den ersten zwei Experimenten auf 2,2 und 2,4. Bei der dritten Testung war der Unterschied mit 1,1 nicht signifikant. Zudem führte Paraquat zu einem signifikanten Anstieg der relativen GPX1-Promotor-Aktivität auf 1,6 bzw. 1,7. In einem dritten Experiment kam es zu einer signifikanten Reduktion auf 0,7. Die CAT-Promotor-Aktivität wurde durch die Vorinkubation mit Paraquat nicht beeinflusst.

Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gehört zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Es entsteht als zweites Zwischenprodukt der sukzessiven Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff oder eine direkte Zwei-Elektronen-Übertragung (Younes 2004). H_2O_2 ist kein Radikal und damit relativ stabil. Allerdings besitzt es ein hohes Diffusionspotential und gilt als Quelle für hochreaktive Hydroxylradikale, die nach der Fenton- oder der Haber-Weiß-Reaktion aus H_2O_2 entstehen können. Vom H_2O_2 wurde die Induktion aller drei hier untersuchten Enzyme berichtet. Bei der Stimulation von mit pGL3-Promotor-Konstrukten (Ratten-CAT-, humaner GPX1-Promotor) transient transfizierten COS-7-Zellen mit H_2O_2 (1, 10 und 100 μM) über 24 h wurde eine gesteigerte CAT- und GPX1-Promotor-Aktivität beobachtet (Toyokuni 2003). Transient transfizierte humane Hepatomzellen (HepG2) wurden für 0 bis 4 h mit 200 μM H_2O_2 stimuliert. Mittels Reporterenzym Chloramphenicol-Acetyltransferase wurde anschließend ein Anstieg der Ratten-SOD1-Promotor-Aktivität (maximal 3fach nach 2 h) verzeichnet (Yoo 1999B).

Zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials von Wasserstoffperoxid wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit V79-Zellen mit H_2O_2 Konzentrationen von 1 μM bis 1 mM über 24 h stimuliert. Anschließend wurde das Resazurinumsatzvermögen als Maß für die Zytotoxizität bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 10 μM zeigte sich keine Veränderung des relativen Resazurinumsatzes. In der Konzentration 50 μM wirkte H_2O_2 moderat, ab 100 μM dann

stark zytotoxisch. Die Induktion der Katalase und GPX1 wurde durch Toyokuni bei 1, 10 und 100 μM H_2O_2 gezeigt (Toyokuni 2003). Es wurde die Konzentration 10 μM für den Reporter-Gen-Assay gewählt, da diese nach den Ergebnissen des Resazurintests nicht zytotoxisch war und im Bereich von Toyokuni et al. lag. Alternativ erfolgte zudem die Stimulation mit 50 μM H_2O_2 . Von einer Induktion der SOD1 wurde bei einer Konzentration von 200 μM H_2O_2 berichtet (Yoo 1999b). Diese Konzentration war aber stark zytotoxisch und wurde deshalb nicht eingesetzt.

Im Reporter-Gen-Assay hatte die 24-stündige Stimulation mit 10 μM H_2O_2 keinen Einfluss auf die SOD1-Promotor-Aktivität. Dies widersprach den Ergebnissen von Yoo et al., die eine Induktion der Ratten-SOD1 durch nachwies (Yoo 1999B). Nach der Behandlung von V79-Zellen konnte entgegen Toyokuni et al. im Reporter-Gen-Assay ebenfalls keine regulierende Wirkung von 10 μM H_2O_2 auf die GPX1-Promotor-Aktivität verzeichnet werden (Toyokuni 2003). Die CAT-Promotor-Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht durch 10 μM H_2O_2 verändert werden. Toyokuni et al. berichteten jedoch von einem signifikanten Anstieg der CAT-Promotor-Aktivität bereits bei 1 μM H_2O_2 (Toyokuni 2003). Als Gegenprobe wurden H_2O_2 dann auch in der moderat zytotoxischen Konzentration von 50 μM getestet, was in einem signifikanten Anstieg der CAT-Promotor-Aktivität auf das 1,5fache resultierte. Dieses Experiment wurde nicht wiederholt, so dass das Ergebnis nicht bestätigt werden konnte. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass 10 μM H_2O_2 bei den vorliegenden Versuchsbedingungen zu niedrig gewählt waren. Möglicherweise spielte aber auch die Promotorlänge eine Rolle, denn das Promotorfragment, mit dem in dieser Arbeit experimentiert wurde, war rund 750 bp kürzer als in den Versuchen von Toyokuni et al. In dem fehlenden Bereich potentiell liegende Regulationssequenzen sind damit weggefallen, was eine geringere Sensitivität erklären könnte.

Flavonoide als potentielle Induktoren von CAT, GPX1 und SOD1

Nachfolgend wurden die vier Flavonoide Genistein, Quercetin, Catechin und Epigallocatechingallat (EGCG) auf ihr Induktionspotential getestet. Flavonoide sind phenolische Substanzen, die in hohen Konzentrationen in Obst und Gemüse vorkommen. Ihnen wird eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten nachgesagt, wobei ihre antioxidative Wirkung von besonderem Interesse ist (Bravo 1998, Nakao 1998). Sie vermindern einerseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) durch Hemmung von daran beteiligten Enzymen, können ROS aufgrund ihres niedrigeren thermodynamischen Reduktionspotentials reduzieren oder durch Komplexbildung stabilisieren (Pietta 2000). Daneben wurde von Grünteephenolen

berichtet, dass sie den MAPK-Signalweg aktivieren und somit über das Antioxidanzien Responsive Element (ARE) in der Promotorregion von Phase-II-Enzymen induzierend wirken können (Rushmore 2002). Flavonoide könnten folglich über die nicht-enzymatisch antioxidative Wirkung hinaus wichtige modulierende Effekte auf verschiedene Transkriptionsfaktoren haben, die den intrazellulären Redoxstatus regulieren (Yamamoto 2003). Diese Substanzen wurden zwar bisher nicht als Induktoren der CAT, GPX1 oder SOD1 beschrieben, allerdings wurden modulierende Effekte auf diese Enzyme beobachtet. So sind sie in der Lage, die mRNA-Spiegel oder die Enzymaktivitäten zu steigern. Gesteigerte mRNA-Spiegel sind bspw. auf eine erhöhte mRNA-Stabilität oder auf eine vermehrte Transkription zurückzuführen, was diese Substanzen zu potentiellen Kandidaten für Enzyminduktoren macht.

Genistein

Genistein ist ein Isoflavon aus dem Soja (Walz 1931, Walter 1941). Es gilt als Antioxidanz, da es als Radikalfänger wirkt (Lee 2005, Yen 2002), in Zellen und zellfreien Systemen vor Lipidperoxidation schützt (Wilson 2002, Patel 2001, Kerry 1998), aber auch zur Steigerung der Aktivität von antioxidativen Enzymen befähigt ist (Choi 2003, Suzuki 2002). Über eine Aktivierung von CAT-, GPX1 oder SOD1-Promotor ist jedoch nichts bekannt.

Suzuki et al. zeigten einen Anstieg der GPX1-mRNA-Spiegel mit einhergehender, erhöhter Enzymaktivität in humanen Prostatakrebszelllinien (LNCaP, PC-3) nach 96-stündiger Stimulation mit 100 μM Genistein (Suzuki 2002). Damit schien Genistein ein guter Kandidat für einen GPX1-Induktor zu sein. Die gleiche Behandlung hatte keinen Effekt auf CAT und SOD1 (Suzuki 2002), was mit den Ergebnissen von Kameoka et al. übereinstimmte. Diese Arbeitsgruppe beobachtete ebenfalls keine Veränderung der CAT- und SOD1-mRNA-Spiegel und Enzymaktivitäten in humanen Adenokarzinomzellen (CaCo2) durch 48-stündige Behandlung mit 100 μM Genistein (Kameoka 1999). Allerdings berichteten Choi et al. von einer Erhöhung der CAT- und SOD-Aktivität durch Genistein (50 und 100 μM) in mit Lipopolysacchariden stimulierten murinen Macrophagen der Linie RAW 264.7 (Choi 2003). Eine modulierende Wirkung von Genistein auf CAT- und SOD1-Genexpression schien damit nicht ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit wurden V79-Zellen mit Genistein in unterschiedlichen Konzentrationen über 24 h stimuliert. Anhand des Resazurinumsatzes konnte somit die Zytotoxizität des Flavonoids bestimmt werden. Genistein wirkte in einer Konzentration von 10 μM leicht zytotoxisch und in den Konzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ stark zytotoxisch. Die in der Literatur beschriebenen modulierenden Wirkungen auf SOD, CAT oder GPX (Choi 2003, Suzuki

2002) wurden bei 50 oder 100 μM beobachtet. In diesen Konzentrationen wirkte die Substanz im vorliegenden Versuch stark zytotoxisch. Als Kompromiss wurde entschieden, Genistein bei der Stimulation der V79-Zellen im Rahmen des Reporter-gen-Assays in der Konzentration 20 μM einzusetzen.

Zur Untersuchung des induktiven Potentials wurden mit CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Reporter-genkonstrukten transient transfizierte V79-Zellen mit 20 μM Genistein für 24 h stimuliert. Es kam in drei unabhängigen Experimenten zu einem signifikanten Anstieg der SOD1-Promotor-Aktivität. Der Faktor der Erhöhung schwankte zwischen 1,5 und 3. Es wurde ebenso ein signifikanter Anstieg der relativen GPX1-Promotor-Aktivität auf 2,4 bzw. 2,5 beobachtet. Im ersten Versuch ergab sich keine Abweichung. Die CAT-Promotor-Aktivität wurde durch die Vorbehandlung mit Genistein in einem Versuch signifikant auf das 1,7fache gesteigert. Dies konnte in zwei weiteren Experimenten nicht bestätigt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass Genistein keine modulierende Wirkung auf die CAT-Promotor-Aktivität hatte.

Quercetin

Das Flavonol Quercetin findet sich in vielen Lebensmitteln (Zwiebel, Apfel, Brokkoli, Wein, Tee), so dass der Mensch tagtäglich hohen Konzentrationen ausgesetzt ist (Hertog 1993). Versuche an Ratten zeigten eine Verminderung der Aktivität antioxidativer Enzyme (CAT, GPX) in den Erythrozyten nach zweiwöchiger Verabreichung von 0,1 g/kg Quercetin (Breinholt 1999). Allerdings konnte einer durch UVA-Bestrahlung induzierten Verminderung von CAT-, GPX- und SOD-Aktivität in Erythrozyten und Haut von Ratten durch vorherige Gabe von Quercetin (50 mg/kg) zum Teil vorgebeugt werden (Inal 2001, Kahraman 2002).

In-vitro-Studien, in denen die Enzymaktivitäten oder die Genexpression anhand der mRNA-Spiegel untersucht wurden, führten bislang zu unterschiedlichen Ergebnissen. In der Rattenhepatomzelllinie H4IIE wurde eine Verminderung der GPX- und SOD1-Genexpression nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Quercetin (5 – 100 μM) beobachtet (Röhrdanz 2003). In der humanen Hepatomzelllinie HepG2 kam es nach 4-stündiger Präinkubation der Zellen mit Quercetin in niedrigen Konzentrationen (0,1 und 1 μM) zu einer Erhöhung der GPX- und einer Verminderung der SOD1-Genexpression. In hohen Quercetinkonzentrationen (100 μM) hingegen wurden eine gesteigerte CAT- und SOD1-Genexpression ermittelt (Alía 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials von Quercetin V79-Zellen mit verschiedenen Quercetin-Konzentrationen über 24 h inkubiert und anschließend deren Resazurinumsatz bestimmt. Die Vorbehandlung mit 1 und 5 μM Querce-

tin hatte keinen Einfluss auf die Reduktionskapazität der V79-Zellen. Die Quercetinkonzentration 10 μM zeigte sich moderat zytotoxisch. Konzentrationen von $\geq 50 \mu\text{M}$ waren stark zytotoxisch und somit für nachfolgende Zellkulturexperimente nicht geeignet.

Zur Untersuchung des induktiven Potentials wurden in der vorliegenden Arbeit mit CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Reportergenkonstrukten transient transfizierte V79-Zellen mit 10 μM Quercetin für 24 h stimuliert. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg der SOD1-Promotor-Aktivität auf 2,1 bzw. 3,0. In einem dritten Experiment kam es zu keiner Beeinflussung der Aktivität. Die GPX1-Promotor-Aktivität wurde durch Präinkubation mit Quercetin in drei unabhängigen Experimenten signifikant gesteigert. Der Faktor lag zwischen Faktor 1,4 und 2,1. Die Ergebnisse bzgl. der CAT-Promotor-Aktivität wichen in den drei Versuchen stark voneinander ab. Die relative CAT-Promotor-Aktivität war in den ersten zwei Experimenten mit 0,9 bzw. 0,7 nicht signifikant verändert und im dritten Versuch signifikant gesteigert auf 1,2. Eine Induktion der Katalase durch Quercetin konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Catechin

Catechin ist das weit verbreitetste Polyphenol in Tee, Früchten und Rotwein. Es ist als potentes Antioxidanz beschrieben worden (Yoneda 1995, Noda 1997). Über seinen Einfluss auf die Aktivität antioxidativer Enzyme ist jedoch noch wenig bekannt. *In-vivo*-Studien, in denen Catechin oder catechinhaltige Nahrungsmittel zugefüttert wurden, zeigten veränderte Enzymaktivitäten von CAT, GPX oder SOD. So verabreichten Jeon et al. BALB/c-Mäusen über zwei oder vier Wochen Futter mit einem Anteil an (+)-Catechin von 2 %. Sie verzeichneten eine deutlich reduzierte CAT- und SOD-Aktivität sowie eine gesteigerte GPX-Aktivität in der Haut der Tiere. Bei durch UVB-Strahlung induzierter Verminderung von CAT- und SOD-Aktivität wirkte die Vorbehandlung mit Catechin präventiv (Jeon 2003).

In *in-vitro*-Untersuchungen konnte neben einer veränderten SOD-Aktivität auch erhöhte mRNA-Spiegel festgestellt werden, was auf eine Induktion der SOD1 durch Catechin hindeutet. So behandelten Chan et al. kultivierte Astrozyten einer Ratte (RBA) mit 0,1 μM Catechin für zwei oder sieben Tage. Sie beobachteten sowohl einen Anstieg der SOD-Aktivität wie auch der SOD-mRNA-Spiegel (Chan 2002). Chow et al. behandelten PC12-Zellen, einer Zelllinie aus einem Nebennierenmarkstumor der Ratte, mit Catechin (10, 100 μM) über zwei oder sieben Tage und berichteten von einer Erhöhung der mRNA-Expression der SOD1 (Chow 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war den Einfluss von Catechin auf CAT-, GPX- und SOD1-Promotor anhand eines Dual-Luciferase-Reporterassays zu überprüfen. Zunächst wurde mittels Resazurintest die Zytotoxizität von Catechin auf V79-Zellen untersucht. Catechin wirkte in keiner der getesteten Konzentrationen (1 – 1000 μM) zytotoxisch. Für die Stimulation der Zellen im DLR-Assay kamen alle Konzentrationen in Betracht. Da Catechin in einer Konzentration von 50 μM stark antioxidativ wirkt, wie sein Einsatz im Lipidperoxidationsassay zeigt (Schulze Pröbsting 2007), wurde entschieden, Catechin im anschließenden DLR-Assay in eben dieser Konzentration einzusetzen.

Zur Untersuchung des induktiven Potentials wurden mit CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Reporterkonstrukten transient transfizierte V79-Zellen mit 50 μM Catechin für 24 h stimuliert. Die CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor-Aktivität änderte sich durch diese Behandlung nicht. Folglich konnte keine Induktion von Katalase, zytosolischer Glutathion-Peroxidase oder Cu,Zn-Superoxid-Dismutase durch Catechin in diesem Modellsystem nachgewiesen werden.

Epigallocatechingallat

Epigallocatechingallat (EGCG) ist ein Catechinderivat, das hauptsächlich im Grünen Tee zu finden ist. Seine Wirkung als Radikalfänger und die somit starken antioxidativen Eigenschaften sind bekannt (Yoneda 1995, Noda 1997). In Tierversuchen wurden durch die Verabreichung von EGCG oder EGCG-haltigem Futter veränderte Enzymaktivitäten von CAT, GPX oder SOD beobachtet. In *Drosophila melanogaster* führte die 20tägige Verabreichung von Longjing-Grüntee-Catechinextrakt (62 % EGCG) zum Anstieg von CAT- und SOD1-Aktivität sowie -mRNA-Spiegel (Li 2007). Keine Aktivitätsänderung zeigte sich in *in-vitro*-Untersuchungen. So stimulierten Yamamoto et al. OSC2- und OSC-4-Zellen, die aus zervikalen metastatischen Lymphknoten von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom isoliert wurden, sowie humane primäre epidermale Keratinozyten (NHEK) für 30 min mit 50 μM EGCG und konnten keine Veränderung der CAT- und SOD-Aktivität feststellen (Yamamoto 2003). Allerdings konnte durch Stressoren induzierten Alterationen der AOE-Aktivität durch die Stimulation mit EGCG vorgebeugt werden. Lee et al. untersuchten bspw. die Auswirkung von EGCG auf die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Durch die Behandlung mit Endprodukten der Maillardreaktion (engl. *advanced glycation endproducts*, AGE) kam es in den SH-SY5Y-Zellen zu einer Reduktion der CAT- und SOD-Aktivität sowie einem Anstieg der GPX-Aktivität. Die Stimulation mit EGCG in den Konzentrationen 5 und 10 μM verhinderte dies (Lee 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das zytotoxische Potential von EGCG mittels Resazurintest bestimmt. Bis zu einer EGCG-Konzentration von 50 μM traten keine zytotoxischen Effekte auf. Ab 100 μM wirkte die Substanz stark zytotoxisch, womit diese Konzentrationen für die Behandlung der Zellen ungeeignet waren. Für die Stimulation von V79-Zellen mit EGCG zum Nachweis seiner Fähigkeit zur Induktion antioxidativer Enzyme wurde die höchste, nicht-zytotoxische Konzentration (= 50 μM) gewählt.

In einem ersten Experiment kam es durch die Stimulation der V79-Zellen mit 50 μM EGCG zu einem signifikanten Abfall der SOD1-Promotor-Aktivität, was bei Wiederholung des Experiments nicht bestätigt werden konnte. EGCG verursachte einen signifikanten Anstieg der GPX1-Promotor-Aktivität auf 1,4. In einem zweiten Versuch konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen ohne weitere Untersuchungen keine Schlüsse über das Induktionspotential von EGCG auf diese beiden Enzyme zu. Eine Veränderung der CAT-Promotor-Aktivität konnte zudem nicht beobachtet werden.

Sonstige Antioxidanzien und ihr Einfluss auf CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor

Als letzte Gruppe wurden L-Carnitin, Ascorbat und Trolox auf die Induktion von CAT, GPX1 und SOD1 getestet. Hierbei handelte es sich um Substanzen, die als starke Antioxidanzien galten, von denen es jedoch keine Hinweise auf die Induktion antioxidativer Enzyme gab.

L-Carnitin

Carnitin ist ein wasserlösliches, quaternäres Amin. Es spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle als essentieller Kofaktor für den Transport von langkettigen Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran (Bremer 1983). L-Carnitin wird sowohl aus der Nahrung resorbiert wie auch endogen gebildet und gilt als Antioxidanz (Tein 1996).

In mehreren Studien wurden Ratten prooxidativen Stressoren ausgesetzt, was zu einer Steigerung oxidativer Stressmarker führte und zudem mit einer veränderten CAT-, GPX- oder SOD-Aktivität einherging. Diesen Effekten konnte durch die Behandlung mit L-Carnitin vorgebeugt werden. Asha Devi et al. bspw. supplementierten männliche *Wistar*-Ratten über 30 Tage mit L-Carnitin und beobachteten in den Erythrozyten der Tiere sowohl eine Senkung der Lipidperoxidation wie auch einen Anstieg von CAT- und SOD-Aktivität. Zudem lösten sie oxidativen Stress durch intermittierende hypobarische Hypoxie (iHH) bei den Tieren aus. In der Folge kam es in den Erythrozyten zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation sowie zu einem Anstieg von CAT- und SOD-Aktivität. Bei vorheriger dreißigtägiger Behandlung der

Ratten mit L-Carnitin fiel dieser Anstieg weniger stark aus (Asha Devi 2007). Irat et al. induzierten durch die einmalige Gabe von Streptozotocin Diabetes in männlichen *Wistar*-Ratten. Damit kam es in der Aorta der Tiere zum Anstieg der Konzentration an thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) als Maß für die Lipidperoxidation (Yin 1995, Yagi 1976) und zur Erhöhung der Katalase-Aktivität. Die GPX-Aktivität demgegenüber blieb unverändert. Die zweiwöchige Behandlung der diabetischen Ratten mit L-Carnitin (0,6 g/kg) verhindert den Anstieg sowohl vom TBARS-Spiegel als auch der Katalase-Aktivität (Irat 2003). Rajasekar et al. verabreichten männlichen *Wistar*-Ratten eine fruktosereiche Diät, welche prooxidativ wirkte, was sich im Skelettmuskel der Tiere unter anderen in einer gesteigerten Konzentration an TBARS, Lipidhydroperoxiden und konjugierten Dienen sowie einer verminderten CAT-, GPX- und SOD-Aktivität äußerte. Durch die dreißigtägige Behandlung der Ratten mit L-Carnitin (0,3 g/kg/d) wurden diesen Effekten vorgebeugt (Rajasekar 2007). Auf welcher Ebene die beobachteten modulierenden Effekte auf die AOE-Aktivität stattfand, wurde in keiner der Studien hinreichend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden V79-Zellen mit L-Carnitin in unterschiedlichen Konzentrationen über 24 h stimuliert. Anhand des Resazurinumsatzes konnte somit die Zytotoxizität der Substanz bestimmt werden. Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (1 – 1000 μ M) wirkte L-Carnitin nicht zytotoxisch, so dass in Hinblick auf die Untersuchung des Einflusses von L-Carnitin auf die Aktivitäten von CAT-, GPX1- bzw. SOD1-Promotor mittels Dual-Luciferase-Reportergen-Assay für die höchste Konzentration (1 mM) gewählt wurde.

In einem ersten Experiment konnte eine signifikante Verminderung der SOD1-Promotor-Aktivität nach Vorinkubation mit 1 mM L-Carnitin beobachtet werden. Dies konnte bei Wiederholung der Experimente aber nicht bestätigt werden, so dass davon ausgegangen wurde, dass L-Carnitin keine modulierende Wirkung auf den SOD1-Promotor hat. In mit CAT- und GPX1-Promotor-Reportergenkonstrukten transient transfizierten V79-Zellen wurde nach Stimulation mit 1 mM L-Carnitin in drei unabhängigen Versuchen keine Änderung der Promotoraktivität verzeichnet. Ein Einfluss von L-Carnitin auf die Expression von CAT, GPX1 oder SOD1 konnte somit in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Natrium-Ascorbat

Ascorbat ist für den Menschen essentiell, kommt vor allem in Obst, Gemüse und Grüntee vor und ist als starkes Antioxidanz beschrieben (Svirbely 1932, Pauling 1970). Es wirkt als Radikalfänger durch direkte Reaktion mit Superoxid- und Hydroxylradikalen sowie mit

diversen Lipidhydroperoxiden. Zudem regeneriert es oxidiertes Vitamin E (Witting 1964). Ähnlich dem L-Carnitin wurden vom Vitamin C präventive Wirkungen auf durch prooxidative Stressoren ausgelöste Alterationen der AOE-Aktivität in Tierversuchen beobachtet.

So wurde beobachtet, dass ein durch Streptozotocin induzierter Diabetes in *Wistar*-Ratten mit einer verminderten CAT- und SOD-Aktivität in der Rattenleber einherging. Die dreiwöchige Behandlung der diabetischen Tiere mit Vitamin C verhinderte dies (Sadi 2007). Asha Devi et al. hingegen beobachteten einen Anstieg der CAT- und SOD-Aktivität in den Erythrozyten von *Wistar*-Ratten nach 30tägiger Zufütterung von Vitamin C. Nach Auslösen von oxidativem Stress durch intermittierende hypobarische Hypoxie (iHH) kam es in den Erythrozyten ebenfalls zu einer Erhöhung von CAT- und SOD-Aktivität. Die vorhergehende dreißigtägige Behandlung der Ratten mit Vitamin C beugte diesem Anstieg vor (Asha Devi 2007). Zudem wurde in Rattenhirnastrozyten (RBA-1) nach siebentägiger Stimulation mit Vitamin C (40, 80, 160 μM) ein konzentrationsabhängiger Abfall von SOD1-Aktivität und – mRNA-Spiegel beobachtet (Kao 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Zytotoxizität von Natrium-Ascorbat auf V79-Zellen mittels Resazurintest ermittelt. Die Behandlung mit Natrium-Ascorbat bis zu einer Konzentration von 500 μM verringerte die Resorufin-Bildung nicht. In einer Konzentration von 1 mM nahm sie auf 0,8 ab, wobei die Einzelmesswerte stark schwankten, was anhand der relativ großen Standardabweichung zu erkennen ist. Der Abfall war statistisch nicht signifikant. Zur Sicherheit wurde jedoch für die Stimulation der V79-Zellen im Rahmen des DLR-Assay der geringeren Konzentration der Vorrang gegeben.

Mit CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Reportergenkonstrukten transient transfizierte V79-Zellen wurden mit 500 μM Natrium-Ascorbat für 24 h stimuliert. In je zwei unabhängigen Experimenten wurde keine signifikante Abweichung der CAT-, GPX1- und SOD1-Promotor-Aktivitäten von der Lösungsmittelkontrolle beobachtet.

Trolox

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat (Scott 1974, Cort 1975). Vitamin E wurde 1922 als essentieller Nahrungsbestandteil entdeckt (Evans 1922, Fernholz 1938) und findet sich in Ölsamen wie Alfalfa, Mais und Soja. Vitamin E selbst ist seit langem als Antioxidanz bekannt (Crider 1961, Witting 1964). Auch in der wasserlöslichen Form wirkt es stark antioxidativ und wird in antioxidativen Assays oft als Referenzsubstanz eingesetzt, was sich in der Angabe der *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) äußert (Miller 1993). Daneben wiesen Tierversuche

auf eine modulierende Wirkung von Trolox auf Aktivität und Expression von Phase-II-Enzymen hin. Durch hepatische Ischämie und anschließende Reperfusion hervorgerufene Veränderungen in der CYP-Aktivität und –mRNA-Spiegel bspw. konnten durch die vorherige Gabe von Trolox (2,5 mg/kg) verhindert werden (Eum 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität von verschiedenen Trolox-Konzentrationen anhand der Reduktion von Resazurin untersucht. Bis zu einer Konzentration von 100 μM Trolox blieb das Resazurinumsatzvermögen unverändert. In höheren Konzentrationen wirkte die Substanz zytotoxisch. Trolox ist ein starkes Antioxidanz und findet (auch in dieser Arbeitsgruppe) bei der Bestimmung antioxidativer Eigenschaften mit dem ABTS-Assay als Referenzsubstanz Anwendung. In der Arbeitsgruppe wird Trolox im ABTS-Assay mit 10 μM verwendet (Schulze Pröbsting 2007), so dass es von Interesse war, ob in dieser Konzentration auch ein Einfluss auf die CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor-Aktivität zu erkennen war.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels DLR-Assay die Wirkung von 10 μM Trolox auf die Promotoraktivität von CAT, GPX1 und SOD1 untersucht. Die 24-stündige Inkubation von transient transfizierten V79-Zellen mit der Substanz führte in drei unabhängigen Experimenten zu keiner Änderung der SOD1- und CAT-Promotor-Aktivität. In einem ersten Experiment kam es zu einer signifikanten Reduktion der GPX1-Promotor-Aktivität, der aber in zwei weiteren Versuchen nicht reproduziert wurde. Es konnte somit keine Induktion von Katalase, zytosolischer Glutathion-Peroxidase und Cu,Zn-Superoxid-Dismutase durch Trolox nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Zusammengefasst konnten mit dem hier etablierten DLR-Assay die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen teilweise bestätigt werden. Es konnten von den zehn getesteten Verbindungen drei potente Induktoren für die SOD1 ermittelt werden. Dazu zählten das Herbizid Paraquat, welches die relative SOD1-Promotor-Aktivität verdoppelte, sowie die Nahrungsflavonoide Genistein und Quercetin, wodurch die SOD1-Promotor-Aktivität bis auf das Dreifache gesteigert werden konnte. Diese drei Verbindungen waren ebenfalls in der Lage, den GPX1-Promotor zu aktivieren. Paraquat erhöhte dabei die relative GPX1-Promotor-Aktivität auf 1,6 bzw. 1,7, während Genistein und Quercetin sie mehr als verdoppeln konnten.

Entgegen den Ergebnissen anderer Gruppen konnte mit dem vorliegenden *in-vitro*-Testsystem keine Induktion der SOD1 durch TPA (Minc 1999, Toyokuni 2003) sowie der SOD1 und GPX1 durch H_2O_2 (Toyokuni 2003) nachgewiesen werden.

Das peroxisomale Enzym Katalase konnte demgegenüber nur durch 50 μM H_2O_2 induziert werden.

Keine Beeinflussung der Aktivität von CAT-, GPX1- oder SOD1-Promotor wurden in diesem Testsystem durch die Nahrungsflavonoide Catechin und EGCG sowie L-Carnitin, Natrium-Ascorbat, TPA und Trolox beobachtet.

Möglicherweise war die jeweilige Konzentration zu niedrig gewählt, um einen Effekt zu zeigen. Dafür spricht, dass eine Induktion der Katalase durch H_2O_2 bspw. nur in der zytotoxischen Konzentration von 50 μM gezeigt werden konnte. Bei Stimulation mit 10 μM H_2O_2 hingegen wurden weder CAT- noch SOD1- oder GPX1-Promotor-Aktivität verändert. Eine GPX1-Induktion durch H_2O_2 wurde erst bei 100 μM (Toyokuni 2003) und eine SOD1-Induktion erst bei 200 μM (Minc 1999) beschrieben. Diese Konzentrationen liegen 10- bzw. 20fach höher. Allerdings zeigten Toyokuni et al. auch eine CAT-Induktion durch 1 μM H_2O_2 , was im hier verwendeten Testsystem erst durch eine 50fach höhere Konzentration beobachtet wurde. Demgegenüber waren die Konzentrationen von L-Carnitin mit 1 mM oder Natrium-Ascorbat mit 500 μM weit höher als bei den induzierenden Substanzen (z. B. 100 μM Paraquat), so dass dies bei diesen Substanzen als unwahrscheinlich betrachtet wurde. Um eine qualifizierte Aussage über das Induktionspotential dieser Substanzen machen zu können, müsste von jeder Substanz eine Dosis-Wirkungskurve aufgenommen werden. Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war jedoch, eine Referenzsubstanz zu ermitteln. Dies ist mit Paraquat, Genistein, Quercetin und H_2O_2 gelungen.

Weiterhin wurde für den hier etablierten DLR-Assay die Inkubationszeit mit den einzelnen Substanzen auf 24 h festgelegt. Die SOD1-Induktion durch Paraquat wurde durch Yoo et al. innerhalb von 4 h beachtet, wobei das Maximum bereits nach 1 h erreicht wurde (Yoo 1999B). Eine SOD1-Promotor-Aktivierung konnte hier auch bei einer Behandlungsdauer von 24 h gezeigt werden. Demgegenüber wurde eine GPX1-Induktion durch H_2O_2 nach 24 h durch Toyokuni beschrieben (Toyokuni 2003). Dies konnte mit dem vorliegenden Testsystem bei gleicher Zeitspanne nicht gezeigt werden. Die stimulierende Wirkung von Catechin auf die SOD1-mRNA-Spiegel wurde zudem bei einer Präinkubationsdauer von zwei oder sieben Tagen beobachtet (Chan 2002, Chow 2002). Dass in der vorliegenden Arbeit keine SOD1-Induktion durch Catechin gezeigt wurde, kann an der deutlich kürzeren Behandlungsphase liegen. Ähnliches gilt für EGCG. So berichteten Li et al. von einer Steigerung von CAT- und SOD1-mRNA-Spiegel nach 20tägiger Behandlung mit Grüntee-Catechinextrakt (Li 2007). In

der vorliegenden Arbeit konnte nach 24-stündiger Stimulation mit EGCG keine Induktion von CAT oder SOD1 beobachtet werden, was möglicherweise an dem kürzeren Zeitraum liegt.

Es ist weiterhin möglich, dass die durch andere Arbeitsgruppen beobachteten modulierenden Effekte spezies- oder zelllinienabhängig waren und dadurch im vorliegenden System nicht erfasst worden sind. So zeigten Yoo et al. bspw. die Induktion der Ratten-SOD1 durch 200 μM H_2O_2 (Yoo 1999B). In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen der humane SOD1-Promotor betrachtet. Beide Promotoren sind sich sehr ähnlich, der proximale Promotor ist fast identisch (Kim 1994). Zudem findet sich das für die H_2O_2 -Wirkung verantwortliche Wasserstoffperoxid Responsive Element (HRE) des Ratten-SOD1-Promotors auch im humanen SOD1-Promotor (Chang 2002).

Ferner wurde bspw. von einer Steigerung der SOD1-mRNA-Spiegel durch Catechin berichtet (Chan 2002, Chow 2002), eine SOD1-Promotor-Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht gezeigt. In den o. g. Arbeiten kamen Rattenzellen zum Einsatz (Astrozyten, RBA-1 bei Chan et al., Nebennierenmarkstumor, PC12 bei Chow et al.). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamster verwendet (V79). Zudem konnte TPA in dieser Arbeit nicht als SOD1-Induktor identifiziert werden, obwohl es in der gleichen Konzentration (150 nM) und bei einer nur wenig längeren Inkubationszeit (24 h vs. 16 h) eingesetzt wurde wie in den Experimenten von Minc et al. (humanes, epitheliales Zervixkarzinom, HeLa; Minc 1999) und Toyokuni et al. (Nierenfibroblasten der Grünen Meerkatze, COS-7; Toyokuni 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Effekte zelllinienabhängig sind und deshalb mit dem vorliegenden Testsystem nicht erfasst werden können.

Des Weiteren ist denkbar, dass die beschriebenen Effekte der Antioxidanzien auf die Aktivität oder die mRNA-Spiegel der antioxidativen Enzyme nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Die Enzymaktivität kann daneben unter anderem auch durch die Stabilität der mRNA oder die Stabilität bzw. die Modifikation des Enzyms selbst reguliert werden (Alberts 2002). Die erhöhten CAT-mRNA-Spiegel in der Lunge von Ratten nach Hyperoxie sind bspw. die Folge einer Stabilisierung der CAT-mRNA (Clerch 1992). Ähnliches trifft möglicherweise auch auf die Erhöhung der SOD1-mRNA-Spiegel durch Catechin (Chan 2002, Chow 2002), die Verminderung der SOD1-mRNA-Spiegel durch Natrium-Ascorbat (Kao 2003) oder die Steigerung von CAT- und SOD1-mRNA-Spiegel durch EGCG (Li 2007). Eine Aktivierung oder Repression der entsprechenden Promotoren durch diese Substanzen konnte in der vorliegenden Arbeit nämlich nicht gezeigt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Antioxidanzien Catechin, EGCG, Natrium-Ascorbat, L-Carnitin und Trolox ihre beschriebene antioxidative Wirkung auf nicht-enzymatischem Wege vermitteln. So könnte das Reduktionspotential der Substanzen bspw. die antioxidative Kapazität der Zellen derart verbessert haben, dass es als Antwort darauf zur Repression antioxidativer Enzyme kam (Breinholt 1999). Zudem sei darauf hingewiesen, dass in einigen der oben vorgestellten Studien die Konzentration an Lipidperoxidationsprodukten oder TBARS mit der AOE-Aktivität korrelierten. Die auf die AOE-Aktivität präventive Wirkung von bspw. L-Carnitin in Tierversuchen könnte dementsprechend mit einer direkten Neutralisierung oxidativer Stressoren durch L-Carnitin erklärt werden. Die Zufuhr von L-Carnitin bedeutete jedoch auch ein vermehrtes Einschleusen von Lipiden in die Mitochondrien, womit sowohl die Lipid-Konzentration als auch die TBARS-Spiegel im Blut vermindert würden (Irat 2003, Rajasekar 2007).

Ausblick

Für die weitere Anwendung des etablierten Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay werden die Nahrungsflavonoide Genistein und Quercetin als positive Referenzsubstanz für die Promotoraktivierung von SOD1 und GPX1 sowie als negative Referenz für die CAT-Promotoraktivierung vorgeschlagen. Demgegenüber wird H_2O_2 als positive Referenz für die CAT-Promotoraktivierung sowie als negative Referenz für die SOD1- und GPX1-Promotoraktivierung empfohlen. Für den routinemäßigen Einsatz des DLR-Assays bietet sich zudem die Verwendung stabil transfizierter Zelllinien zur Vermeidung von mit dem Transfektionsprozess verbundenen experimentellen Schwankungen an.

Des Weiteren sollten als logische Konsequenz aus den hier vorgestellten Untersuchungen von allen getesteten Substanzen Dosis-Wirkungskurven aufgenommen werden. Nur so ist eine ausführliche Charakterisierung der einzelnen Verbindungen hinsichtlich ihres Induktionspotentials gewährleistet. Nachgeschaltete Tierexperimente zur Untersuchung der Enzymaktivitäten sollten zudem die physiologische Relevanz der hier untersuchten Promotoraktivierung aufklären.

Zusammenfassung

Die Induktion antioxidativer Enzyme gilt als eine Möglichkeit, die antioxidative Kapazität von Zellen zu steigern und dadurch mit oxidativem Stress assoziierten Erkrankungen (z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neurodegeneration, Atherosklerose) vorzubeugen. Ausgehend davon wurde in der vorliegenden Arbeit der Dual-Luciferase-Reportergen-(DLR)-Assay zum Nachweis der Induktion der antioxidativen Enzyme Katalase (CAT), zytosolische Glutathion-Peroxidase (GPX1) und Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) entwickelt. Im Zuge dessen wurden drei Säugetierzelllinien (CaCo2, IEC-18, V79) auf ihre Eignung zur Modellzelllinie untersucht. Aufgrund der Transfektionseffizienz wurde die Fibroblastenzelllinie V79 ausgewählt. Zur Gewährleistung eines hohen Substanzdurchsatzes des DLR-Assays wurden bei der Etablierung Parameter wie Kulturplattenformat, DNA-Menge, Luciferasen-Kinetik berücksichtigt.

Nach erfolgreicher Etablierung des Versuchs im 96-Well-Format wurden L-Carnitin, Catechin, Epigallocatechingallat, Genistein, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Natrium-Ascorbat, Paraquat, Quercetin, 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) und Trolox in nicht-zytotoxischen Konzentrationen hinsichtlich der Aktivierung des Ratten-CAT-, des humanen GPX1- und des humanen SOD1-Promotors untersucht. Die Bestimmung der maximal tolerierbaren Behandlungskonzentration erfolgte im Vorfeld mittels Resazurintest.

Von den zehn Verbindungen zeichneten sich drei Substanzen als potente Induktoren für die SOD1 und die GPX1 aus. Die 24-stündige Behandlung von mit Reportergenkonstrukten transient transfizierten V79-Zellen mit 100 μM Paraquat resultierte in einer Verdopplung der relativen SOD1-Promotor-Aktivität und einer Erhöhung der relativen GPX1-Promotor-Aktivität auf 1,6 bzw. 1,7. Die Stimulation mit 20 μM Genistein oder 10 μM Quercetin führte wiederum zu einer Verdopplung bis Verdreifachung der relativen SOD1- und GPX1-Promotor-Aktivität. Der Promotor der Rattenkatalase konnte demgegenüber nur durch 50 μM H_2O_2 aktiviert werden (1,5fach).

Für diesen DLR-Assays bieten sich folglich Genistein, Quercetin wie auch H_2O_2 als Referenzsubstanzen an. Um aber eine qualitative Charakterisierung der einzelnen Verbindungen hinsichtlich ihres Induktionspotentials zu gewährleisten, sollten von allen getesteten Substanzen Dosis-Wirkungskurven aufgenommen werden. Zudem wird für den routinemäßigen Einsatz die Verwendung stabil transfizierter Zellen zur Vermeidung von mit der Transfektion verbundenen experimentellen Schwankungen empfohlen.

Summary

The induction of antioxidative enzymes might be an opportunity to elevate the cellular antioxidative capacity and, thus, to prevent oxidative stress associated diseases (e. g. cardiovascular disease, neurodegenerative disease, atherosclerosis). Based on this idea the dual luciferase reporter gene (DLR) assay was developed to demonstrate the induction of three antioxidative enzymes: catalase (CAT), cytosolic glutathione peroxidase (GPX1), and copper-zinc superoxide dismutase (SOD1). In the course of the development three mammalian cell lines (CaCo2, IEC-18, V79) were tested for their ability to serve as a model cell line. The line V79 was chosen due to the transfection efficiency. To give consideration to a high-throughput several parameters were studied (e. g. format of the cultural plates, amount of DNA, kinetics of the luciferases) and the DLR assay was successfully established in 96 well plates.

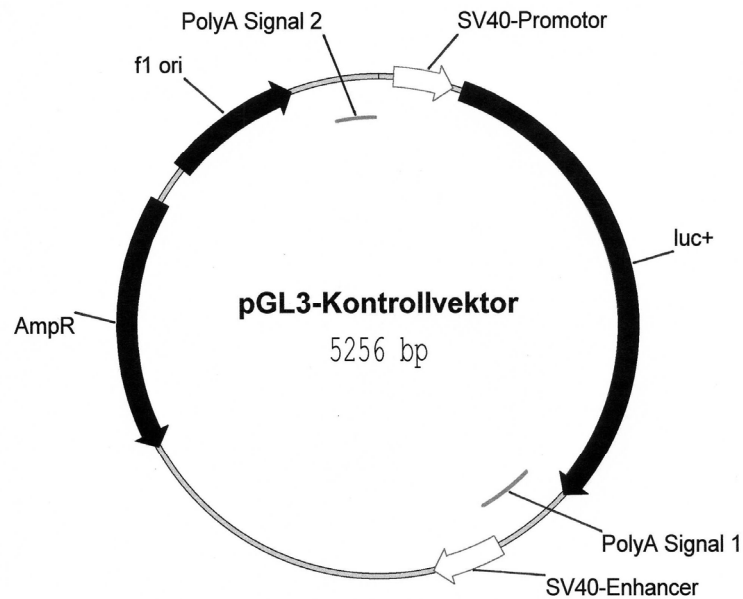
Subsequently, L-carnitine, catechin, epigallocatechin gallate, genistein, hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium ascorbate, paraquat, quercetin, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and trolox were tested in non-cytotoxic concentrations for the activation of the rat CAT, human GPX1 and human SOD1 promoter. The maximally tolerable concentrations were determined by resazurin test in advance.

Three out of these ten compounds were identified as potent inducers of GPX1 and SOD1. Stimulation of reporter gene construct transiently transfected V79 cells for 24 hours with 100 μ M paraquat caused a duplication of the relative GPX1 promoter activity and a 1.6-/1.7-fold increase of the relative SOD1 promoter activity. The incubation with 20 μ M genistein or 10 μ M quercetin resulted in duplication to triplication of both, the relative GPX1 and SOD1 promoter activity. In contrast, the rat CAT promoter was activated by 50 μ M H_2O_2 (1.5-fold).

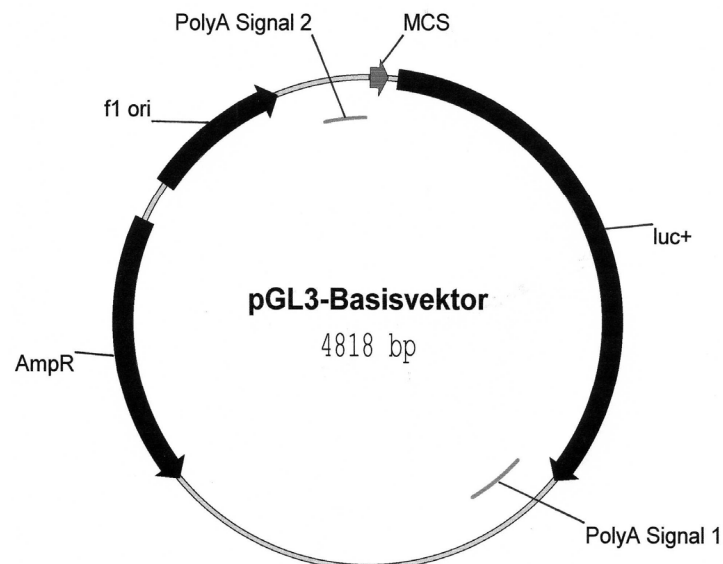
Consequently, genistein, quercetin, and H_2O_2 are considered to be suitable reference substances for this DLR assay. To further characterize the inducing potential of the tested compounds all of them should be tested in different concentrations. Furthermore, for the routinely performed DLR assay it is recommended to use stably transfected cells to eliminate transfection caused variations.

Anhang

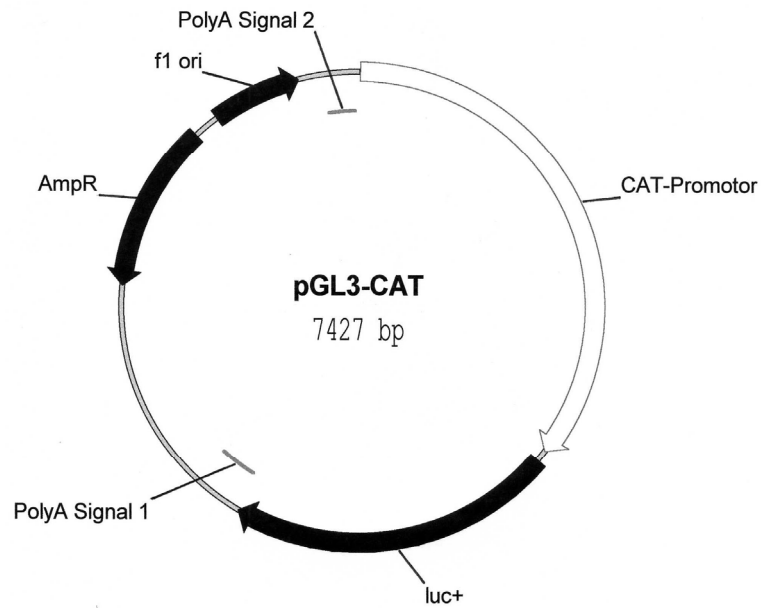
Anhang 1: Vektorkarten



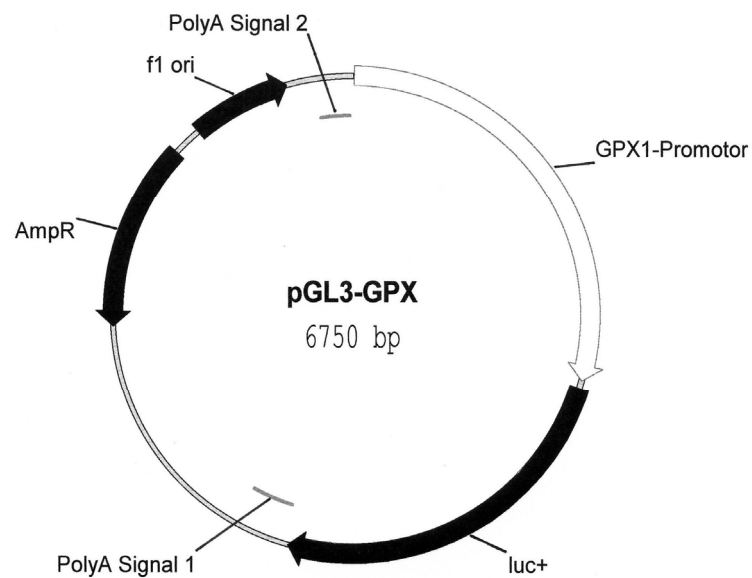
| | |
|-------------|---|
| 48 – 250 | SV40-Promotor |
| 280 – 1932 | <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen (<i>luc+</i>) |
| 1964 – 2185 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 2205 – 2441 | SV40-Enhancer |
| 3518 – 4378 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp^r</i>) |
| 4510 – 4965 | Replikationsstartpunkt (<i>f1 ori</i>) |
| 5096 – 5249 | Polyadenylierungsstelle 2 |



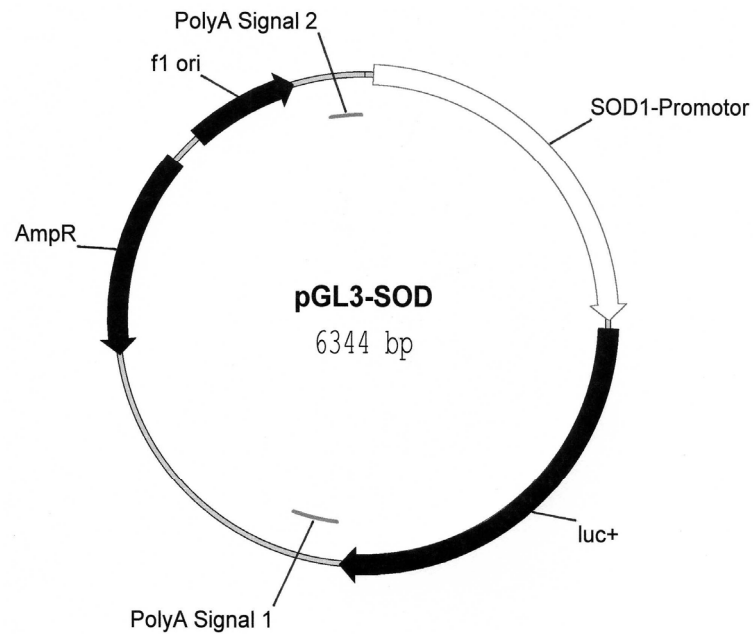
| | |
|-------------|---|
| 1 – 58 | Multiple Klonierungsstelle (MCS) |
| 88 – 1740 | <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen (<i>luc+</i>) |
| 1772 – 1993 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 3080 – 3940 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp^r</i>) |
| 4072 – 4527 | Replikationsstartpunkt (<i>f1 ori</i>) |
| 4658 – 4811 | Polyadenylierungsstelle 2 |



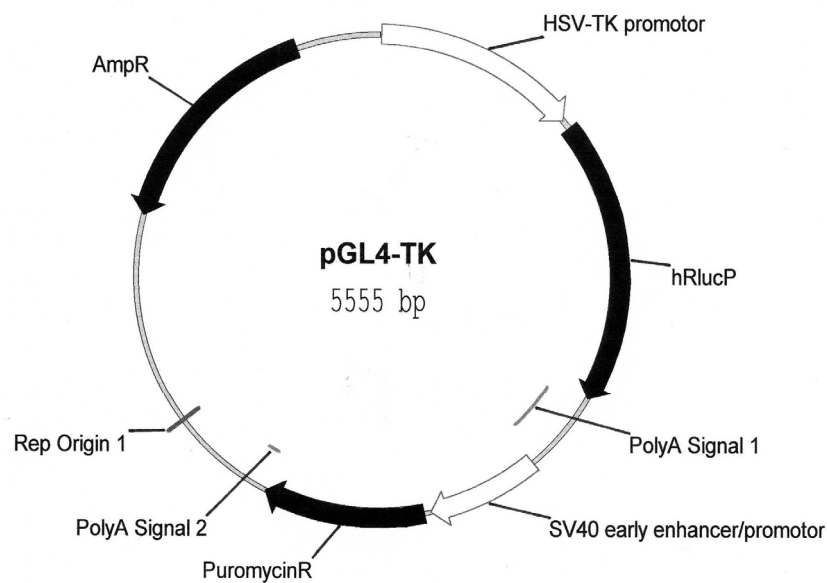
| | |
|-------------|--|
| 1 – 2630 | Ratten-CAT-Promotor |
| 2686 – 4338 | <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen (<i>luc+</i>) |
| 4370 – 4591 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 5678 – 6538 | β -Lactamase-Gen (Amp^r) |
| 6670 – 7125 | Replikationsstartpunkt (<i>f1 ori</i>) |
| 7256 – 7409 | Polyadenylierungsstelle 2 |



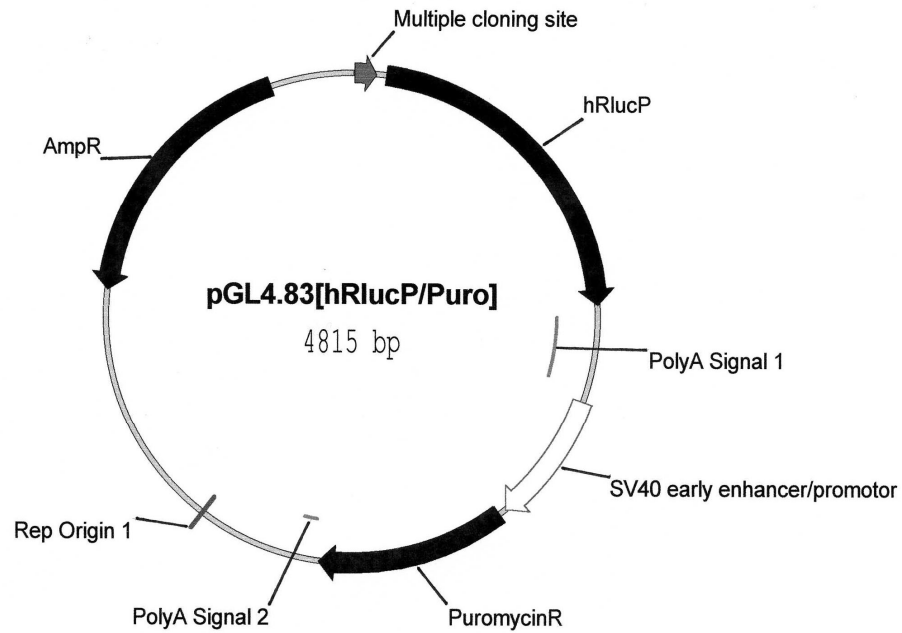
| | |
|-------------|--|
| 1 – 1980 | humaner GPX1-Promotor |
| 2015 – 3667 | <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen (<i>luc+</i>) |
| 3699 – 3920 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 5007 – 5867 | β -Lactamase-Gen (Amp^r) |
| 5999 – 6454 | Replikationsstartpunkt (<i>f1 ori</i>) |
| 6585 – 6738 | Polyadenylierungsstelle 2 |



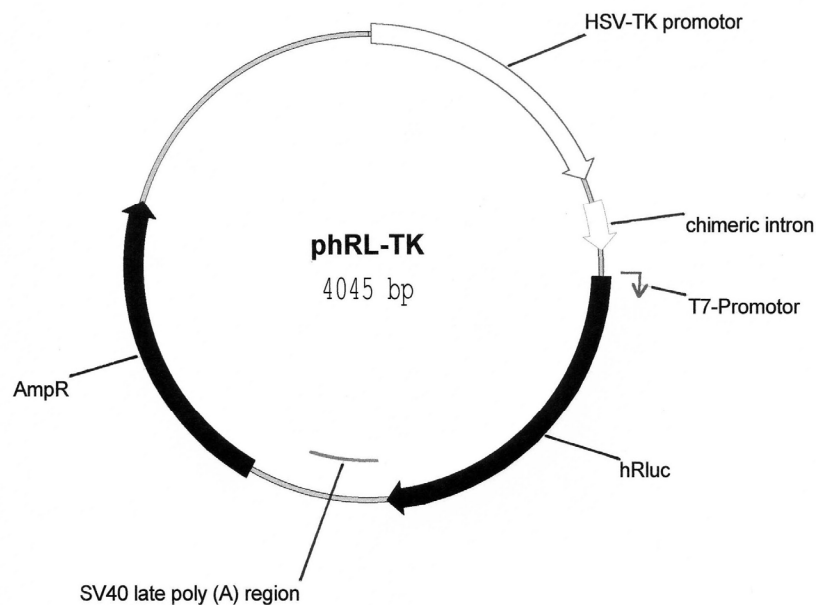
| | |
|-------------|---|
| 33 – 1579 | humaner SOD1-Promotor |
| 1614 – 3266 | <i>Firefly</i> -Luciferase-Gen (<i>luc+</i>) |
| 3298 – 3519 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 4606 – 5466 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp^r</i>) |
| 5598 – 6053 | Replikationsstartpunkt (<i>f1 ori</i>) |
| 6184 – 6337 | Polyadenylierungsstelle 2 |



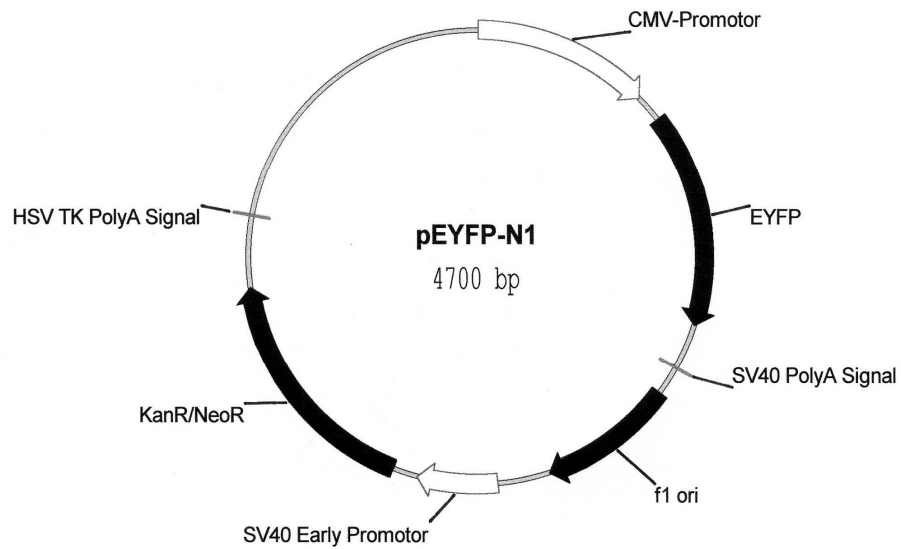
| | |
|-------------|--|
| 6 – 758 | HSV-TK-Promotor |
| 794 – 1852 | <i>Renilla</i> -Luciferase-Gen (<i>hRlucP</i>) |
| 1892 – 2113 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 2161 – 2579 | SV40-Early-Enhancer/Promotor |
| 2604 – 3203 | Puromycin- <i>N</i> -Acetyltransferase-Gen (<i>Puro^r</i>) |
| 3228 – 3276 | Polyadenylierungsstelle 2 |
| 3600 | Replikationsstartpunkt (<i>Rep Origin 1</i>) |
| 4391 – 5251 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp^r</i>) |



| | |
|-------------|---|
| 1 – 70 | Multiple Klonierungsstelle (MCS) |
| 100 – 1158 | <i>Renilla</i> -Luciferase-Gen (<i>hRlucP</i>) |
| 1198 – 1419 | Polyadenylierungsstelle 1 |
| 1467 – 1885 | SV40-Early-Enhancer/Promotor |
| 1910 – 2509 | Puromycin- <i>N</i> -Acetyltransferase-Gen (<i>Puro</i> ^r) |
| 2534 – 2582 | Polyadenylierungsstelle 2 |
| 2906 | Replikationsstartpunkt (Rep Origin 1) |
| 3697 – 4557 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp</i> ^r) |



| | |
|-------------|--|
| 7 – 759 | HSV-TK-Promotor |
| 826 – 962 | Chimäres Intron |
| 1023 | T7-Promotor |
| 1034 – 1969 | <i>Renilla</i> -Luciferase-Gen (<i>hRluc</i>) |
| 1991 – 2212 | SV40 späte Polyadenylierungsstelle |
| 2359 – 3219 | β -Lactamase-Gen (<i>Amp</i> ^r) |



| | |
|-------------|---|
| 1 – 58 | CMV-Promotor |
| 679 – 1398 | <i>Enhanced-Yellow-Fluorescent-Protein-Gen</i> (EYFP) |
| 1552 – 1586 | SV40-Polyadenylierungsstelle |
| 1649 – 2104 | Replikationsstartpunkt (f1 ori) |
| 2278 – 2546 | SV40-Early-Promotor |
| 2629 – 3423 | Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Kan ^r /Neo ^r) |
| 3659 – 3677 | HSV-TK-Polyadenylierungsstelle |

Anhang 2: Ergebnisse des Resazurintests.

In den Tabellen ist die relative Resorufin-Absorption angegeben, d.h. alle Einzelwerte wurden durch den Mittelwert bzw. Median der Lösungsmittelkontrolle dividiert. Gezeigt sind Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) bei Varianzenhomogenität bzw. Median (MD) mit halbem Quartilsabstand (QD) bei Varianzenheterogenität. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend Kapitel 2.5. ns = nicht sign., * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle (n = 4, # n = 3).

| DMSO | | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|
| | 0 | 0,01% | 0,05% | 0,10% | 0,50% | 1% | 5% | 10% |
| MD | 1,000 | 0,941 | 1,027 | 0,922 | 1,004 | 0,980 | 0,129 | 0,123 |
| QD | 0,029 | 0,100 | 0,068 | 0,066 | 0,014 | 0,052 | 0,001 | 0,001 |
| U-Test vs. Kontrolle | | ns (p = 0,886) | ns (p = 0,886) | ns (p = 0,200) | ns (p = 0,886) | ns (p = 1,000) | * | * |

Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,000); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,006)

| L-Carnitin | | | | | | | | |
|----------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1 % DMSO | 1 μ M | 5 μ M | 10 μ M | 50 μ M | 100 μ M | 500 μ M | 1000 μ M |
| MD | 1,000 | 1,039 | 1,026 | 1,021 | 1,046 | 0,990 | 1,076 | 1,041 |
| QD | 0,008 | 0,005 | 0,014 | 0,009 | 0,028 | 0,027 | 0,022 | 0,015 |
| U-Test vs. Kontrolle | | * | ns | ns | * | ns | * | ns |
| | | (p = 0,029) | (p = 0,114) | (p = 0,057) | (p = 0,029) | (p = 0,886) | (p = 0,029) | (p = 0,200) |

Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,019); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,024)

| Catechin | | | | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0,2% DMSO | 1 μ M | 5 μ M | 10 μ M | 50 μ M | 100 μ M | 500 μ M | 1000 μ M |
| MW | 1,000 | 0,950 | 0,901 | 0,900 | 0,876 | 0,907 | 0,909 | 0,939 |
| SD | 0,144 | 0,047 | 0,034 | 0,093 | 0,039 | 0,076 | 0,109 | 0,080 |
| | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,091); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,571)

| EGCG | | | | | | | | |
|----------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1 % DMSO | 1 μ M | 5 μ M | 10 μ M | 50 μ M | 100 μ M | 500 μ M | 1000 μ M |
| MD | 1,000 | 1,021 | 0,993 | 0,996 | 0,967 | 0,710 | 0,364 | 0,104 |
| QD | 0,008 | 0,007 | 0,011 | 0,024 | 0,004 | 0,012 | 0,006 | 0,001 |
| U-Test vs. Kontrolle | | ns | ns | ns | * | * | * | * |
| | | (p = 0,200) | (p = 0,486) | (p = 0,686) | (p = 0,029) | (p = 0,029) | (p = 0,029) | (p = 0,029) |

Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,007); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000)

| Genistein | | | | | | | | |
|----------------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1 % DMSO | 1 μ M | 5 μ M | 10 μ M | 50 μ M | 100 μ M | 500 μ M | 1000 μ M |
| MW | 1,000 | 1,030 | 0,973 | 0,892 | 0,770 | 0,704 | 0,343 | 0,370 |
| SD | 0,017 | 0,021 | 0,033 | 0,015 | 0,032 | 0,018 | 0,014 | 0,013 |
| Dunnett-Test vs. Kontrolle | | ns | ns | *** | *** | *** | *** | *** |
| | | (p = 0,256) | (p = 0,371) | (p = 0,000) | (p = 0,000) | (p = 0,000) | (p = 0,000) | (p = 0,000) |

Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,551); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000)

| H₂O₂ | | | | | | | | |
|---|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|--------|---------|
| | 0 | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| MD | 1,000 | 0,912 | 1,023 | 1,044 | 0,859 | 0,545 | 0,121 | 0,114 |
| QD | 0,025 | 0,060 | 0,047 | 0,045 | 0,021 | 0,013 | 0,003 | 0,000 |
| U-Test vs. Kontrolle | | ns (p = 0,686) | ns (p = 0,686) | ns (p = 0,343) | ns (p = 0,200) | * | * | * |
| Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,003); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000) | | | | | | | | |

| Natrium-Ascorbat | | | | | | | | |
|---|------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|
| | 0,5 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| MD | 1,000 | 0,932 | 0,986 | 0,978 | 1,016 | 1,030 | 0,984 | 0,832 |
| QD | 0,008 | 0,021 | 0,008 | 0,023 | 0,012 | 0,020 | 0,018 | 0,076 |
| | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,007); H-Test: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,101) | | | | | | | | |

| Paraquat | | | | | | | | |
|---|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|---------|
| | 1 % DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| MD | 1,000 | 0,981 | 0,980 | 0,993 | 0,991 | 0,930 | 0,676 | 0,604 |
| QD | 0,022 | 0,035 | 0,027 | 0,012 | 0,011 | 0,019 | 0,003 | 0,010 |
| U-Test vs. Kontrolle | | ns (p = 1,000) | ns (p = 1,000) | ns (p = 1,000) | ns (p = 0,886) | ns (p = 0,343) | * | * |
| Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,044); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004) | | | | | | | | |

| Quercetin | | | | | | | | |
|--|------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | 1 % DMSO # | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| MW | 1,000 | 0,974 | 0,976 | 0,835 | 0,622 | 0,510 | 0,448 | 1,024 |
| SD | 0,029 | 0,043 | 0,017 | 0,027 | 0,029 | 0,043 | 0,017 | 0,052 |
| Dunnett-Test vs. Kontrolle | | ns (p = 0,832) | ns (p = 0,866) | *** (p = 0,000) | *** (p = 0,000) | *** (p = 0,000) | *** (p = 0,000) | ns (p = 0,867) |
| Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,285); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000) | | | | | | | | |

| TPA | | | | | | | | |
|--|--------------|----------|----------|---------|---------|--------|--------|-------|
| | 0,025 % DMSO | 0,001 µM | 0,005 µM | 0,01 µM | 0,05 µM | 0,1 µM | 0,5 µM | 1 µM |
| MW | 1,000 | 1,000 | 1,013 | 1,044 | 1,064 | 1,109 | 1,118 | 1,159 |
| SD | 0,137 | 0,164 | 0,133 | 0,060 | 0,054 | 0,064 | 0,041 | 0,043 |
| | | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,101); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,222) | | | | | | | | |

| Trolox | | | | | | | | |
|--|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| | 0,2% DMSO | 1 µM | 5 µM | 10 µM | 50 µM | 100 µM | 500 µM | 1000 µM |
| MW | 1,000 | 1,008 | 0,914 | 0,962 | 0,983 | 0,958 | 0,890 | 0,753 |
| SD | 0,053 | 0,083 | 0,076 | 0,114 | 0,147 | 0,170 | 0,010 | 0,064 |
| Dunnett-Test vs. Kontrolle | | ns (p = 1,000) | ns (p = 0,735) | ns (p = 0,993) | ns (p = 1,000) | ns (p = 0,988) | ns (p = 0,504) | * |
| Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,122); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,034) | | | | | | | | |

Anhang 3: Ergebnisse des DLR-Assays

In den Tabellen ist die relative Promotoraktivität angegeben, d.h. alle Einzelwerte wurden durch den Mittelwert bzw. Median der Lösungsmittelkontrolle dividiert. Gezeigt sind MW \pm SD bei Varianzenhomogenität bzw. MD + QD bei Varianzenheterogenität. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend Kapitel 2.5. ns = nicht sign., * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle (n = 4).

L-Carnitin [1 mM]

| | | |
|------------|-------------------|--|
| CAT-Prom. | | |
| 1 | 0,904 \pm 0,064 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,626) |
| 2 | 1,234 \pm 0,298 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,063); t-Test nach Student: ns (p = 0,178) |
| 3 | 1,151 \pm 0,239 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,015); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,367) |
| GPX1-Prom. | | |
| 1 | 0,956 \pm 0,043 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,242); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,973) |
| 2 | 1,015 \pm 0,131 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,592); t-Test nach Student: ns (p = 0,841) |
| 3 | 0,881 \pm 0,182 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,500); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,106) |
| SOD1-Prom. | | |
| 1 | 0,796 \pm 0,042 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,013); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test U-Test: * (p = 0,029) |
| 2 | 0,777 \pm 0,199 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,963); t-Test nach Student: ns (p = 0,161) |
| 3 | 0,955 \pm 0,038 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,443); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,852) |

Catechin [50 μ M]

| | | |
|------------|-------------------|---|
| CAT-Prom. | | |
| 1 | 0,943 \pm 0,121 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,315); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,323) |
| 2 | 0,940 \pm 0,129 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,817); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,748) |
| 3 | 1,218 \pm 0,363 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,333); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,247) |
| GPX1-Prom. | | |
| 1 | 0,491 \pm 0,016 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,000); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,020); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 0,057) |
| 2 | 1,158 \pm 0,153 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,715); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,365) |
| 3 | 0,959 \pm 0,127 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,526); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,745) |
| SOD1-Prom. | | |
| 1 | 0,912 \pm 0,076 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,675); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,565) |
| 2 | 0,857 \pm 0,242 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,305); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,383) |
| 3 | 0,832 \pm 0,309 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,793); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,764) |

EGCG [50 µM]

| | | | |
|------------|-------------------|--|---|
| CAT-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,724) |
| 1 | 1,085 ± 0,185 | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,015); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,072) |
| 2 | 0,822 ± 0,106 | | |
| GPX1-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,242); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| 1 | 1,438 ± 0,162 *** | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,500); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,106) |
| 2 | 1,127 ± 0,135 | | |
| SOD1-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,013); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 0,686) |
| 1 | 0,860 ± 0,155 | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,443); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,004) |
| 2 | 0,598 ± 0,143 ** | | |

Genistein [20 µM]

| | | | |
|------------|-------------------|--|---|
| CAT-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,034); H-Test: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,105) |
| 1 | 1,084 ± 0,195 | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,101); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,052) |
| 2 | 0,687 ± 0,118 | | |
| 3 | | | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,018); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,005); Post-Hoc-Test U-Test: * (p = 0,029) |
| 3 | 1,664 ± 0,164 * | | |
| GPX1-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,911); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,688) |
| 1 | 1,096 ± 0,148 | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,607); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| 2 | 2,503 ± 0,240 *** | | |
| 3 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,051); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| 3 | 2,434 ± 0,460 *** | | |
| SOD1-Prom. | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,055); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,004) |
| 1 | 1,945 ± 0,491 ** | | |
| 2 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,110); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,001) |
| 2 | 3,025 ± 0,810 *** | | |
| 3 | | | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,096); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| 3 | 1,458 ± 0,156 *** | | |

H₂O₂ [10 µM]

| | | | |
|------------|---|---------------|--|
| CAT-Prom. | 1 | 1,045 ± 0,110 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,315); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,323) |
| | 2 | 0,926 ± 0,135 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,979) |
| | 3 | 0,881 ± 0,242 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,925); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,769) |
| GPX1-Prom. | 1 | 0,965 ± 0,076 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,000); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,020); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 1,000) |
| | 2 | 0,960 ± 0,074 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,242); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,985) |
| | 3 | 0,958 ± 0,064 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,150); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,073) |
| SOD1-Prom. | 1 | 0,928 ± 0,312 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,675); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,565) |
| | 2 | 1,243 ± 0,101 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,013); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 0,200) |
| | 3 | 0,738 ± 0,170 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,280); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,219) |

H₂O₂ [50 µM]

| | | | |
|-----------|---|------------------|--|
| CAT-Prom. | 1 | 1,533 ± 0,232 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,925); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,010) |
|-----------|---|------------------|--|

Natrium-Ascorbat [500 µM]

| | | | |
|------------|---|---------------|--|
| CAT-Prom. | 1 | 0,857 ± 0,165 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,231); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,778) |
| | 2 | 1,005 ± 0,194 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,925); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,004); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 1,000) |
| GPX1-Prom. | 1 | 1,050 ± 0,138 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,242); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,964) |
| | 2 | 0,925 ± 0,209 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,150); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,073) |
| SOD1-Prom. | 1 | 1,005 ± 0,050 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,013); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 0,486) |
| | 2 | 0,691 ± 0,126 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,280); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,219) |

Paraquat [100 µM]

| | | | |
|------------|---|-------------------|---|
| CAT-Prom. | 1 | 0,777 ± 0,053 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,034); H-Test: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,105) |
| | 2 | 1,038 ± 0,189 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,101); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,997) |
| | 3 | 1,274 ± 0,068 * | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,018); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,005); Post-Hoc-Test U-Test: * (p = 0,029) |
| GPX1-Prom. | 1 | 0,664 ± 0,110 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,911); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,008) |
| | 2 | 1,620 ± 0,189 *** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,607); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,001) |
| | 3 | 1,659 ± 0,253 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,051); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,010) |
| SOD1-Prom. | 1 | 2,155 ± 0,308 *** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,055); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,001) |
| | 2 | 2,358 ± 0,691 * | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,110); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test nach Dunnett: * (p = 0,024) |
| | 3 | 1,062 ± 0,156 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,096); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,869) |

Quercetin [10 µM]

| | | | |
|------------|---|-------------------|---|
| CAT-Prom. | 1 | 0,978 ± 0,059 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,034); H-Test: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,105) |
| | 2 | 0,721 ± 0,150 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,101); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,092) |
| | 3 | 1,261 ± 0,120 * | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,018); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,005); Post-Hoc-Test U-Test: * (p = 0,029) |
| GPX1-Prom. | 1 | 1,348 ± 0,127 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,911); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,006) |
| | 2 | 2,055 ± 0,235 *** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,607); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| | 3 | 2,434 ± 0,460 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,051); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,005) |
| SOD1-Prom. | 1 | 2,136 ± 0,266 *** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,055); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,001) |
| | 2 | 2,945 ± 0,683 ** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,110); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ** (p = 0,002) |
| | 3 | 1,090 ± 0,086 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,096); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,666) |

TPA [150 nM]

| | | | |
|------------|---|-------------------|---|
| CAT-Prom. | 1 | 0,686 ± 0,043 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,034); H-Test: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,105) |
| | 2 | 0,637 ± 0,150 * | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,101); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: * (p = 0,021) |
| | 3 | 1,041 ± 0,072 | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,018); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,005); Post-Hoc-Test U-Test: ns (p = 1,000) |
| GPX1-Prom. | 1 | 0,524 ± 0,093 *** | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,911); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: *** (p = 0,000) |
| | 2 | 1,054 ± 0,169 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,607); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,984) |
| | 3 | 1,054 ± 0,097 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,051); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,000); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,995) |
| SOD1-Prom. | 1 | 1,471 ± 0,263 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,055); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,188) |
| | 2 | 1,922 ± 0,542 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,110); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,002); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,155) |
| | 3 | 1,155 ± 0,017 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,096); ANOVA: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,001); Post-Hoc-Test nach Dunnett: ns (p = 0,236) |

Trolox [10 µM]

| | | | |
|------------|---|-----------------|--|
| CAT-Prom. | 1 | 0,922 ± 0,040 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,315); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,323) |
| | 2 | 0,965 ± 0,103 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,817); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,748) |
| | 3 | 1,328 ± 0,130 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,333); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,247) |
| GPX1-Prom. | 1 | 0,425 ± 0,004 * | Levene-Test: Varianzenheterogenität (p = 0,000); H-Test: sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,020); Post-Hoc-Test U-Test: * (p = 0,029) |
| | 2 | 1,125 ± 0,194 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,715); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,365) |
| | 3 | 1,013 ± 0,111 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,526); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,745) |
| SOD1-Prom. | 1 | 0,977 ± 0,074 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,675); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,565) |
| | 2 | 1,154 ± 0,369 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,305); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,383) |
| | 3 | 0,839 ± 0,330 | Levene-Test: Varianzenhomogenität (p = 0,793); ANOVA: keine sign. Unterschiede zw. den Gruppen (p = 0,764) |

Literaturverzeichnis

Aebi H (1984)

Catalase *in vitro*

Methods Enzymol 105: 121-126

Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE (1994)

A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay

J Immunol Methods 170(2): 211-24

Alam J, Cook JL (1990)

Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription

Anal Biochem 188: 245-254

Alía M, Mateos R, Ramos S, et al. (2006)

Influence of Quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2)

Eur J Nutr 45: 19-28

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002)

Molecular biology of the cell

4th ed., New York, NY, Garland Science

Asha Devi S, Vani R, Subramanyam MVV, et al. (2007)

Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C, and carnitine

Cell Biochem Funct 25: 221-231

Banning A, Deubel S, Kluth D, et al. (2005)

The GI-GPx gene is a target for Nrf2

Mol Cell Biol 25(12): 4914-4923

Beckman KB, Ames BN (1998)

The free radical theory of aging matures

Physiol Rev 78(2): 547-581

Benthsath A, Rusznyak S, Szent-Györgyi A (1936)

Vitamin nature of flavones

Nature 138: 798

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. (2007)

Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention

JAMA 297(8): 842-857

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, et al. (2005)

17 β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2^[MAPK]/NF κ B cascade
Aging Cell 4: 113-118

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, et al. (2006)

Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NF κ B
FASEB J 20: E1476-E1481

Bravo L (1998)

Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance
Nutr Rev 56(11): 317-33

Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO (1999)

Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat
Xenobiotica 29(12): 1227-1240

Bremer J (1983)

Carnitine – metabolism and functions
Physiol Rev 63(4): 1420-1480

Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, et al. (1994)

Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays
Anal Biochem 219: 169-181

Chada S, Le Beau MM, Casey L, et al. (1990)

Isolation and chromosomal localization of the human glutathione peroxidase gene
Genomics 6: 268-271

Chan P, Cheng JT, Tsai JC, et al. (2002)

Effect of Catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes
Neurosci Lett 328: 281-284

Chance B, Sies H, Boveris A (1979)

Hydroperoxide metabolism in mammalian organs
Physiol Rev 59: 527-605

Chang MS, Yoo HY, Rho HM (2002)

Transcriptional regulation and environmental induction of gene encoding copper- and zinc-containing superoxide dismutase
Methods Enzymol 349: 293-305

Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, et al. (1998)

Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against Paraquat lethality in transgenic mice
J Nutr 128: 1070-1076

Choi C, Cho H, Park J, et al. (2003)

Suppressive effects of Genistein on oxidative stress and NF κ B activation in RAW 264.7 macrophages

Biosci Biotechnol Biochem 67(9): 1916-1922

Chow JM, Liu JC, Chen YJ, et al. (2002)

The effects of catechin on superoxide dismutase activity and its gene expression in pheochromocytoma cells

Chin Med J (Taipei) 65: 138-143

Clerch LB, Massaro D (1992)

Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA

J Biol Chem 267(5): 2853-2855

Cort WM, Scott JW, Araujo M, et al. (1975)

Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

J Am Oil Chem Soc 52(6): 174-178

Cowan DB, Weisel RD, Williams WG, et al. (1993)

Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene

J Biol Chem 268(36): 26904-26910

Cotelle N (2001)

Role of flavonoids in oxidative stress

Curr Top Med Chem 1: 569-590

Crider QE, Alaupovic P, Johnson BC (1961)

On the function and metabolism of vitamin E: III. Vitamin E and antioxidants in the nutrition of the rat

J Nutr 73: 64-70

Deisseroth A, Dounce AL (1970)

Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role

Physiol Rev 50: 319-375

Dureja H, Kaushik D, Kumar V (2003)

Developments in nutraceuticals

Indian J Pharmacol 35(6): 363-372

Esposito F, Ammendola R, Faraonio R, et al. (2004)

Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence

Neurochem Res 29(3): 617-628

Eum HA, Lee SM (2004)

Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion

Br J Pharmacol 142: 35-42

Evans HM, Bishop KS (1922)

On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction
Science 56: 650-651

Farrington JA, Ebert M, Land EJ, et al. (1973)

Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen: implications for the mode of action of bipyridyl herbicides
Biochim Biophys Acta 314: 372-381

Fenton HJH (1876)

On a new reaction of tartaric acid
Chem News 33: 190-190

Fernholz E (1938)

On the constitution of α -Tocopherol
J Am Chem Soc 60: 700-705

Finkel T, Holbrook NJ (2000)

Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing
Nature 408:239-247

Flohé L, Günzler WA (1984A)

Assays of Glutathione Peroxidase
Methods in Enzymology 105: 114-121

Flohé L, Ötting F (1984B)

Superoxide Dismutase Assays
Methods in Enzymology 105: 93-104

Flohé L, Günzler WA, Schock HH (1973)

Glutathione peroxidase: a selenoenzyme
FEBS Lett 32: 132-134

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977)

One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice
J Natl Cancer Inst 59(1): 221-226

Freshney RI (2000)

Culture of animal cells: a manual of basic technique
4th ed., New York, Wiley-Liss

Fridovich I (1997)

Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters
J Biol Chem 272(30): 18515-18517

Fu Y, Cheng WH, Ross DA, et al. (1999)

Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat (44440)
Proc Soc Exp Biol Med 122(2): 164-169

Glass RH, Ericsson SA, Ericsson RJ, et al. (1991)

The resazurin reduction test provides an assessment of sperm activity
Fertil Steril 56(4): 743

Gluzman Y (1981)

SV40-transformed simian cells support the replications of early SV40 mutants
Cell 23: 175-182

Graham FL, van der Eb AJ (1973)

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
Virology 52: 456-467

Gregory EM, Fridovich I (1973)

Oxygen toxicity and the superoxide dismutase
J Bacteriol 114(3): 1193-1197

de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, et al. (1998)

Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents Paraquat and hydrogen peroxide
J Biol Chem 273(35): 22528-22536

Haber F, Weiss J (1932)

Über die Katalyse des Hydroperoxydes
Naturwiss 51: 948-950

Haber F, Weiss J (1934)

The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts
Proc R Soc Lond A Math Phys Sci 147: 332-351

Harman D (1956)

Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry
J Gerontol 2: 298-300

Harris ED (1992)

Regulation of antioxidant enzymes
FASEB J 6: 2675-2683

Hecker E (1967)

Phorbol esters from croton oil: chemical nature and biological activities
Naturwissenschaften 54(11): 282-284

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, et al. (1993)

Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands
Nutr Cancer 20(1): 21-29

Inal ME, Kahraman A, Köken T (2001)

Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A
Clin Exp Dermatol 26: 536-539

Irat AM, Aktan F, Ozansoy G (2003)

Effects of L-carnitine treatment on oxidant/antioxidant state and vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta

J Pharm Pharmacol 55: 1389-1395

Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, et al. (2003)

Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities

Photodermatol Photoimmunol Photomed 19: 235-241

Kahraman A, Inal ME (2002)

Protective effects of Quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat

J Appl Toxicol 22: 303-309

Kameoka S, Leavitt P, Chang C, et al. (1999)

Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids

Cancer Lett 146: 161-167

Kao PF, Lee WS, Liu JC, et al. (2003)

Downregulation of superoxide dismutase activity and gene expression in cultured rat brain astrocytes after incubation with vitamin C

Pharmacology 69: 1-6

Kerry N, Abbey M (1998)

The isoflavone Genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro

Atherosclerosis 140: 341-347

Kim HT, Kim YH, Nam JW, et al. (1994)

Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase

Biochem Biophys Res Commun 201(3): 1526-1533

Kim YH, Park KH, Rho HM (1996)

Transcriptional activation of the Cu,Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb₂ extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*

J Biol Chem 271(40): 24539-24543

Kondo T, Reaume AG, Huang TT, et al. (1997)

Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia

J Neurosci 17(11): 4180-4189

Krall J, Bagley AC, Mullenbach GT, et al. (1988)

Superoxide mediates the toxicity of Paraquat for cultured mammalian cells

J Biol Chem 263(4): 1910-1914

Krejsa CM, Schieven GL (1998)

Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases
Environ Health Perspect 106(Suppl 5): 1179-1184

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, et al. (2003)

Characterization of mammalian selenoproteomes
Science 300: 1439-1443

Lee CH, Yang L, Xu JZ, et al. (2005)

Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides
Food Chem 90: 735-741

Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, et al. (2003)

Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity
Life Sci 73: 167-179

Lee SJ, Lee KW (2007)

Protective effect of (-)-Epigallocatechin gallate against advanced glycation endproducts induced injury in neuronal cells
Biol Pharm Bull 30(8): 1369-1373

Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, et al. (1985)

Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase
EMBO J 4(1): 77-84

Li YM, Chan HYE, Huang Y, et al. (2007)

Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies
Mol Nutr Food Res 51: 546-554

Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, et al. (1991)

Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase
Proc Natl Acad Sci 88: 4438-4442

de Magalhaes JP, Church GM (2006)

Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences for aging
Exp Gerontol 41(1): 1-10

Maxwell IH, Maxwell F (1988)

Electroporation of mammalian cells with a firefly luciferase expression plasmid: kinetics of transient expression differ markedly among cell types
DNA 7(8): 557-562

McCord JM, Fridovich I (1969)

Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)
J Biol Chem 244: 6049-6055

Mena MA, Khan U, Togasaki DM, et al. (1997)

Effects of wild-type and mutated copper/zinc superoxide dismutase on neuronal survival and L-DOPA-induced toxicity in postnatal midbrain culture

J Neurochem 69: 21-33

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, et al. (1993)

A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates

Clin Sci (London) 84(4): 407-412

Minc E, de Coppet P, Masson P, et al. (1999)

The human copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites

J Biol Chem 274(1): 503-509

Moscow JA, Morrow CS, He R, et al. (1992)

Structure and function of the 5'-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene (*hgp1*)

J Biol Chem 267(9): 5949-5958

Nakao M, Takio S, Ono K (1998)

Alkyl peroxy radical-scavenging activity of catechins

Phytochemistry 49(8): 2379-2382

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, et al. (1989)

Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene

Gene 79: 279-288

Nenoi M, Ichimura S, Mita K, et al. (2001)

Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells

Cancer Res 61: 5885-5894

Neurath M, Ma X, Pettersson S (1997)

DNA/Protein-Interaktionen

Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.

Noda Y, Anzai K, Mori A, et al. (1997)

Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system

Biochem Mol Biol Int 42(1): 35-44

Organization for Economic Co-operation and Development, OECD (1997)

In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test

OECD guidelines for the testing of chemicals 473: 1-10

Orr WC, Sohal RS (1992)

The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*

Arch Biochem Biophys 297(1): 35-41

Park EY, Rho HM (2002)

The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element

Mol Cell Biochem 24: 47-55

Parkes TL, Kirby K, Phillips JP, et al. (1998)

Transgenic analysis of the cSOD-null phenotypic syndrome in *Drosophila*

Genome 41: 642-651

Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, et al. (2001)

Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging

Free Radic Biol Med 31: 1570-1581

Pauling L (1970)

Evolution and the need for ascorbic acid

Proc Natl Acad Sci 67(4): 1643-1648

Pietta PG (2000)

Flavonoids as antioxidants

J Nat Prod 63: 1035-1042

Promega (2006)

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

Technical manual TM040

Promega (2007)

pGL3 Luciferase Reporter Vectors

Technical manual TM033

Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, et al. (1986)

Isolation and characterization of the human catalase gene

Nucleic Acids Res 14(13): 5321-5335

Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, et al. (1979)

Epithelioid cell cultures from rat small intestine

J Cell Biol 80: 248-265

Rajasekar P, Anuradha CV (2007)

Effect of L-carnitine on skeletal muscle lipids and oxidative stress in rats fed high-fructose diet

Exp Diabetes Res: 72741

Ramiro-Puig E, Urpí-Sardà M, Pérez-Cano FJ, et al. (2007)

Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats

J Agric Food Chem 55: 6431-6438

Raschke M, Rowland IR, Magee PJ, et al. (2006)

Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress
Carcinogenesis 27(11): 2322-2330

Robbins E, Scharff MD (1967)

The absence of a detectable G1 phase in a cultured strain of Chinese hamster lung cell
J Cell Biol 34(2): 684-686

Röhrdanz E, Obertriffter B, Ohler S, et al. (2000)

Influence of Adriamycin and Paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes
Arch Toxicol 74: 231-237

Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, et al. (2002)

The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells
J Nutr 132: 370-375

Röhrdanz E, Bittner A, Tran-Thi QH, et al. (2003)

The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells
Arch Toxicol 77: 506-510

Rushmore TH, Kong ANT (2002)

Pharmacogenomics, regulation and signalling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes
Curr Drug Metab 3: 481-490

Rusznayk S, Szent-Györgyi A (1936)

Vitamin P: flavonols as vitamins
Nature 138: 27-68

Sadi G, Yilmaz Ö, Güray T (2007)

Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase
Mol Cell Biochem 309(1-2): 109-116

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. (2005)

The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics
Cell Biol Toxicol 21: 1-26

Sambrook J, Russell DW (2001)

Molecular cloning: a laboratory manual
3rd ed., Cold Spring Harbor, Laboratory Press

Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, et al. (2001)

Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology
Cell Biol Toxicol 17: 301-317

Sato K, Ito K, Kohara H, et al. (1992)

Negative regulation of the catalase gene expression in hepatoma cells
Mol Cell Biol 12(6): 2525-2533

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, et al. (2005)

Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria
Science 308: 1909-1911

Schulze Pröbsting K, Müller C, Wiencierz AM, et al. (2007)

Establishment of a test platform to analyze the antioxidative and cancer-preventive potential of individual food constituents and food extracts
Poster *NutIntest 07* Kaiserslautern

Scott JW, Cort WM, Harley H, et al. (1974)

6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants
J Am Oil Chem Soc 51(5): 200-203

Sen CK, Packer L (1996)

Antioxidant and redox regulation of gene transcription
FASEB J 10: 709-720

Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, et al. (1996)

Dual-LuciferaseTM Reporter Assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays
Promega Notes Magazine 57: 2

Spielmann H (2004)

In-vitro-Methoden

In: Lehrbuch der Toxikologie (Marquardt H, Schäfer SG, Hrsg.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; S. 1197-1208

Stevens TM, Boswell GA Jr, Adler R, et al. (1988)

Induction of antioxidant enzyme activities by a phenylurea derivative, EDU
Toxicol Appl Pharmacol 96(1): 33-42

Stewart CL, Schuetze S, Vanek M, et al. (1987)

Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection
EMBO J 6(2): 383-388

Suzuki K, Koike H, Matsui H, et al. (2002)

Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3
Int J Cancer 99: 846-852

Svirbely JL, Szent-Györgyi A (1932)

The chemical nature of vitamin C
Biochem J 26(3): 865-870

Takeuchi T, Nakamura S, Kayasuga A, et al. (2000)

Multiple elements for negative regulation of the rat catalase gene expression in dedifferentiated hepatoma cells

J Biochem 128: 1025-1031

Tan M, Li S, Swaroop M, et al. (1999)

Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53

J Biol Chem 274(17): 12061-12066

Taniguchi M, Hashimoto M, Hori N, et al. (2005)

CCAAT/enhancer binding protein- β (C/EBP- β), a pivotal regulator of the TATA-less promoter in the rat catalase gene

FEBS Lett 579: 5785-5790

Tein I, Bukovac S, Xie ZW (1996)

Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts

Arch Biochem Biophys 329(2): 145-155

Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, et al. (2003)

Effects of the phenolic contents of Mauritanian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes

Free Radic Res 37(11): 1215-1224

Vina J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C (2007)

Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation?

Br J Nutr 98(Suppl 1): S36-S40

Wagner EF, Vanek M, Vennström B (1985)

Transfer of genes into embryonal carcinoma cells by retrovirus infection: efficient expression from an internal promoter

EMBO J 4(3): 663-666

Walter ED (1941)

Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, Genistein, from soybeans

J Am Oil Chem Soc 63: 3273-3276

Walz E (1931)

Isoflavon und saponin-glucoside in *Soja hispida*

Justus Liebigs Ann Chem 498: 118-155

Wang X, McCullough KD, Franke TF, et al. (2000)

Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival

J Biol Chem 275(19): 14624-14631

de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, et al. (1985)

Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*

Proc Natl Acad Sci 82: 7870-7873

White CW, Avraham KB, Shanley PF, et al. (1991)

Transgenic mice with expression of elevated levels of copper-zinc superoxide dismutase in the lungs are resistant to pulmonary oxygen toxicity

J Clin Invest 87: 2162-2168

Wilkening S, Bader A (2003)

Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2

J Biochem Mol Toxicol 17: 207-213

Wilson T, March H, Ban WJ, et al. (2002)

Antioxidant effects of phyto- and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro

Life Sci 70: 2287-2297

Witting LA, Horwitt MK (1964)

Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria

J Nutr 82: 19-33

Wood KV, de Wet JR, Dewji N, et al. (1984)

Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns

Biochem Biophys Res Commun 124(2): 592-596

Yagi K (1976)

A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma

Biochem Med 15: 212-216

Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, et al. (2003)

Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells

J Pharmacol Exp Ther 307(1): 230-236

Yen GC, Lai HH (2002)

Inhibitory effects of isoflavones on nitric oxide- or peroxynitrite-mediated DNA damage in RAW 264.7 cells and ϕ X174 DNA

Food Chem Toxicol 40: 1433-1440

Yin D (1995)

Appropriate excitation/emission wavelengths for fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances

Clin Chem 41(2): 329-330

Yoneda T, Hiramatsu M, Sakamoto M, et al. (1995)

Antioxidant effects of „ β -catechin“

Biochem Mol Biol Int 35(5) 995-1008

Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999A)

Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid

Gene 234: 87-91

Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999B)

The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element

J Biol Chem 274(34): 23887-23892

Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999C)

Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element

Mol Gen Genet 262(2): 310-313

Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999D)

Xenobiotic-responsive element for the transcriptional activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene

Biochem Biophys Res Commun 256(1): 133-137

Younes M (2004)

Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies

In: Lehrbuch der Toxikologie (Marquardt H, Schäfer SG, Hrsg.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart; S. 117-131

Yu BP (1994)

Cellular defenses against damage from reactive oxygen species

Physiol Rev 74(1): 139-161

Zhou LZH, Johnson AP, Rando TA (2001)

NF κ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells

Free Radic Biol Med 31(11): 1405-1416

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Dr. Pablo Steinberg für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie seine intensive Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich meinen Betreuern Dr. Kristina Ullmann und Carsten Müller für die wissenschaftliche Anleitung, Einarbeitung und Weitergabe von Erfahrungen danken. Sie haben mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Besonderer Dank geht an Dr. Andreas Steege (Institut für Vegetative Physiologie, Charité Berlin) für die Unterstützung bei der Klonierung sowie an Dr. habil. Frank Neuschäfer-Rube (Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam) für die Unterstützung bei der Transformation. Beide waren zudem wertvolle Ansprechpartner bzgl. ihrer Erfahrung mit Reporter-gen-Assays.

Mein herzlicher Dank gilt den weiteren Mitarbeitern der Abteilung Ernährungstoxikologie Dr. Bettina Scholtka, Dr. René Thierbach, Dr. Anja Voigt, Urte Blume, Gunnar Drewes, Mandy Schneider, Katharina Wolfrum, Babette Wagenhaus, Marie Sittig, Uschi Gruber, Monika Haseloff, Ingrid Zschaler und Heidi Mahler für die sympathische Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei meiner Familie, meinen Freunden und meinen Mitbewohnern für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und ohne Zuhilfenahme unerlaubter Mittel angefertigt habe.

Anne Maria Wiencierz