

**Ist Ergothionein der physiologische
Singulett-Sauerstoff-Quencher?**

**Analyse des Ergothioneinschutzes in 293 Zellen
und
Identifizierung der *in vitro* Reaktionsprodukte**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christopher Stoffels

aus Mechernich

Köln, 2018

Berichterstatter:

Prof. Dr. Ines Neundorf

Prof. Dr. Olaf Utermöhlen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
1 Einleitung	14
1.1 Ergothionein.....	14
1.1.1 Struktur und Vorkommen von Ergothionein.....	14
1.1.1 Ergothionein-Transporter.....	15
1.1.2 Physiologische Relevanz von Ergothionein.....	16
1.1.3 Reaktion von Ergothionein.....	17
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies.....	18
1.2.1 Eigenschaften und Reaktionen von Singulett-Sauerstoff.....	19
1.2.2 Intrazelluläre Entstehung von $^1\text{O}_2$	24
1.3 Generierung von $^1\text{O}_2$ in Zellen.....	25
1.3.1 Photosensibilisatoren.....	25
1.3.2 DHPNO ₂	26
1.4 Indikatoren für $^1\text{O}_2$ -Schaden.....	27
1.5 Ziel der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	30
2.1.3 Kits.....	31
2.1.4 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Zelllinien.....	31
2.1.5 Plasmid und Expressionssystem pEBTetD.....	32
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.1 Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	33
2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien und Transformation.....	34
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.3.1 Mutagenese Kit.....	35
2.3.2 Plasmid-Präparation (Mini und Maxi).....	36
2.3.3 Restriktionsanalyse.....	36

Inhaltsverzeichnis

2.3.4	Gelelektrophorese.....	37
2.3.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	38
2.3.6	DNA-Sequenzierung	38
2.4	Zellbiologische Methoden	39
2.4.1	Kultivierung und Passage von 293 Zellen.....	39
2.4.2	Transfektion von 293 Zellen	39
2.4.3	Aussaat von 293 Zellen	40
2.4.4	Zellaufschluss.....	41
2.4.5	Proteinbestimmung mit BCA-Kit.....	42
2.5	Generierung von $^1\text{O}_2$ in 293 Zellen	43
2.5.1	ReAsH.....	43
2.5.2	TMPyP & Bengal Rosa	45
2.5.3	Einfluss von Doxycyclin auf die Methionin-Sulfoxid-Bildung	47
2.5.4	$^1\text{O}_2$ -Generierung mit DHPNO ₂	48
2.6	Potentielle Indikatormoleküle für $^1\text{O}_2$	49
2.6.1	Gezielte $^1\text{O}_2$ -Indikatorsuche	49
2.6.2	Ungerichtete $^1\text{O}_2$ -Indikatorsuche.....	50
2.6.3	TEMP, TEMPO.....	50
2.7	Inhibition der Methionin-Sulfoxid-Reduktase durch Iodoacetamid.....	51
2.8	Minimierung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quenchern.....	52
2.8.1	Ascorbinsäure.....	52
2.8.2	Glutathion.....	53
2.9	Herstellung von Hercynin.....	55
2.10	<i>In vitro</i> Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Ergothionein oder Hercynin.....	56
2.11	Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie.....	57
2.11.1	Aufbau und Arbeitsweise eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers.....	58
2.11.2	Fullscan	61
2.11.3	Differenzabtönung.....	63
2.11.4	Tunemodus und Methodenoptimierung	63
2.11.5	Produktionenscan	64
2.11.6	Selected Reaction Monitoring	64
2.11.7	Ionenfalle (MS^3).....	69
2.11.8	Akkurate Massenmessung.....	69
2.12	Statistische Methoden	70

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	71
3.1	Intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung mit Photosensibilisatoren	72
3.1.1	ReAsH	72
3.1.2	Bengal Rosa.....	75
3.1.3	TMPyP	78
3.2	$^1\text{O}_2$ -Generierung mit Hilfe von DHPNO ₂	81
3.2.1	<i>In vitro</i> Funktionalitätsprüfung von DHPNO ₂	81
3.2.2	Intrazellulär $^1\text{O}_2$ -Generierung mit DHPNO ₂	82
3.2.3	Doxycyclineinfluss auf die intrazelluläre Methionin-Sulfoxidkonzentration	83
3.3	Identifizierung von $^1\text{O}_2$ -Indikatoren	85
3.3.1	Testung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Indikatoren.....	85
3.3.2	Testung von TEMP als $^1\text{O}_2$ -Indikator	88
3.4	Versuch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase mit Iodoacetamid zu inhibieren	90
3.5	Minimierung intrazellulärer $^1\text{O}_2$ -Quencher	91
3.5.1	Ascorbinsäure.....	92
3.5.2	Glutathion.....	93
3.6	$^1\text{O}_2$ -Generierung durch DHPNO ₂ mit minimierten Glutathion in 293-Zellen.....	95
3.7	Intrazellulärer $^1\text{O}_2$ -Quenchvergleich von Ergothionein und Glutathion	96
3.8	Reaktion von Ergothionein und Hercynin mit $^1\text{O}_2$ <i>in vitro</i> und in 293 Zellen	101
3.8.1	Synthese von Hercynin.....	102
3.8.2	Fullscananalyse der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Ergothionein	103
3.8.3	Fragmentierungen der Ergothionein- und Hercyninprodukte	106
3.8.3.1	Fragmentierungen der Ergothioneinprodukte.....	107
3.8.3.2	Fragmentierungen der Hercyninprodukte.....	110
3.8.3.3	Fragmentierung der <i>m/z</i> 288 und 77	113
3.8.4	Ergothionein- und Hercyninprodukte in Abhängigkeit von $^1\text{O}_2$	115
3.8.5	Charakterisierung der Ergothionein- und Hercyninprodukte in TRIS	117
3.8.5.1	Bildung der Hercyninprodukte in TRIS über die Zeit	120
3.8.5.2	Bildung der Ergothioneinprodukte in TRIS über die Zeit	121
3.8.6	Charakterisierung der Ergothioneinprodukte in Ascorbinsäure.....	125
3.8.7	Charakterisierung der Ergothionein- und Hercyninprodukte in Glutathion.....	128
3.8.7.1	Bildung der Hercyninprodukte in GSH über die Zeit.....	131
3.8.7.2	Bildung der Ergothioneinprodukte in GSH über die Zeit.....	132

Inhaltsverzeichnis

3.8.8	Identifizierung der Ergothioneinprodukte in 293 Zellen.....	136
3.8.9	Zusammenfassung der Ergothionein- und Hercyninprodukte	138
4	Diskussion	140
4.1	Intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung in Gegenwart von Ergothionein.....	140
4.1.1	ReAsH.....	141
4.1.2	Bengal Rosa.....	142
4.1.3	TMPyP	143
4.1.4	Vergleich der PST ReAsH, Bengal Rosa und TMPyP.....	143
4.1.5	DHPNO ₂	147
4.2	Identifikation von $^1\text{O}_2$ -Indikatormolekülen	148
4.3	Minimierung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quenchern.....	150
4.4	Vergleich Ergothionein und Glutathion als intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Quencher	153
4.5	Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Ergothionein und Hercynin <i>in vitro</i> und in 293 Zellen	154
4.5.1	$^1\text{O}_2$ -Reaktion am Schwefel von Ergothionein	156
4.5.2	Unterschiede in der $^1\text{O}_2$ -Reaktion mit Ergothionein und Hercynin	158
4.6	Ausblick.....	169
5	Zusammenfassung	170
6	Abstract	171
7	Literaturverzeichnis	172
8	Anhang	183
	Danksagung	184
	Erklärung	185

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett Sauerstoff
$^3\text{O}_2$	Triplett-Sauerstoff
Aa	Ammoniumacetat
Acn	Acetonitril
Af	Ammoniumformiat
Ams	Ameisensäure
ASC	Ascorbinsäure
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovine Serum Albumine
BSO	Buthioninsulfoximin
CALI	Chromophore-assisted light inactivation
CE	Kollisionsenergie
cps	Counts per second
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DEM	Diethylmaleat
DHPN	N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid
DHPNO ₂	DHPN 1,4-Endoperoxid
DHS	Dehydroascorbinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Doxy	Doxycyclin
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EBNA	Epstein-Barr Nuclearantigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Ess	Essigsäure

Abkürzungsverzeichnis

ET	Ergothionein
ETT	Ergothionein Transporter
FCS	Fetales Kälberserum
FS	Fullscan
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GS-TNB	Glutathion-Thiobis-2-nitrobenzoesäure
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293 Zellen
HER	Hercynin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KDL	Kinase, Ligase und DpnI
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit
LB	Luria Bertani Medium
LC-MS	Fullscan (HPLC gekoppelt mit MS(Q1))
LC-MS/MS	Selected Reaction Monitorig (HPLC gekoppelt mit MS (Q1-Q3))
LC-MS ²	Produktionenscan (HPLC gekoppelt mit MS (bis Fragmentierungszelle)
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
MCS	Multiple Cloning Site (Polylinker)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
MS ³	Ionenfalle
MSO	Methionin- Sulfoxid
MSR	Methionin-Sulfoxid-Reduktase
NDMOL	1,4-Naphthalendimethanol
NDP	3,3'-(1,4-Naphtyl)-Dipropionsäure
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NT	nicht Transfiziert
PBS	Phosphate buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PST	Photosensibilisatoren

Abkürzungsverzeichnis

RB	Bengal Rosa
ReAsH	4,5-Bis(1,3,2-dithiarsolan-2-yl)-resorufin
Ret	Retentionszeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SLC	Solute carrier
SRM	Selected Reaction Monitoring
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TC	Tetracysteinmotiv
TEMP	2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon- <i>N</i> -oxyl
TEMPOH	2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon- <i>N</i> -hydroxylamin
TetR	tetracycline repressor
TMPyP	Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat
TNB	Thiobis-2-nitrobenzoesäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	atomare Masseneinheit
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ET-Strukturformel in Thion- und Thiolform	14
Abbildung 2: Real-Time-PCR-Analyse von ETT mRNA im Menschen und ET-Gehalt in Geweben des Zebrafisch Wild-Typs und ETT Knockout	16
Abbildung 3: Lebensdauer, Reaktivität und Diffusionsstrecke der einzelnen ROS	19
Abbildung 4: Reaktionsmechanismus einer Schenk-En-Reaktion von $^1\text{O}_2$	20
Abbildung 5: Erzeugung von Endoperoxiden durch $^1\text{O}_2$ über eine [4+2] Cycloaddition.....	21
Abbildung 6: Reaktionsmechanismus von $^1\text{O}_2$ über eine [2+2] Cycloaddition	21
Abbildung 7: Elektronentransferreaktion von ASC und $^1\text{O}_2$	22
Abbildung 8: Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Desoxyguanin	23
Abbildung 9: Reaktionstypen von Photosensibilisatoren.	24
Abbildung 10: Strukturformel der Photosensibilisatoren BR, ReAsH und TMPyP.....	25
Abbildung 11: Die Reaktion von ROS mit Methionin	27
Abbildung 12: $^1\text{O}_2$ -Reaktion von TEMP zu TEMPO mit weiterer Reduktion zu TEMPOH. 28	
Abbildung 13: Schematische Darstellung des pEBTetD-Vektors	33
Abbildung 14: Versuchsaufbau der Belichtung von BR gefärbten Zellen	45
Abbildung 15: Versuchsaufbau der Belichtung von TMPyP gefärbten Zellen	47
Abbildung 16: Chemische Struktur von Buthioninsulfoximin und Reaktion von GSH mit Diethylmaleat	54
Abbildung 17: Strukturformel von Hercynin.....	55
Abbildung 18: Elektrospray-Ionisation.....	59
Abbildung 19: Flugbahn eines Ions durch einen Massenquadrupolfilter	60
Abbildung 20: Aufbau eines Massenspektrometers	61
Abbildung 21: MSO- und ET-Konzentration in Zelllysaten von ETT(+/-) Zellen nach $^1\text{O}_2$ -Generierung durch Belichtung des ReAsH-Tetracystein-Proteinkomplexes	73
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293 Zellen mit und ohne TC ..	74
Abbildung 23: Zeitverlauf von $^1\text{O}_2$ -gestressten ETT(+/-) Zellen generiert durch Belichtung von BR.....	76
Abbildung 24: MSO- und ET-Konzentration in ETT(+/-) Kontrollzelllysaten nach zellulärer $^1\text{O}_2$ -Generierung durch BR-Belichtung.....	77
Abbildung 25: Zeitverlauf von $^1\text{O}_2$ -gestressten ETT(+/-) Zellen generiert durch TMPyP-Belichtung.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: MSO- und ET-Konzentration in ETT(+/-) Kontrollzelllysaten nach ¹ O ₂ -Generierung durch TMPyP-Belichtung.....	80
Abbildung 27: <i>in vitro</i> Funktionalitätsprüfung von DHPNO ₂	81
Abbildung 28: MSO-Konzentration in ETT(+/-) Zellen nach DHPNO ₂ -Stress.....	83
Abbildung 29: Einfluss von Doxycycline auf die Generierung von MSO.....	84
Abbildung 30: Differenzabtönungsbild der ¹ O ₂ -Reaktion mit Histidin.....	86
Abbildung 31: Fragmentmuster von Histidin und <i>m/z</i> 188.....	87
Abbildung 32: Etablierung des ¹ O ₂ -Histidin-Produkts <i>m/z</i> 188 als ¹ O ₂ -Indikator	88
Abbildung 33: Etablierung von TEMP als intrazellulären ¹ O ₂ -Indikator.....	89
Abbildung 34: ET-Intensität nach Iodoacetamidbehandlung in 293 Zellen.....	91
Abbildung 35: ASC- und DHS-Konzentration in 293 Zellen nach Ni(II)Cl ₂ , Co(II)SO ₄ oder TEMPO Behandlung.....	93
Abbildung 36: Prozentuale GSH- und ET-Menge nach Minimierung von intrazellulären GSH durch BSO und DEM	94
Abbildung 37: MSO-Konzentration in ETT(+/-) Zellen mit minimierten GSH-Mengen nach DHPNO ₂ -Stress.....	96
Abbildung 38: Vergleich des intrazellulären ¹ O ₂ -Quenchverhaltens von ET und GSH.....	98
Abbildung 39: ET-Konzentration über die Zeit in ETT(+/-) Zellen mit und ohne GSH.....	99
Abbildung 40: Vergleich der ET- und GSH-Ausgangskonzentrationen	100
Abbildung 41: Analytische Dünnschichtchromatographie der HER-Synthese	102
Abbildung 42: Differenzabtönungsbild der ¹ O ₂ + ET-Reaktion in H ₂ O.....	103
Abbildung 43: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterung von ET und dessen Fragmenten..	107
Abbildung 44: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von <i>m/z</i> 246:143, 262, 264, ET-Sulfonsäure (<i>m/z</i> 278), ET-Disulfid (<i>m/z</i> 229) und <i>m/z</i> 493 sowie dessen Fragmenten ..	109
Abbildung 45: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von HER, <i>m/z</i> 214, 230:153, 230:171, 246:229 und 248 sowie dessen Fragmenten.....	112
Abbildung 46: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von <i>m/z</i> 288 und 77 sowie dessen Fragmenten.....	114
Abbildung 47: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit ET und unterschiedlichen DHPNO ₂ -Konzentrationen in 5 mM TRIS	116
Abbildung 48: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von <i>m/z</i> 333, 349, 365:230 und 365:244 sowie dessen Fragmenten.....	118
Abbildung 49: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von HER-Produkten in Ansätzen mit ¹ O ₂ und HER in Abhängigkeit von TRIS	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 50: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit $^1\text{O}_2$ und ET in Abhängigkeit von TRIS.....	122
Abbildung 51: Relative m/z 365:244- und 365:230-Intensitäten in Ansätzen mit ET und $^1\text{O}_2$ in Abhängigkeit unterschiedlicher TRIS- oder GSH-Konzentrationen	125
Abbildung 52: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von ET- und HER-Produkten in Ansätzen mit ET und $^1\text{O}_2$ in Abhängigkeit von ASC.....	126
Abbildung 53: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von m/z 519, 535, 551 und 553 sowie dessen Fragmenten.....	130
Abbildung 54: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von HER-Produkten in Ansätzen mit $^1\text{O}_2$ und HER in Abhängigkeit von GSH	131
Abbildung 55: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit $^1\text{O}_2$ und ET in Abhängigkeit von GSH.....	133
Abbildung 56: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in 293 Zellen mit und ohne ET bzw. GSH	137
Abbildung 57: Strukturformel von Hercynin und Histidin.....	158

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kit - Systeme 31

Tabelle 2: Bakterienstämme 31

Tabelle 3: Oligonukleotide 32

Tabelle 4: Zellkulturmedien 39

Tabelle 5: HPLC-Säulen 58

Tabelle 6: HPLC-Konditionen für Fullscananalysen 62

Tabelle 7: Analyse der Substanzen im Massenspektrometer mittels SRM..... 67

Tabelle 8: MSO- und ET-Konzentrationen in Zelllysaten von ReAsH inkubierten ETT Zellen über die Belichtungszeit von 20 Minuten. 73

Tabelle 9: MSO- und ET-Konzentrationen über die Zeit in Zelllysaten von BR inkubierten ETT Zellen über die Belichtungszeit von 5 Minuten. 76

Tabelle 10: MSO- und ET-Konzentrationen in Kontrollzelllysaten von BR inkubierten ETT Zellen mit einer Belichtungszeit von 3 Minuten. 77

Tabelle 11: MSO- und ET-Konzentrationen über die Zeit in Zelllysaten von TMPyP inkubierten ETT Zellen über die Belichtungszeit von 20 Minuten..... 79

Tabelle 12: M MSO- und ET-Konzentrationen in Kontrollzelllysaten von TMPyP inkubierten ETT Zellen mit einer Belichtungszeit von 20 Minuten..... 80

Tabelle 13: MSO-Konzentrationen in ETT Zelllysaten von verschieden DHPNO₂- und ETT-behandelten Zellen in zwei unterschiedlichen Experimenten. 83

Tabelle 14: MSO-Konzentrationen in 293 + pEBTetD/SLC22A11 Zelllysaten nach verschiedener Doxycyclin- und Belichtungsbehandlungen der 293 Zellen. 85

Tabelle 15: MSO-, ET-Konzentrationen und TEMPO- und TEMPOH-Intensität in Zelllysaten von ETT Zellen mit Unterschiedlichen TEMP- und ETT-Bedingungen. 90

Tabelle 16: ET-Intensität in ETT Zelllysaten nach unterschiedlichen TMPyP-, Iodoacetamid- und Lichtbehandlungen der 293 Zellen..... 91

Tabelle 17: ASC- und DHS-Konzentration in Zelllysaten nach Behandlung der Zellen mit Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄ oder TEMPO 93

Tabelle 18: Prozentuale intrazelluläre GSH- und ET-Mengen in Zelllysaten nach verschiedenen BSO- und DEM-Behandlungen der Zellen 95

Tabelle 19: MSO-Konzentrationen in Zelllysaten von zwei unterschiedlichen Experimenten nach verschiedenen DHPNO₂- und ETT-Bedingungen von GSH-minimierten 293 Zellen. ... 96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 20: MSO-Konzentration in Zelllysaten von Effekt- und Kontrollzellen ohne Licht oder ohne TMPyP-Behandlung mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-)	98
Tabelle 21: ET-Konzentration in Zelllysaten von Effektzellen und Kontrollzellen ohne Licht- oder ohne TMPyP-Behandlung mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-).....	99
Tabelle 22: ET- und GSH-Anfangskonzentrationen in Zelllysaten von Zellen mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-).	101
Tabelle 23: Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER	105
Tabelle 24: PST-Vergleich bezüglich Behandlung, Ergebnisse aus den Zellexperimenten und hieraus berechnete Effizienz- und Schutz-Faktoren.....	145

1 Einleitung

1.1 Ergothionein

Ergothionein (ET) wurde erstmals 1909 als Molekül im Mutterkorn beschrieben, aber dessen physiologische Relevanz ist bis heute nicht eindeutig geklärt [1]. Neueste wissenschaftliche Erkenntnisse sehen ET sogar als mögliches Vitamin [2]. Interessanterweise sind Polymorphismen mit dem Ergothionein-Transporter (ETT), als Aufnahmesystem für ET, mit chronischen Entzündungskrankheiten, wie z. B. rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Typ-1-Diabetes und Gicht, assoziiert [3, 4]. Dennoch ist die Funktion von ET noch nicht zweifelsfrei bewiesen.

1.1.1 Struktur und Vorkommen von Ergothionein

Die Struktur des ETs basiert auf der Betainstruktur der Aminosäure Histidin mit einem Schwefelatom an der Position 2 des Imidazolrings. Es kommt als Thion-Thiol-Gleichgewicht vor, wobei unter physiologischen Bedingungen die Thionform überwiegt (Abbildung 1) [5].

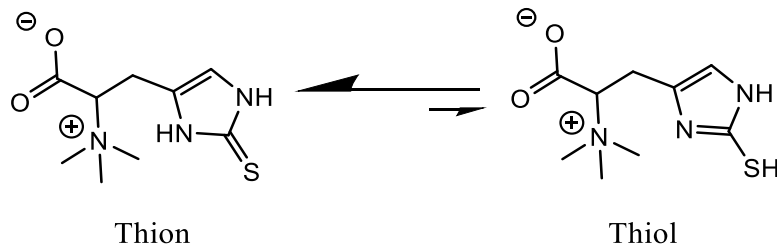


Abbildung 1: ET-Strukturformel in Thion- (links) und Thiolform (rechts). Unter physiologischen Bedingungen dominiert fast ausschließlich die Thionform.

Ein Vergleich von ET mit anderen schwefelhaltigen Antioxidantien der Zelle, wie Glutathion (GSH), zeigt einige Unterschiede auf. Diese Unterschiede könnten Aufschluss über mögliche Funktionen und Nutzen von ET für die Zelle geben. Die physiologische Thionform ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen intrazellulären schwefelhaltigen Molekülen wie Cystein und GSH. Durch diese besondere Form kommt es beim ET nicht zur Autoxidation unter physiologischen Bedingungen wie beim GSH [6]. Die freie Energie der Reduktion von ET zu ET-Disulfid ist niedriger als die von anderen Alkyldisulfiden, wodurch die Thionform thermodynamisch stabiler ist [7, 8].

Einleitung

Ein weiterer Unterschied zwischen ET und GSH ist, dass Säugetiere ET nicht selbst synthetisieren können, sondern aus der Nahrung aufnehmen müssen. Im Gegensatz zu Säugetieren sind einige Pilze [9, 10], Cyanobakterien [11] und einige Mykobakterien [12] in der Lage ET zu synthetisieren. Daher beinhalten manche Pilze oder auch Spirulina-Präparate ET-Konzentrationen von 0,1 - 2 mg/g Trockenmasse [9].

GSH ist ubiquitär in den Zellen des menschlichen Körpers verteilt. Ein Blick auf die ET-Verteilung zeigt Konzentrationen von 100 μM bis zu 2 mM nur in bestimmten Zellen und Geweben [13-15]. Die höchsten Konzentrationen wurden hierbei in Erythrozyten, fötale Leber, Seminalplasma, Knochenmark, Linsen und Hornhaut des Auges sowie in den Nieren gefunden. Die Resorption von ET aus der Nahrung findet im Dünndarm statt und die Niere ist für die Rückgewinnung des ETs verantwortlich. Auffällig ist, dass Organe mit hohem ET-Gehalt meist mit starkem oxidativen Stress belastet sind. Daher weist ET möglicherweise eine antioxidative Funktion auf.

1.1.1 Ergothionein-Transporter

ET kann als physiologisches geladenes Betain die Zellmembran nicht passieren. Daher ist ein Transporteraufnahmesystem notwendig. Der Ergothionein-Transporter (ETT, *SLC22A4*) wurde erstmals von Gründemann *et al.* charakterisiert [16]. Demnach ist der ETT ein 551 Aminosäuren großes Membranprotein aus der Solute-Carrier (SLC)-Familie 22. Der ETT ist für das Substrat ET hochspezifisch und hat einen K_m -Wert von 20 μM . Des Weiteren handelt es sich um einen Na^+ -gradientengetriebenen Cotransport.

Beim Vergleich der bereits erwähnten Organe mit dem Expressionsprofil des ETT zeigt dieser eine klare Korrelation bezüglich der ET-Konzentration (Abbildung 2, rechts). ETT-exprimierende Zellen haben einen um den Faktor 85 höheren ET-Gehalt verglichen zu nicht ETT-exprimierende Zellen [16].

Dass ohne ETT-Expression nahezu kein ET in die Zelle gelangt, wurde auch anhand von Modellorganismen wie dem Zebrafisch gezeigt (Abbildung 2, links) [17]. Hierbei wurde der ET-Gehalt von gesunden Kontrolltieren mit dem von ETT-Knockout-Tieren verglichen. Erhöhte ET-Gehalte konnten im Dünndarm, Niere, Auge, Leber und Gehirn der Kontrolltiere gefunden werden, wohingegen kaum ET in den Mutanten gemessen wurde. Des Weiteren ist ETT nicht nur in Säugetieren und Zebrafischen vertreten, sondern in allen Vertebraten [18]. Es handelt sich folglich um ein hoch konserviertes Protein. Invertebraten wie Insekten oder

Einleitung

Nematoden weisen keine ETT-Expression auf. Die Konservierung über die verschiedenen Spezies legt nahe, dass die ETT-Expression, und damit einhergehend auch zelluläre ET-Aufnahme, einen erheblichen evolutionären Vorteil mit sich bringt.

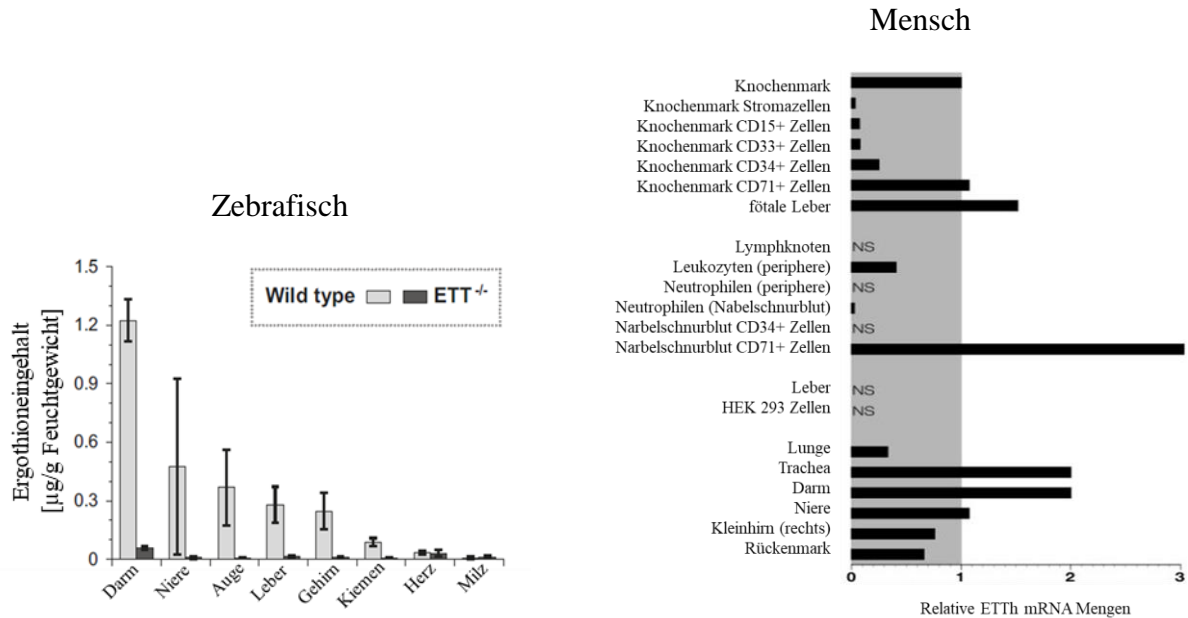


Abbildung 2: Real-Time-PCR-Analyse von ETT mRNA im Menschen und ET-Gehalt in Geweben des Zebrafisch Wild-Typs und ETT Knockout. Links: Vergleich des ET-Gehalts in Zebrafisch Geweben des Wild-Typs und der ETT-Knockout-Mutante (n = 2 oder 3; Mittelwert \pm SEM). Modifiziert nach [17]. Rechts: Relatives Expressionsprofil vom ETT in den ausgewählten Organen bzw. Geweben in Bezug zur mRNA-Menge des Knochenmarks. Modifiziert nach [16]; NS = kein Signal.

1.1.2 Physiologische Relevanz von Ergothionein

Die physiologische Relevanz von ET ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In der Literatur sind Erklärungsansätze zur ET-Funktion beschrieben. Es wurde gezeigt, dass ET vor Lipidperoxidation schützt [19]. Des Weiteren soll ET für die Reduktion von Ferrylmyoglobin verantwortlich sein [20]. Zhu *et al.* haben die schützende ET-Wirkung gegenüber Kupfer-induziertem oxidativen DNA- und Proteinschaden beschrieben, wobei eine Kupferinaktivierung durch Bildung von Kupfer-ET-Komplexen stattfindet [21]. ETT-Knockout-Mausstudien von nicht spezifisch gestressten Mäusen ergaben keine neuen Erkenntnisse zu der physiologischen ET-Funktion [22].

Die in der Literatur am häufigsten postulierte Annahme über die physiologische ET-Bedeutung ist dessen vermeintliche Wirkung als Antioxidans [23]. So zeigten *in vitro* Experimente, dass ET reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) [24],

Einleitung

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit (ONOO^-) [25] zum DNA-Schutz abfängt und unschädlich macht [26].

In einem Experiment wurde der oxidative Stress von H_2O_2 und Superoxidanion auf HeLa-Zellen mit und ohne ET verglichen [2]. Analysiert wurde hierbei das Überleben der Zellen. Dabei wurde gezeigt, dass $\text{ETT}^{-/-}$ HeLa-Zellen eine geringere Lebensfähigkeit haben als ET exprimierende Zellen.

Des Weiteren zeigten Pfeiffer *et al.* anhand von Versuchen in ET-Knockout-Zebrafischen, dass ungestresste Tiere eine erhöhte Konzentration an 8-Oxo-Guanosin in der Haut, dem Auge und im Dünndarm aufwiesen [17]. 8-Oxo-Guanosin wird in der Literatur als Indikatormolekül für die ROS Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) beschrieben (siehe 1.2.1). Auffällig war hierbei, dass in den $\text{ETT}^{-/-}$ Zebrafischen nur die 8-Oxo-Guanosin-Konzentration erhöht war und nicht die von den anderen oxidierten Nucleosiden. Von allen ROS reagiert nur $^1\text{O}_2$ ausschließlich mit Guanin und nicht mit den anderen Basen, wie Adenin, Cytosin oder Thymin [27]. Dies legt nahe, dass ET vor $^1\text{O}_2$ schützt, da ohne ET nur 8-Oxo-Guanosin im $\text{ETT}^{-/-}$ Zebrafisch erhöht war.

Rougee *et al.* unterstützen diese Vermutung. Sie führten *in vitro* Experimente durch, welche die $^1\text{O}_2$ -quenched Wirkungen von ET mit weiteren Thiolen, wie GSH, Cystein, N-Acetyl-Cystein, 2-Mercaptoethanol und 2-Mercaptopropionyl-Glycin, verglich [28]. Dabei zeigte ET die größte $^1\text{O}_2$ -Deaktivierung. Ein solcher Vergleich von ET und GSH gegenüber spezifisch generiertem $^1\text{O}_2$ wurde von Johanna Krüger aus der Arbeitsgruppe Gründemann durchgeführt und bestätigt die Ergebnisse [29]. Dabei zeigten die noch nicht publizierten Daten, dass ET *in vitro* 20-fach besserer $^1\text{O}_2$ quenched als GSH. Aus diesem Grund ist ein Ziel meiner Arbeit ET als $^1\text{O}_2$ -Quencher unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Zelle zu untersuchen und einen Vergleich mit GSH durchzuführen.

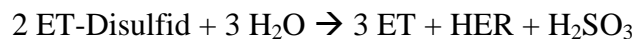
1.1.3 Reaktion von Ergothionein

Das in den Organismus aufgenommene ET verweilt in den Zellen sehr lange [30]. So ist in der Ratte eine Halbwertszeit von einem Monat beschrieben worden [31]. ET konnte im Blut von Mäusen 14 Tage nach einer einzigen Applikation nachgewiesen werden [22]. Dies spricht für einen langsamen Verbrauch und eine erhöhte renale Resorption. Ähnliches ist im menschlichen Urin beobachtet worden [32]. Hier konnte lediglich $< 4\%$ des applizierten ET als Ausscheidung im Urin nachgewiesen werden.

Einleitung

Diese Befunde weisen auf einen langsamen Verbrauch mit möglichem intrazellulärem Regenerationsmechanismus hin. Bis zum jetzigen Stand ist aber kaum etwas über die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET bekannt. Servillo *et al.* zeigten erste *in vitro* Untersuchungen mit ET und verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies [33]. Sie verwendeten H_2O_2 mit und ohne Myoglobin, Hypochlorit (ClO^-) und Peroxynitrit (ONOO^-), aber nicht gezielt $^1\text{O}_2$. Bei der Reaktion von H_2O_2 mit Myoglobin entstehen Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$), welches eine weitere ROS ist. Hypochlorit reagiert erst mit H_2O_2 zu $^1\text{O}_2$, aber bei alleiniger Verwendung von Hypochlorit oder H_2O_2 kommt es nicht zur $^1\text{O}_2$ -Bildung [34].

Bei der *in vitro* Inkubation von ET mit den einzelnen reaktiven Molekülen wurden drei Produkte mittels LC-MS identifiziert: Hercynin (HER; ET ohne Schwefel; Abbildung 17), ET-Disulfid und ET-Sulfonsäure (Abbildung 44) [33]. Daraus schlussfolgerten Servillo *et al.* einen Reaktionsweg von ET über verschiedene Oxidationen am Schwefel des ETs und des ET-Disulfids. Bei dem oxidativen Reaktionsweg über die Bildung des ET-Disulfids wurde folgende allgemeine Reaktionsgleichung postuliert:



Die spezielle Reaktion von ET mit $^1\text{O}_2$ ist in der Literatur nicht beschrieben. Es gibt mögliche Parallelen bei der Reaktion von 8-Oxo-Guanosin mit $^1\text{O}_2$. Die Carbonylgruppe an Position 2 des Imidazolrings führt zu einer 100-fach schnelleren Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit 8-Oxo-Guanosin zu 4-Hydroxy-8-Oxo-Guanosin als mit Guanosin selbst (Abbildung 8) [35]. Dies zeigt einen möglichen parallelen Reaktionsweg von $^1\text{O}_2$ mit ET auf. Bei ET ist die Position 2 des Imidazolrings durch das Schwefelatom besetzt. Daher liegt ein Fokus meiner Arbeit auf der Charakterisierung dieser vermutlich funktionell entscheidenden Reaktion von ET mit $^1\text{O}_2$.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beeinflusst eine Vielzahl von zellulären Prozessen und ist für oxidativen Stress verantwortlich. Zu den ROS werden Hydroxyl-Radikale, Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidanion und Wasserstoffperoxid gezählt (Abbildung 3) [36]. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung als auch in ihrer Reaktivität mit anderen Reaktionspartnern. So kann eine Reaktivitätsreihenfolge gebildet werden:

Hydroxyl-Radikale > Singulett-Sauerstoff > Superoxidanion > Wasserstoffperoxid

Einleitung

Hydroxyl-Radikale sind nicht spezifisch bezüglich der Reaktionspartner, wohingegen diese von $^1\text{O}_2$ selektiert ausgewählt werden. Beispielsweise reagieren Hydroxyl-Radikale mit allen DNA-Basen, aber $^1\text{O}_2$ nur mit Guanin. Im Folgenden steht $^1\text{O}_2$ im Fokus weiterer Untersuchungen.

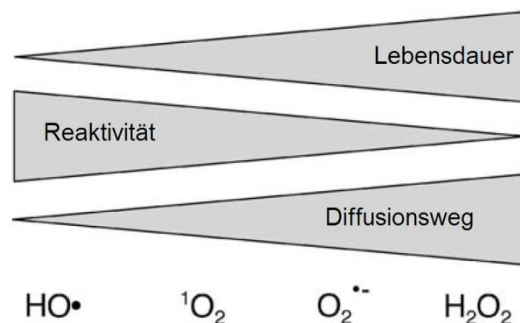


Abbildung 3: Lebensdauer, Reaktivität und Diffusionsstrecke der einzelnen ROS im Vergleich. Modifiziert nach [36]

1.2.1 Eigenschaften und Reaktionen von Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gehört zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies. Dabei ist $^1\text{O}_2$ der angeregte Zustand des reaktionsträgen Triplett-Sauerstoffs ($^3\text{O}_2$). Beim reaktiven $^1\text{O}_2$ befinden sich zwei Elektronen mit antiparallelem Spin in einem π -Orbital. Dieser Zustand ist nach Definition der Hundschen Regel ein energiereicherer als der des reaktionsträgen $^3\text{O}_2$. Beim $^3\text{O}_2$ befinden sich die Elektronen antiparallel in zwei unterschiedlichen π -Orbitalen [37].

Die $^1\text{O}_2$ Halbwertszeit in Wasser beträgt $3\ \mu\text{s}$ mit einer maximalen Diffusionsstrecke von $155\ \text{nm}$ [38, 39]. Diese Zeit und Strecke bleibt dem $^1\text{O}_2$ einen Reaktionspartner zu finden. Durch D_2O kann die Halbwertszeit auf $68\ \mu\text{s}$ verlängert werden [40]. Dies ist ein $^1\text{O}_2$ -Charakteristikum und wird oft bei Experimenten verwendet, um die Spezifität von $^1\text{O}_2$ zu zeigen.

Erreicht $^1\text{O}_2$ einen Reaktionspartner, wird $^1\text{O}_2$ entweder durch chemisches oder physikalisches Quenchen in den Grundzustand überführt. Bei dem physikalischen Quenchen handelt es sich um eine Reaktion in der $^1\text{O}_2$ mit einem anderen Stoff in Form von Wärme in den Grundzustand überführt wird. Ein Beispiel für einen physikalischen Quencher ist Azid [41]. Anders verhält es sich bei dem chemischen Quenchen. Hierbei selektiert $^1\text{O}_2$ den Reaktionspartner. Reaktionspartner sind meist elektronenreiche Verbindungen mit denen dann ein neues Reaktionsprodukt gebildet wird [42]. Zu diesen Verbindungen zählen ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, neutrale Nukleophile, Sulfide, Amine und Anionen [37].

Einleitung

Davies berechnete die intrazellulären Angriffspunkte von $^1\text{O}_2$ auf theoretischer Basis. Dabei werden Proteine (68,5%), Ascorbinsäure (16,5%), RNA (6,9%), DNA (5,5%), β -Carotin (>1%) und GSH (>1%) angegriffen [43]. Wie bereits erwähnt, reagiert $^1\text{O}_2$ selektiv und wählt seinen Reaktionspartner aus. Dies ist der Grund, weshalb bei den Aminosäuren nur Cystein [44], Histidin [45], Methionin [46], Tryptophan [47] und Tyrosin [48] sowie bei den DNA- und RNA-Basen nur Guanin [49] betroffen sind. Hydroxyl-Radikale reagieren dagegen mit allen Aminosäuren und allen DNA- und RNA-Basen gleichermaßen [50].

$^1\text{O}_2$ ist ein elektrophiles Molekül und seine bevorzugten Reaktionsmechanismen sind:

(1) Schenk-En-Reaktion [51], (2) [4+2] Cycloaddition (Diels-Alder-Reaktion) [52], (3) mit aktivierter Doppelbindungen in einer [2+2] Cycloaddition [53], oder (4) über eine Elektronentransferreaktion [54].

Bei (1) reagieren Olefine durch eine Schenk-En-Reaktion mit $^1\text{O}_2$ zu einem Hydroperoxid, welches unter physiologischen Bedingungen dann zu einer Hydroxygruppe oder Carbonylgruppe weiterreagiert (Abbildung 4).

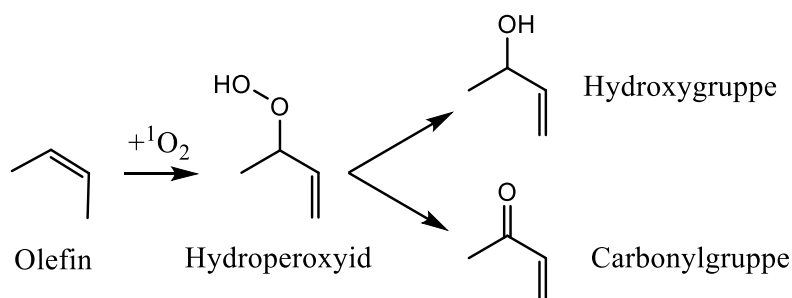


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus einer Schenk-En-Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit einem Olefin. Olefine können mit $^1\text{O}_2$ zu α,β -ungesättigten Hydroperoxiden, Hydroxygruppe und Carbonylgruppe reagieren.

Bei (2) können zyklische konjugierte Diene oder Aromaten anhand einer [4+2] Cycloaddition mit $^1\text{O}_2$ zu einem Endoperoxid reagieren [55]. Ein Beispiel ist das nicht physiologische aber in der Arbeit verwendete Naphthalin-Derivat N,N'-Di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalindipropanamid (DHPN, Abbildung 5). Hierbei reagiert DHPN mit $^1\text{O}_2$ durch eine [4+2] Cycloaddition zu DHPNO₂ [56]. Die thermolytische Dissoziation des gebundenen Sauerstoffs vom DHPNO₂ kann genutzt werden, um spezifisch $^1\text{O}_2$ freizusetzen [57].

Einleitung

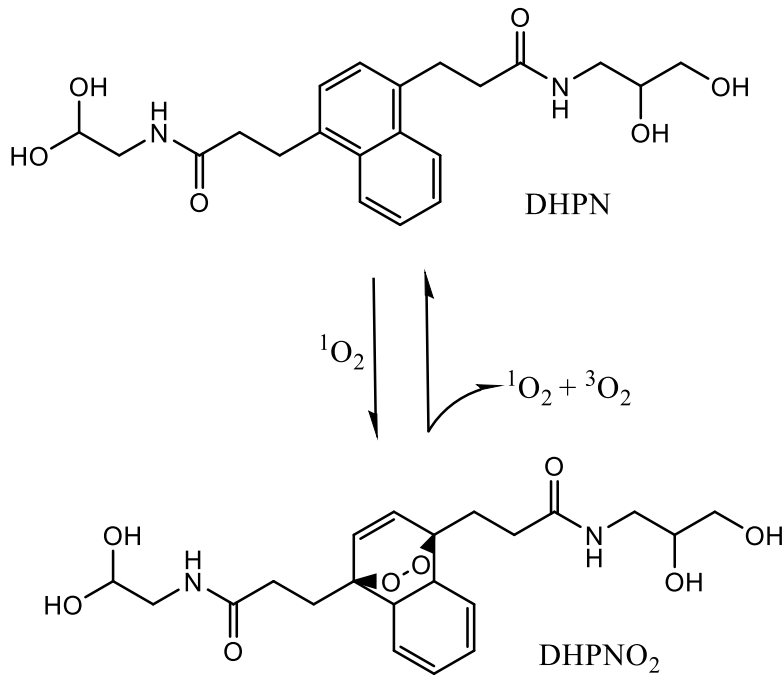


Abbildung 5: Erzeugung von Endoperoxiden durch $^1\text{O}_2$. In einer [4+2] Cycloaddition (Diels-Alder-Reaktion) kann DHPN mit $^1\text{O}_2$ das Endoperoxid DHPNO₂ bilden. Unter gemäßigten Temperaturbedingungen (37 °C) wird der Sauerstoff wieder in Form von $^1\text{O}_2$ und $^3\text{O}_2$ abgespalten.

Der dritte mögliche Reaktionsweg von $^1\text{O}_2$ ist eine Reaktion an aktivierten C-C-Doppelbindungen über eine [2+2] Cycloaddition (Abbildung 6). Hierbei addiert sich $^1\text{O}_2$ an eine C-C-Doppelbindung und bildet ein Dioxetanintermediat, welches instabil ist und zu einem Hydroxid oder Keton weiterreagiert [58].

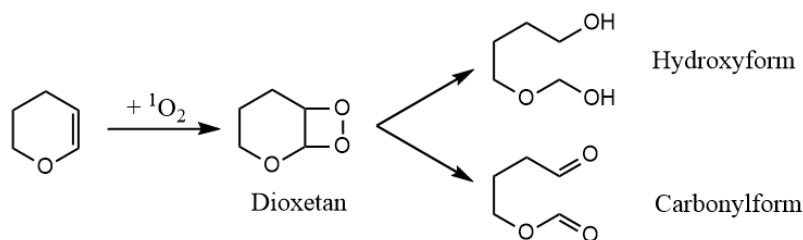


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus von $^1\text{O}_2$ über eine [2+2] Cycloaddition. Der $^1\text{O}_2$ reagiert durch eine [2+2] Cycloaddition an die aktivierte Doppelbindung und bildet ein Dioxetan. Dieses Dioxetan kann dann zu Hydroxy- oder Carbonylgruppen zerfallen.

Einleitung

Beim vierten Reaktionsweg, der Elektronentransferreaktion, kann $^1\text{O}_2$ beispielsweise mit dem Elektronenreduktionsmittel Ascorbinsäure (ASC) zu Dehydroascorbinsäure (DHS) und H_2O_2 reagieren [54]. Dabei bildet ASC nicht direkt mit $^1\text{O}_2$ eine kovalente Bindung aus, sondern liefert Elektronen und reduziert so $^1\text{O}_2$ zu Superoxidanion (O_2^-), welche mit Protonen dann zu H_2O_2 weiterreagieren (Abbildung 7).

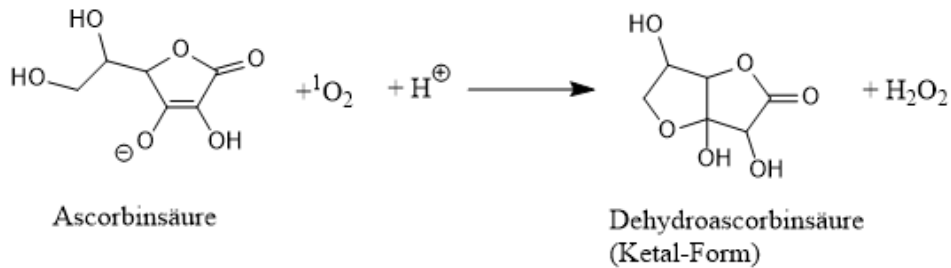


Abbildung 7: Elektronentransferreaktion von ASC und $^1\text{O}_2$. Ein Elektronenreduktionsmittel wie ASC reduziert bei dieser Reaktion $^1\text{O}_2$ in Gegenwart von Protonen zu H_2O_2 . ASC wird bei der Reaktion zu DHS in der Ketal-Form.

Physiologische Relevanz haben die verschiedenen Reaktionsmechanismen bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Desoxyguanosin (Abbildung 8). Die Reaktion kann entweder über eine [4+2] Cycloaddition zu einem 4,8-Endoperoxid am Imidazolring oder über eine Schenk-En-Reaktion zu einem 8-Hydroperoxid verlaufen. Es folgt eine Umlagerung mit Wasserabspaltung zu einem 8-Carbonyl [59, 60], welches in der Literatur oft als zellulärer Indikator für $^1\text{O}_2$ Schaden beschrieben wurde [61].

Einleitung

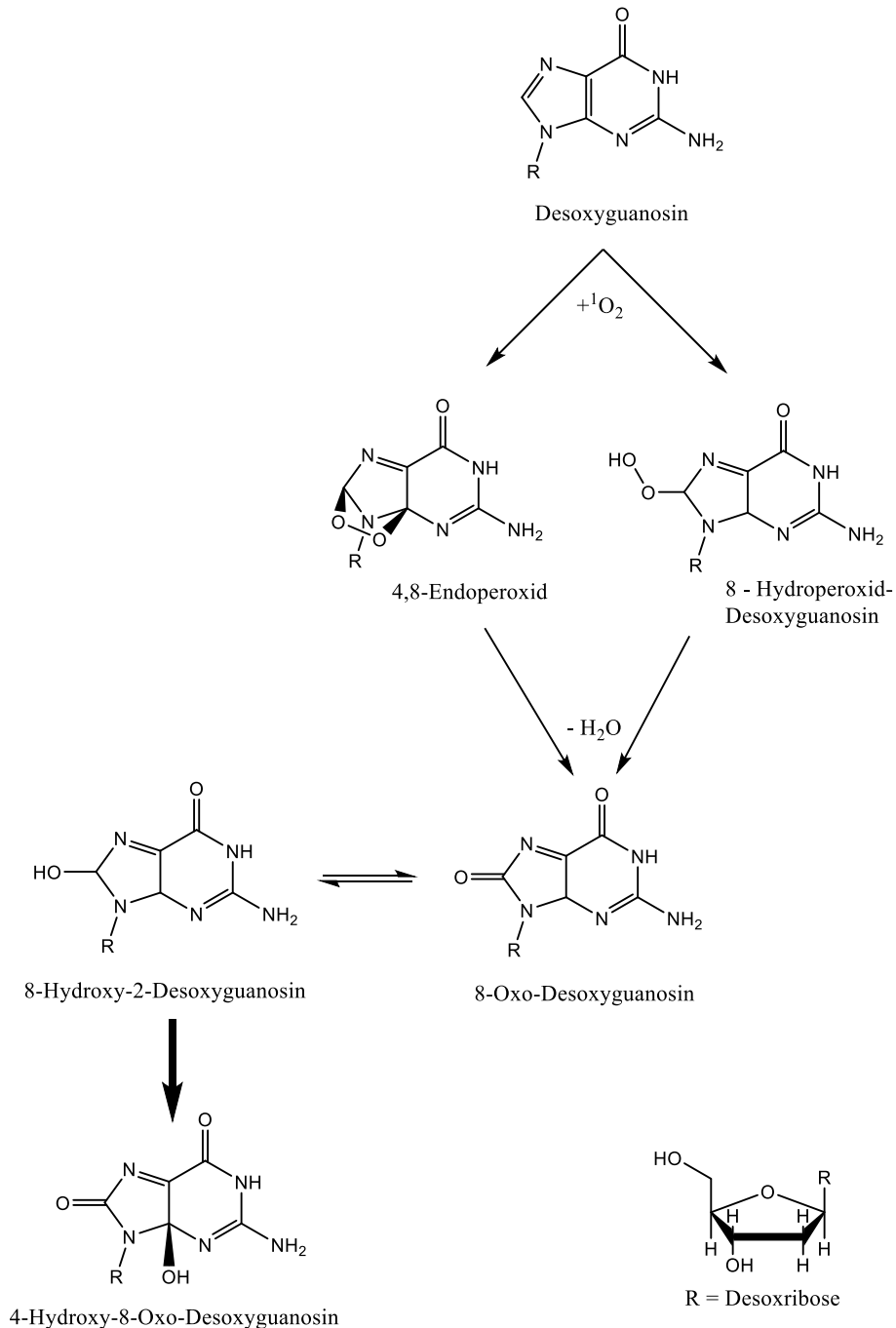


Abbildung 8: Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Desoxyguanosin. Desoxyguanosin reagiert mit $^1\text{O}_2$ zu einem 4,8-Endoperoxid oder zu einem 8-Hydroperoxid, welche instabil sind und unter Wasserabspaltung zu 8-Hydroxy-2-Desoxyguanosin weiterreagieren. 8-Hydroxy-Desoxyguanosin steht im Gleichgewicht mit 8-Oxo-Desoxyguanosin. 8-Oxo-Desoxyguanosin reagiert 100-fach schneller mit $^1\text{O}_2$ als Desoxyguanosin zu 4-Hydroxy-8-Oxo-Desoxyguanosin [35].

Weitere physiologische Relevanz hat die Reaktion von $^1\text{O}_2$ bei schwefelhaltigen Verbindungen wie Thiolen. Diese sind ebenfalls sehr elektronenreich und können mit $^1\text{O}_2$ bei ausreichender Thiolkonzentration zu Disulfiden oxidieren. Andernfalls werden Thiole wie die Aminosäure Cystein zu Sulfonsäuren oxidiert [44].

1.2.2 Intrazelluläre Entstehung von $^1\text{O}_2$

Zellen nutzen $^1\text{O}_2$ einerseits gezielt für die Abwehr von Pathogenen, andererseits entsteht $^1\text{O}_2$ ungezielt auf natürlichem Wege durch verschiedene Nebenreaktionen. Die beabsichtigte $^1\text{O}_2$ -Generierung geschieht meist durch Zellen des Immunsystems. Besonders Makrophagen, Eosinophile und Neutrophile Granulozyten können durch Enzyme $^1\text{O}_2$ freisetzen [62]. Beispiele für Enzyme sind Lactoperoxidasen [63], Dioxygenasen [64] und Lipoxigenasen [65], wobei die enzymatische $^1\text{O}_2$ -Produktion nur mit erhöhten Konzentrationen von H_2O_2 und Hypochlorit möglich ist. Auch Proteine mit Häm-Cofaktor generieren mit H_2O_2 $^1\text{O}_2$ [66]. Zu diesen Proteinen zählt das Hämoglobin und Myoglobin, wobei Hämoglobin 96% der Erythrozytentrockenmasse ausmacht. Die Vorstufe des Häms, Protoporphyrin IX (Häm ohne gebundenes zweiwertiges Eisen), ist ein Photosensibilisator (PST, siehe 1.3.1). PST sind meist elektronenreiche Moleküle, die Lichtquanten einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und daraufhin in den angeregten Zustand übergehen (Abbildung 9). Der angeregte PST kann über zwei Reaktionswege reagieren. In der Typ I-Reaktion wird die Energie auf ein zweites Molekül übertragen, welches dann mit Sauerstoff zu anderen ROS wie Superoxidanion, Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikalen reagiert. Bei der Typ II-Reaktion überträgt der Photosensibilisator die Energie direkt auf den Sauerstoff, der daraufhin angeregt wird und in den $^1\text{O}_2$ -Zustand übergeht [67].

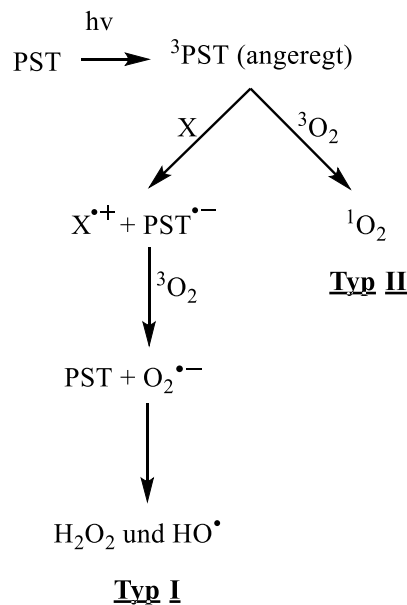


Abbildung 9: Reaktionstypen von Photosensibilisatoren. Der PST wird durch Photonen einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Danach reagiert dieser entweder über Typ I- oder Typ II-Reaktion. Bei der Typ I Reaktion wird die Energie auf ein weiteres Molekül übertragen, welches dann mit Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) zu Superoxidanion und weiter zu H_2O_2 sowie Hydroxyl-Radikalen reagiert. Bei der Typ II Reaktion überträgt der angeregte PST die Energie direkt auf $^3\text{O}_2$, welcher dann zum reaktiven $^1\text{O}_2$ wird. Modifiziert nach [68].

1.3 Generierung von $^1\text{O}_2$ in Zellen

Um die physiologische Bedeutung von ET und dessen Reaktion mit $^1\text{O}_2$ zu bestimmen, muss zunächst intrazellulär $^1\text{O}_2$ generiert werden. Die gezielte Generierung von $^1\text{O}_2$ in einem Zellsystem stellt sich als schwierig heraus. Beispielsweise werden für eine enzymatische $^1\text{O}_2$ -Freisetzung auch andere ROS, wie H_2O_2 und Hypochlorit, benötigt. Dadurch ist eine spezifische Betrachtung von $^1\text{O}_2$ mit ET nicht möglich. Prinzipiell kommen für die $^1\text{O}_2$ -Generierung zwei Wege infrage: Mithilfe von Photosensibilisatoren oder mit einem Endoperoxid. Beide Möglichkeiten gehen mit bestimmten Vor- und Nachteilen bzw. Schwierigkeiten einher, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.3.1 Photosensibilisatoren

PST sind Moleküle, die Photonen einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und diese Energie auf Sauerstoff übertragen können (Abbildung 9). In der Literatur wird zur $^1\text{O}_2$ -Erzeugung in Zellsysteme hauptsächlich Bengal Rosa (BR; Abbildung 10, A) und Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylat (TMPyP; C) [69] verwendet, aber auch das spezielle 4,5-Bis(1,3,2-dithiarsolan-2-yl)-resorufin (ReAsH; B) [70]. Diese drei PST weisen unterschiedliche strukturelle Besonderheiten auf.

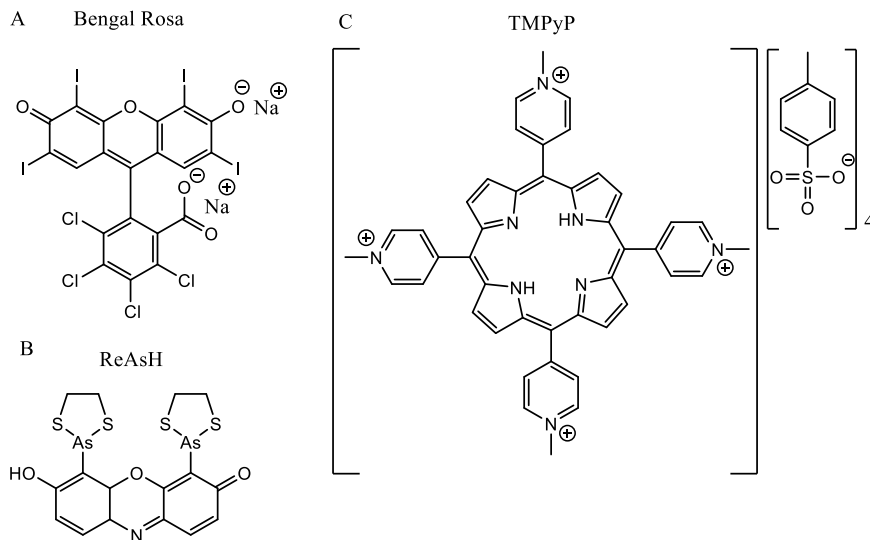


Abbildung 10: Strukturformel der Photosensibilisatoren Bengal Rosa (A), ReAsH (B) und TMPyP (C).

BR ist aufgrund der unpolaren Struktur lipophil und reichert sich in der Zellmembran an. Um am effektivsten mit BR $^1\text{O}_2$ zu erzeugen muss dieses mit einer Wellenlänge von 549 nm

angeregt werden [71]. Anders verhält sich TMPyP. Es ist positiv geladen, wodurch sich der Akkumulationsort im Zellkern an der negativ geladenen DNA befindet [72]. Die Anregungswellenlänge für TMPyP liegt bei 422 nm. BR und TMPyP sind in ihrem Akkumulationskompartiment nicht gezielt steuerbar. ReAsH hingegen bindet gezielt an ein bestimmtes Tetracysteinmotiv [73]. Proteine können mit diesem Motiv modifiziert werden, wodurch der $^1\text{O}_2$ -Generierungsort an das Protein gebunden ist. Das Anregungswellenlängenmaximum liegt für die $^1\text{O}_2$ -Freisetzung durch den Protein-ReAsH-Komplex bei 568 nm [70]. Die Besonderheit von BR, TMPyP, ReAsH und anderen PST ist, dass sie erhöhte Mengen an $^1\text{O}_2$ generieren können. Die $^1\text{O}_2$ -Produktion ist nur durch die Stabilität des PST begrenzt. Zwar ist ein multipler Umsatz von Photonen zu $^1\text{O}_2$ durch PST möglich. Jedoch darf hierbei der Nachteil für diese Arbeit nicht vernachlässigt werden, dass eine geringe Menge anderer ROS über die Typ I-Reaktion generiert wird.

1.3.2 DHPNO₂

Die Besonderheit von DHPNO₂ ist seine Fähigkeit $^1\text{O}_2$ spezifisch durch Thermolyse zu generieren. Dabei ist DHPNO₂ ein synthetisch hergestelltes Endoperoxid (Abbildung 5). Für die Synthese wird DHPN über eine [4+2] Cycloaddition bei Temperaturen von 4 °C in Gegenwart von Methylenblau (ist ein PST), Licht und Sauerstoff zu DHPNO₂ synthetisiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wird beim Beladen D₂O verwendet [74]. DHPNO₂ zeigt eine gute Membranpermeabilität, im Gegensatz zu anderen Endoperoxiden mit mehr ionischen Gruppen wie 3,3'-(1,4-Naphtyl)-Dipropionsäure (NDP) [75] oder 1,4-Naphthalendimethanol (NDMOL) [76]. DHPNO₂ ist für Zelleexperimente das geeignetste Endoperoxid, da es durch die Membran diffundiert und $^1\text{O}_2$ im Zytosol freisetzt. DHPNO₂ ist gut wasserlöslich und hat eine Halbwertszeit von 23 Minuten bei 37 °C. Hierbei ist zu beachten, dass DHPNO₂ 59% des beladenen Sauerstoffs als $^1\text{O}_2$ freisetzt. Die anderen 41% werden als reaktionsträger $^3\text{O}_2$ freigegeben [77]. Ist der Sauerstoff von einem DHPNO₂ Molekül abdiffundiert, kann kein weiteres $^1\text{O}_2$ freigesetzt werden. Dies führt zu einer limitierten Ausbeute von $^1\text{O}_2$ im Vergleich zu PST, wo ein multipler Umsatz von einem PST Molekül möglich ist (siehe 1.3.1). Die $^1\text{O}_2$ -Spezifität macht das DHPNO₂ für diese Arbeit zu einem essentiellen Werkzeug, um die Untersuchungen von ET und $^1\text{O}_2$ zu spezifizieren. Doch um eine Reaktion oder einen intrazellulären ET-Schutz gegenüber $^1\text{O}_2$ darzustellen, bedarf es eines geeigneten Indikatormoleküls. Mögliche $^1\text{O}_2$ -Indikatoren werden im Folgenden beschrieben.

1.4 Indikatoren für $^1\text{O}_2$ -Schaden

Prinzipiell könnten alle $^1\text{O}_2$ -Reaktionsprodukte der Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Methionin sowie der Base Desoxyguanosin und andere in 1.2.1 genannte Moleküle als $^1\text{O}_2$ -Indikator fungieren. Der häufigste in der Literatur beschriebene $^1\text{O}_2$ -Indikator ist das 8-Oxo-Desoxyguanosin [61]. Doch Experimente der Arbeitsgruppe Gründemann haben gezeigt, dass sich 8-Oxo-Desoxyguanosin nicht für die in dieser Arbeit angestrebten Anwendung als Indikator eignet [29]. Das Molekül konnte nicht in ausreichender Menge generiert werden, um eine stabile LC-MS Messung sowohl *in vitro*, als auch in Zelllysaten durchzuführen. Dies kann zum einen daran liegen, dass 8-Oxo-Desoxyguanosin 100-fach schneller mit $^1\text{O}_2$ zu 4-Hydroxy-8-Oxo-Desoxyguanosin reagiert als Desoxyguanosin selbst [35]. Zum anderen wurden in den meisten Publikationen die verschiedenen $^1\text{O}_2$ -Indikatoren einzeln betrachtet. In einem Zellsystem ist die Anzahl der möglichen Reaktionspartner viel höher, sodass die mit $^1\text{O}_2$ entstehenden Produkte geringer ausfallen und schwerer zu detektieren sind.

In der Arbeitsgruppe Gründemann hatte Johanna Krüger Methionin-Sulfoxid (MSO) als $^1\text{O}_2$ -Indikatormolekül etabliert. MSO war *in vitro* und in Zellsystemexperimenten ein geeigneter $^1\text{O}_2$ -Marker [29]. Dabei addiert sich ein Sauerstoff an Methionin und liefert die Verbindung MSO (Abbildung 11) [78]. Diese Verbindung reichert sich in Zellen bei $^1\text{O}_2$ -Exposition an und ist somit als oxidativer Stressmarker geeignet. Dabei ist zu beachten, dass auch andere ROS Methionin zu MSO oxidieren. MSO stellt einen ungewollten Schaden für die Zelle dar, da nach der Reaktion Methionin als Aminosäure nicht mehr zur Verfügung steht. Einige Zellen haben einen Thioredoxin-abhängigen Regenerationsmechanismus, wobei durch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase MSO wieder zu Methionin umgewandelt wird [79].

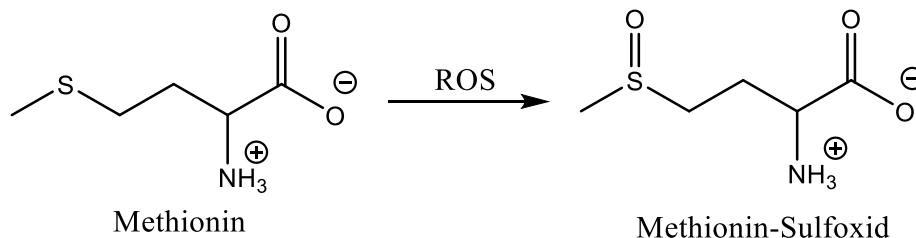


Abbildung 11: Die Reaktion von ROS mit Methionin generiert Methionin-Sulfoxid.

Eine weitere Verbindung, die zur $^1\text{O}_2$ -Quantifizierung verwendet wird, ist 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon (TEMP; Abbildung 12) [80]. Dabei fungiert der Stickstoff als $^1\text{O}_2$ -Akzeptor und reagiert mit $^1\text{O}_2$ zum stabilen Radikal 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon-*N*-oxyl (TEMPO) [81]. Bei Zellexperimenten muss beachtet werden, dass in Gegenwart von ASC oder GSH TEMPO zu TEMPOH reagiert (Abbildung 12). Die Messung wird dadurch ungenauer, da insgesamt drei verschiedene Produkte von TEMP mit $^1\text{O}_2$ entstehen können. Die Besonderheit dieses Systems ist die spezifische Reaktion von TEMP mit $^1\text{O}_2$ zu TEMPO, welche nur mit $^1\text{O}_2$ abläuft. Bei der $^1\text{O}_2$ -Generierung durch PST, welche hauptsächlich $^1\text{O}_2$ aber auch andere ROS produzieren, kann eine $^1\text{O}_2$ -Spezifität in das System gebracht werden. TEMP ist ein exogenes Molekül und muss der Zelle zunächst zugeführt werden. In dieser Arbeit soll dieses System zur Quantifizierung von $^1\text{O}_2$ -Zellschäden etabliert werden.

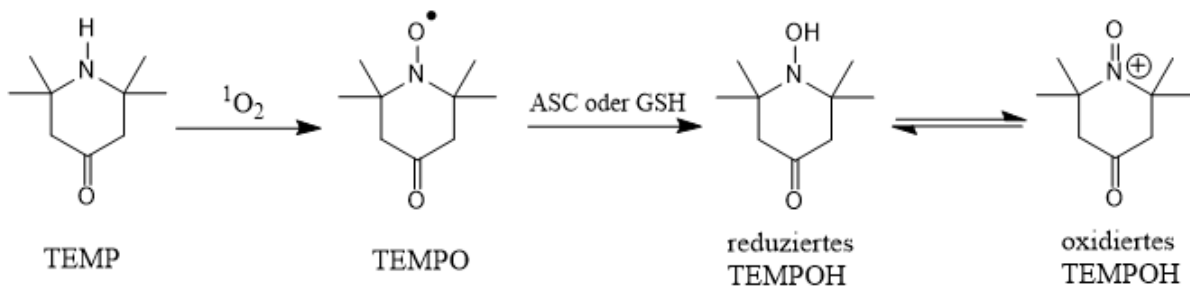


Abbildung 12: $^1\text{O}_2$ -Reaktion von TEMP zu TEMPO mit weiterer Reduktion zu TEMPOH. Dargestellt ist die spezifische Reaktion von TEMP mit $^1\text{O}_2$ zum stabilen Radikal TEMPO. In Gegenwart von ASC oder GSH wird TEMPO sofort weiter zu TEMPOH reduziert [82].

1.5 Ziel der Arbeit

Pfeifer *et al.* haben im Zebrafisch eine erhöhte 8-Oxo-Guanosinkonzentration in Abwesenheit von ET gemessen. Daraufhin hat sich Johanna Krüger mit der schützenden ET-Wirkung gegenüber $^1\text{O}_2$ *in vitro* befasst. Aufbauend auf diesen Vorarbeiten ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Beziehung von $^1\text{O}_2$ und ET in einem Zellsystem zu bestätigen. Dafür wurden 293 Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von ET mit $^1\text{O}_2$ durch die PST ReAsH, BR, TMPyP und dem Endoperoxid DHPNO₂ gestresst.

Als oxidativer Stressindikator wird in allen Experimenten MSO genutzt. Aufgrund der Tatsache, dass MSO nicht $^1\text{O}_2$ spezifisch ist, werden andere intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Indikatoren gesucht. Dabei werden gezielt aus der Literatur bekannte Indikatoren mit $^1\text{O}_2$ *in vitro* gesucht,

Einleitung

um die möglichen Kandidaten anschließend auf zellulärer Ebene zu analysieren. Zusätzlich wird versucht, TEMP als spezifischen exogenen Indikator zu etablieren.

Um Rückschlüsse über den ET-Vorteil gegenüber den wichtigsten Antioxidantien, wie ASC und GSH, zu ziehen, werden Methoden entwickelt, um intrazelluläres ASC und GSH zu eliminieren. Mit diesen Methoden soll anschließend das $^1\text{O}_2$ -Quenchverhalten von ET und ASC bzw. GSH in der Zelle analysiert und verglichen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET. Bis jetzt ist nur sehr wenig über diese spezielle Reaktion bekannt. Sowohl eine Strukturaufklärung möglicher Zwischenprodukte als auch eine Analyse des Reaktionsmechanismus wurden bisher nicht durchgeführt. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit zunächst versucht, spezifische Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ und ET *in vitro* zu identifizieren und charakterisieren. Die gefundenen Signale sollen daraufhin mit $^1\text{O}_2$ gestressten Zellen abgeglichen werden.

2 Material und Methoden

Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Zentrum für Pharmakologie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dirk Gründemann durchgeführt.

Die Synthese des Endoperoxids DHPNO₂ wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Hans-Günther Schmalz im Institut der organischen Chemie der Universität zu Köln durchgeführt.

Die akkurate Masse einiger Verbindungen wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie bei Biocenter MS Plattform, Universität zu Köln, mit Mitarbeitern von Frau Dr. Sabine Metzger durchgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Sonstige Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) erworben. Dabei war die Reinheit stets „p.a.“ oder „reinst“.

Glas- und Plastikwaren wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) VWR International (Darmstadt, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Nicht sterile Materialien wurden mit einem Varioklav der Firma H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert (121 °C, 1,2 bar, 20 min). Glasware wurde im Sterilisator (Typ T12, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Germany) bei 200°C sterilisiert.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Die Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Leuven, Niederlande).

2.1.3 Kits

Folgende Kitsysteme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 1: Kit - Systeme

Kit-System	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
NEB Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoBond Xtra Mini Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

2.1.4 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Zelllinien

Folgende Bakterienstämme, Oligonukleotide und Zelllinien wurden verwendet:

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
NEB 5α Kompetente <i>E. coli</i>	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
DH5α	<i>endA1 supE44 thi-1</i> Δ <i>recA1 gyrA96</i> <i>relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U196 Δ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> <i>hsdRMS mcrBC</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1990

Tabelle 3: Oligonukleotide

Primer	Sequenzen 5' → 3'
TetR-TC-Fw	GCTGCTGCATGGAACCGTCCCGGGAATTCAGATCTTATTAAA GCAG
TetR-TC-Rev	CGGGCAGCAGTTCAGAAATCCGCTGTACGCGGACCC
Seq-TetR-TC-fw	CGACAAGCTATCGAATTATTTGAT

Als Zelllinie wurden Human Embryonic Kidney (293) Zellen (American Tissue Type Collection 1988, ATCC CRL-1573) benutzt. Mittels humanen Adenovirus lassen sich 293 Zellen transfizieren [83].

2.1.5 Plasmid und Expressionssystem pEBTetD

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid ist der pEBTetD Vektor [84]. Das Plasmid basiert auf dem Grundgerüst des pCEP-Pu Vektors [85] und beinhaltet ein Tetracyclin-Repressor (TetR)-System sowie Elemente des Epstein-Barr-Virus. Bei diesen Elementen handelt es sich um den Replikationsursprung oriP und das DNA-Bindeprotein Epstein-Barr-Nuclear-Antigen (EBNA-1) [86]. Das Plasmid hat alle notwendigen Bestandteile, die für ein induzierbares Expressionssystem notwendig sind. Dadurch kann eine Zelllinie bereits nach einmaliger Transfektion mit anschließender Selektionsphase innerhalb von einer Woche etabliert werden.

Der Vektor ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Um eine Replikation in Bakterien zu gewährleisten, beinhaltet pEBTetD einen pUC-Replikationsursprung (engl., plasmid of the University of California) und eine Ampicillinresistenzkassette. Für eine stabile Transfektion in einer humanen Zelllinie zu generieren, besitzt der Vektor eine Puromycinresistenz, welche durch einen Simians Virus 40 (SV40) Promotor kontinuierlich exprimiert wird. Die Induzierbarkeit des pEBTetD liegt darin, dass dieser den Tet-Repressor kontinuierlich exprimiert, welcher daraufhin Homodimer bilden. Diese werden dann an den Tet-Operator gebunden und so eine Expression der stromabwärts liegenden cDNA verhindert. Liegt nun Doxycyclin vor, ein Tetracyclin-Derivat, welches nicht von der Zelle verstoffwechselt wird, dann bindet dieses an den Tet-Repressor und ändert so die Konformation des Homodimers. Das Homodimer kann nicht mehr an den Tet-Operator binden und die klonierte cDNA Sequenz wird transkribiert.

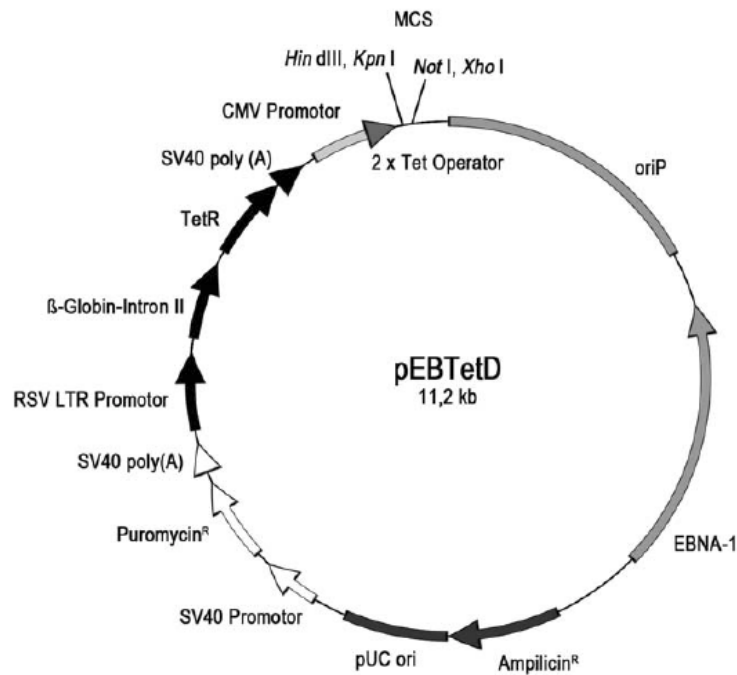


Abbildung 13: Schematische Darstellung des pEBTetD-Vektors. Die funktionelle Einheiten und deren Orientierung des Expressionssystems pEBTetD sind in Form von Pfeilen dargestellt (nach [84])

In der Arbeit verwendete Plasmide:

- pEBTetD/ETT: Humaner Ergothionein-Transporter (ETT)-Gen in die Multiple Cloning Site (MCS) kloniert
- pEBTetD/ETT/TetR-TC: ETT-Gen in die MCS kloniert und der Tet-Repressor am 3'-Ende mit einem Tetracysteinmotiv modifiziert (siehe Anhang)
- pEBTetD/SLC22A11: SLC22A11-Transporter-Gen in die MCS kloniert

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme (siehe 2.1.4) wurde in Luria Bertani (LB)-Medium oder auf LB-Agar Platten mit 50 µg/mL Ampicillin als Selektionsmarker durchgeführt. Die generierten *E. coli* Stämme mit den verschiedenen Plasmiden (siehe 2.1.5) wurden für eine Langzeitlagerung in Glycerin Stocks eingefroren. Hierfür wurde der jeweilige transformierte *E. coli* Stamm in 1 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Ampicillin für 4 h inkubiert. Danach wurde 1 mL LB Medium mit 20% Glycerin hinzugegeben und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	LB-Agar	Ampicillin Stock
10 g/L Casein-Hydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl	10 g/L Casein-Hydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl 15 g/L Agar	50 mg/mL Ampicillin (sterilfiltriert)

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien und Transformation

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden diese in 5 mL LB-Medium angeimpft. Nach 6 Stunden wurde 1 mL der Vorkultur in 250 mL SOB-Medium gegeben, welches sich in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen befand. Die Kultur wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert bis am nächsten Morgen die optische Dichte photometrisch bei 600 nm gemessen wurde. Diese sollte bei 0,6 liegen. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis gelagert und zum Abernten 10 Minuten bei 2500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 mL TB-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis, woraufhin die Zellen wieder bei 2500 UpM für 10 Minuten pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und dieses Mal wird das Pellet in 20 mL TB-Puffer gelöst. Es wurden 1,4 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) tropfenweise hinzugegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 100 µL der Zellsuspension in vorgekühlte wurden diese nun chemisch kompetenten Zellen bei -80 °C.

SOB- Medium	TB-Puffer
5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt 2,5 mL Kaliumchlorid (1 M) 20 g/L Trypton > ad. 1 L H ₂ O, autoklavieren und 5 mL Magnesiumchlorid (2 M) hinzufügen	3,025 g/L PIPES 1,665 g/L Calciumchlorid 18,625 g/L Kaliumchlorid > pH 6,7 mit KOH, autoklavieren und 6,95 g Manganchlorid hinzufügen

2.3 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die molekularbiologischen Methoden bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierfür wurden alle Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Stammlösungen zuvor autoklaviert (siehe 2.1.1).

2.3.1 Mutagenese Kit

Für die Generierung eines Tetracysteinmotiv (TC) an den C-Terminus vom Tet-Repressor des Plasmids pEBTetD/ETT (siehe 2.1.5) wurde das Q5 Site-Direction Mutagenese Kit verwendet (siehe 2.1.3). Mithilfe dieses Kits kann eine Plasmid-DNA in drei Schritten in Form von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen modifiziert werden. Eine Insertion der spezifischen DNA ist hierbei nur durch die mögliche Länge der Primersynthese limitiert.

Der erste Schritt für eine Insertion des TC in den Vektor pEBTetD/ETT war die exponentielle Amplifizierung des mutierten Vektors mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide entworfen, die die TC-Sequenz beinhalteten (siehe 2.1.4).

Diese Oligonukleotide wurden dann in folgendem Reaktionsansatz eingesetzt:

- 12,5 µL Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix
- 0,5 µM forward Primer (TetR-TC-Fw)
- 0,5 µM revers Primer (TetR-TC-Rev, wurde später zur PCR hinzugegeben)
- 25 ng pEBTetD/ETT
- auf 25 µL ddH₂O

Die PCR wurde im Thermocycler T100 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit dem folgenden PCR Programm durchgeführt:

- 98 °C 30 s
- 98 °C 10 s
- 67 °C 30 s
- 72 °C 420 s

> Hinzugabe des TetR-TC-Rev Primers

- 98 °C 10 s ←
 - 71 °C 30 s
 - 72 °C 420 s
 - 72 °C 120 s
- } 25 x

Im zweiten Schritt des Q5 Site-Directed Mutagenese Kit wurden die generierten PCR-Produkte mit Hilfe einer Kinase, Ligase und DpnI (KDL)-Reaktion verknüpft. Hierbei waren Kinase und Ligase für die Verknüpfung des TC modifizierten Vektors verantwortlich. Das Restriktionsenzym DpnI schnitt die nicht-modifizierten Vektoren ohne TC. Dabei ist DpnI eine differenzierte Endonuklease, welche nicht methylierte und halb-methylierte Vektoren zerschneidet, sodass diese nicht mehr in *E. coli* transformiert werden können.

KDL-Reaktionsansatz:

- 1 μ L PCR-Produkt
 - 5 μ L KDL-Reaktionspuffer (2x)
 - 1 μ L KDL Enzym-Mix (10x)
 - 3 μ L ddH₂O.
- ➔ 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert

Im letzten Schritt folgte die Transformation in *E. coli*. Hierfür wurden 5 μ L des KDL-Reaktionsansatzes zu angetauten NEB-5 α kompetenten *E. coli* gegeben (siehe 2.1.4). Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden unterzogen. Danach folgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten. 950 μ L SOC-Medium (im Q5 Site-Directed Mutagenese Kit enthalten) wurden zu den Zellen hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C, 300 UpM für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar Platten mit 50 μ g/mL Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.3.2 Plasmid-Präparation (Mini und Maxi)

Die Plasmid-Präparation aus *E. coli* wurde mit dem NucleoBond Xtra Mini Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) bzw. NucleoBond Xtra Maxi Kit, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, durchgeführt.

2.3.3 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse ist eine molekularbiologische Methode mit der kontrolliert wird, ob das Plasmid das Insert trägt. Dabei schneiden bestimmte bakterielle Enzyme, sog. Restriktionsenzyme die spezifischen Basenpaare der DNA.

In dieser Arbeit wurde die Restriktionsanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob das TC ins Plasmid an das 3'-Ende von TetR integriert wurde. Mit der Hilfe des Computerprogramms „Gene Construction Kit“ (Version 4.0, Textco BioSoftware Inc, Raleigh, NC, USA) wurde das Restriktionsenzym BamHI bestimmt. Das Plasmid verliert nach erfolgreicher Insertion des TC an TetR eine BamHI-Restriktionsstelle. Dadurch wurde das modifizierte Plasmid nur einmal geschnitten. Für den Restriktionsansatz wurde die eingesetzte Menge des Enzyms an die DNA-Konzentration, die Anzahl der Restriktionsstellen und Aktivität des Enzyms angepasst. Die kalkulierte Enzymmenge wurde verdreifacht, um sicher zu gehen, dass genug Enzym im Ansatz vorhanden ist. Dabei ist zu beachten, dass die Glycerinkonzentration des Ansatzes nicht 5% überschreitet. Die abgeschlossene Restriktion wurde mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.3.4). Anhand der Fragmentlänge des Plasmids kann bestimmt werden, ob das TC in das Plasmid pEBTetD/ETT/TetR-TC inseriert wurde.

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Länge.

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde zuerst 0,8% Agarose in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgeköcht und anschließend in einen Schlitten mit Probenkamm gegossen. Nach dem Abkühlen wurde der Schlitten in die Elektrophoresekammer gelegt, welche mit TAE-Puffer gefüllt war. Danach wurde der Probenkamm aus dem Gel entfernt. Die DNA-Proben wurden mit Loading Dye (Verhältnis: 1:6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) versetzt und dann in die Kammern des Gels gegeben. Zusätzlich wurde noch ein 1 kilobasen Längenmarker (Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben, um die Länge der aufgetragenen DNA-Fragmente zu bestimmen. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 5 V/cm Elektronenabstand statt. Dabei wanderte die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung von der Katode zur Anode. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der DNA-Fragmente durchquerte diese die Gelporen unterschiedlich schnell. Dadurch kam es zur Auftrennung der Fragmente. Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (1 µg/mL in TAE-Puffer) für 10 Minuten bei 60 °C gefärbt. Im Anschluss wurde die Färbung mit dem UV-Tisch (Syngene BTS 26.1M, Cambridge, Großbritannien), der Licht einer Wellenlänge von 302 nm entsendet, sichtbar gemacht und fotografiert (Canon PowerShot A640, Krefeld, Deutschland).

TAE-Puffer:
40 mM TRIS
1 M EDTA
pH 8,0 mit Essigsäure einstellen

2.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Um Zellen mit DNA zu transfizieren, werden 10 mg Plasmid-DNA benötigt, weshalb nach der Plasmidaufreinigung eine DNA-Konzentrationsbestimmung folgte. Die DNA-Konzentration wurde in dieser Arbeit mit dem NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Ein Vorteil des Spektrophotometers ist, dass nur wenig Volumen (1 μ L) der aufgereinigten DNA benötigt wird. Die DNA wurde bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm gemessen, wohingegen Proteine meist ein Absorptionsmaximum von 280 nm besitzen. Daraus bildete das Gerät einen A_{260/280}-Koeffizienten. Bei einem Verhältnis von 1,8 spricht man von relativ reiner DNA, bei 2,0 von reiner RNA und bei einem Verhältnis von < 1,8 kann von Proteinverunreinigungen ausgegangen werden.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die genaue Bestätigung der TC-Insertion in das pEBTetD/ETT/TetR-TC Plasmid wurde mittels DNA-Sequenzierung der Firma GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Firma GATC nutzt hierfür das Sangerprinzip [87]. Das Prinzip basiert auf der Kettenabbruchreaktion während der PCR. Dabei werden in der PCR nicht nur dNTPs (Desoxynukleotide), sondern auch ddNTPs (Didesoxynukleotide) eingesetzt, welche die PCR-Reaktion stoppen. Wenn ddNTPs am synthetisierten DNA-Strang eingebaut wurden fehlt die 3'-OH Gruppe der Desoxyribose und das folgende Nukleotid kann nicht angebaut werden. Für die Analyse sind die ddNTPs mit spezifischen Fluoreszenzmolekülen markiert, wodurch die Basenreihenfolge der zu analysierenden DNA bestimmt werden kann. Die Auswertung der erhobenen Datensätze wird mit dem Programm „MacVector“ (Version 15.5, MacVector Inc, Spex, NC, USA) durchgeführt. Hierbei werden die Daten mit der zu erwartenden DNA-Sequenz verglichen. So wird ausgeschlossen, dass sich Mutationen im Plasmid und dem Insert befinden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung und Passage von 293 Zellen

Arbeiten mit 293 Zellen wurden in einer Reinraumwerkbank (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden autoklaviert oder mit 70% Isopropanol desinfiziert und die Lösungen steril filtriert (siehe 2.1.2).

Die Kultivierung von 293 Zellen erfolgte in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (engl. FCS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und mit 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin (NT-Medium). Bei transfizierten 293 Zellen wurde dem NT-Medium zusätzlich noch 3 µg/µL Puromycin zur Selektion hinzugefügt (Selektionsmedium). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die 293 Zellen wurden in einem mit Wasserdampf gesättigten Inkubator mit 5% CO₂ (Heraeus, Hera Cell 150, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) bei 37 °C in Plastikkulturflaschen (Tissue Culture Flask, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. War die Kulturflasche konfluent bewachsen, so wurden die 293 Zellen durch Klopfen an der Gefäßwand von dem Untergrund gelöst und verdünnt in eine neue Kulturflasche mit Selektionsmedium überführt.

Tabelle 4: Zellkulturmedien

NT-Medium	Selektionsmedium	Induktionsmedium
500 mL DMEM	500 mL DMEM	500 mL DMEM
10% FCS	10% FCS	10% FCS
100 U/mL Pen	100 U/mL Pen	100 U/mL Pen
100 µg/mL Strep	100 µg/mL Strep	100 µg/mL Strep
	3 µg/mL Puromycin	3 µg/mL Puromycin
		1 µg/mL Doxycylin

2.4.2 Transfektion von 293 Zellen

Das Einbringen von fremder DNA in Zellsysteme bezeichnet man als Transfektion. Dabei gibt es zwei verschiedene Arten von Transfektion: (1) stabile und (2) transiente Transfektion.

Bei der transienten Transfektion befindet sich das Plasmid nur temporär, bei der stabilen Transfektion dauerhaft in der transfizierten Zelle.

In dieser Arbeit wurde eine stabile Transfektion mit dem Transfektionsreagenz TurboFect (Thermo Fisher Scientific) erzeugt. Dabei binden positive Ladungen des TurboFect-Reagenz an die negativ geladene DNA, welche daraufhin durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Die Durchführung erfolgte durch Ansetzen von 1 mL DMEM, 10 mg Plasmid-DNA und 20 μ L TurboFect-Reagenz bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Der Ansatz wurde dann zu nicht transfizierten 293 Zellen mit NT-Medium in eine 75 cm² Kulturflasche gegeben. Nach 24 Stunden wurde das NT-Medium durch Selektionsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen dann auf eine 175 cm² Kulturflasche überführt und kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden nun immer mit Selektionsmedium versetzt, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

2.4.3 Aussaat von 293 Zellen

Damit die durchgeführten Experimente in einem sinnvollen Maßstab und trotzdem reproduzierbar nachgebildet werden konnten, wurden die Zellen entweder auf Polystyrolschalen (\varnothing 60 mm, Nuclon, Nunc, Wiesbaden, Deutschland), 6-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) oder 12-Well-Platten (Sarstedt) überführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Polystyrolschalen benutzt. Die 6-Well-Platten wurden für zeitlich aufwendigere Experimente verwendet (siehe 3.7) und die 12-Well-Platten für Zelleexperimente mit DHPNO₂, um DHPNO₂ einzusparen (siehe 3.2).

Für die folgenden, unterschiedlichen Bedingungen der verschiedenen Flächen wird die Schreibweise 60 mm Polystyrolschalen/ 6-Well-Platte/ 12-Well-Platte verwendet. So wurden zum Aussäen die Flächen zuerst mit Poly-L-Ornithin benetzt. Hierfür wurden 1,5 mL/ 0,75 mL/ 0,5 mL verwendet. Nach 20 Minuten wurde das Poly-L-Ornithin abgesaugt und die Schalen mit 2 mL/ 1,5 mL/ 1 mL DMEM gewaschen. Darauf folgte die Hinzugabe von 3 mL/ 1 mL/ 0,5 mL Selektionsmedium. Dann wurde eine 175 cm² Kulturflasche mit 90% bewachsenen 293 Zellen in Selektionsmedium abgeklopft und suspendiert. Von dieser Zelllösung wurden dann 1 mL/ 0,75 mL/ 0,25 mL zu den Schalen/Well-Platten hinzugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden n = 3 Schalen, bzw. Vertiefungen einer Well-Platte für eine experimentelle Bedingung ausgesät. Parallel dazu wurden, sofern nicht anders beschrieben, zu jeder experimentalen Bedingung drei Schalen ausgesät, die später zur

Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet wurden (siehe 2.4.5). Wenn die Zellen auf den Schalen/ Well-Platten zu 80% gewachsen waren, wurde die Transporterexpression durch Mediumwechsel zu Induktionsmedium (Selektionsmedium mit 1 µg/mL Doxycyclin, ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) induziert. Bei den Kontrollzellen wurde die Transporterexpression des ETT nicht induziert, dort wurde nur das Selektionsmedium gewechselt. Nach 24 Stunden der Transporterexpression wurde das jeweilige Experiment durchgeführt.

Poly-L-Ornithin-Lösung:

0,1 g/L Poly-L-Ornithin

150 mM Borsäure

pH 8,4 mit NaOH und sterilfiltriert

2.4.4 Zellaufschluss

Um nach den Experimenten das Zellinnere zu untersuchen, mussten die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu diente, wenn nicht anders beschrieben, Methanol (HPLC Grade, Chem-Solutions GmbH, Neustadt, Deutschland), welches 20 Minuten bei Raumtemperatur in den Zellschalen inkubierte. Die Menge des Methanols hing von der Größe der Schalen ab. So wurden in 60 mm Polystyrolschalen 1 mL/ 6-Well-Platten 0,6 mL/ 12-Well-Platten 0,5 mL gegeben.

Erfolgte eine HPLC-MS/MS-Analyse von intrazellulärem Glutathion (GSH), so wurden die Zellen in Methanol mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) lysiert. Dieser Schritt war notwendig, weil GSH außerhalb des Zellinnern schnell zum GSH-Disulfid (GSSG) oxidiert wird. Um dies zu verhindern und das freie zelluläre GSH zu messen, muss dieses mit DTNB, dem sogenannten Ellmans-Reagenz, derivatisiert werden. Dabei reagiert die Thiolgruppe des GSH mit dem Reagenz zu Glutathion-Thiobis-2-nitrobenzoesäure (GS-TNB) und Thiobis-2-nitrobenzoesäure (TNB) [88]. Das entstandene GS-TNB kann dann mittels HPLC-MS/MS detektiert werden. Die Zellyse erfolgte mit -20 °C kühlem Methanol + 10 mM DTNB bei 4 °C für 30 Minuten.

Zudem wurde in dieser Arbeit Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure mittels HPLC-MS/MS gemessen. Da diese beiden Stoffe in Methanol schlecht löslich sind, wurden für diese Analyse die Zellen in 4 mM Perchlorsäure (HClO₄) für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert.

Die verwendeten Zellysemittel eignen sich nicht zur Proteinbestimmung, da diese die Proteine ausfällt. Trotzdem ist ein Normierungsfaktor notwendig, um die eventuell unterschiedliche Zellzahl auf den Schalen zu berücksichtigen. Die Proteinbestimmung mittels BCA-Kit hatte sich als geeignet herausgestellt (siehe 2.4.5). Hierfür wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X-100 in 5 mM TRIS/HCl (pH 7,4) bei Raumtemperatur lysiert.

2.4.5 Proteinbestimmung mit BCA-Kit

Durch die Proteinbestimmung wurden variierende Zellzahlen, die durch experimentelle Bedingungen und Doxycyclin induzierte Proteinexpression entstehen, normiert. Zur Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit© (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Das Kit beruht auf zwei Methoden die kombiniert werden. Zum einen die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischen Lösungen, die sogenannte Biuret Reaktion. Zum anderen die farbliche Komplexbildung von Bicinchoninsäure (BCA) mit dem entstanden Cu^+ [89]. Durch chelaten Bildung von zwei BCA Molekülen mit einem Cu^+ entsteht ein lilafarbener Komplex. Dieser $\text{BCA}_2\text{-Cu}^+$ -Komplex absorbiert Licht der Wellenlänge 562 nm und kann dadurch photometrisch gemessen werden. Zu beachten ist, dass dies keine genaue Proteinendpunktbestimmung ist. Die Reaktion hängt von der Inkubationszeit zur Komplexbildung ab und kann durch längeres Inkubieren gesteigert werden. Die Komplexbildung wird zusätzlich von der Proteinstruktur, der Anzahl der Peptidbindungen und der Anzahl der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin beeinflusst [90]. Um eine Aussage über die in der Probe vorhandene Proteinkonzentration zu treffen, werden zwei unabhängig erstellte Rinderserum Albumin (BSA)-Eichreihen zum Vergleich mit bekannten Konzentrationen gemessen. Durch den Vergleich der gemessenen Probe mit denen der Eichreihe kann die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Schalen/ Well-Platten in parallelen Ansätzen den gleichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt, wie die Schalen/ Well-Platten für die LC-MS/MS Analyse. Die Proteinproben wurden in 0,1% Triton-X-100 TRIS/HCl (pH 7,4) lysiert und die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Messung wurde anschließend an dem ELISA Reader (Nano Quant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) durchgeführt.

2.5 Generierung von $^1\text{O}_2$ in 293 Zellen

Zur Generierung von $^1\text{O}_2$ in Zellen wurden verschiedene Methoden angewandt. So kamen PST zum Einsatz, wie ReAsH, TMPyP und Bengal Rosa, aber auch das spezifisch thermolytisch $^1\text{O}_2$ freisetzende DHPNO₂ (siehe 1.3). Welche Besonderheiten die einzelnen Stoffe haben und wie diese mit 293 Zellen inkubierten, wird im Folgenden beschrieben.

2.5.1 ReAsH

ReAsH ist ein diarsener Farbstoff, welcher durch Binden an ein spezifisches Tetracysteinmotiv (TC) fluoresziert (siehe 1.3.1). Jegliche Proteine können mit dem TC modifiziert werden, wodurch die Lokalisation von ReAsH bestimmt werden kann. Nach dem Diffundieren von ReAsH durch die Zellmembran mit anschließenden binden ans TC kann dieser Komplex mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Der Vorteil des Farbstoffes ist jedoch die $^1\text{O}_2$ -Generierung. Hierfür muss der ReAsH-TC-Komplex mit einer Wellenlänge von 568 nm bestrahlt werden [70].

Für mikroskopische Aufnahmen und das Generieren von $^1\text{O}_2$ durch den ReAsH-TC-Komplex wurden die transfizierten 293 + pEBTetD/ETT/TetR-TC Zellen ausgesät (siehe 2.4.3). Dabei wurden für den Belichtungsversuch 60 mm Schalen und für die floureszenzmikroskopischen Aufnahmen 22 mm (Ø) Schalen (VWR) mit Deckgläsern (AL Labortechnik, Amstetten, Deutschland) verwendet. Die ETT-Expression der Zellen wurde für 24 Stunden bei der Hälfte der Schalen durch Hinzugabe von Doxycyclin eingeschaltet. Bei der anderen Hälfte wurde das Selektionsmedium gewechselt, wobei diese Zellen der Kontrolle dienten (siehe 2.4.3). Nach weiteren 24 Stunden wurden alle Schalen mit 2 x 2 mL Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) gewaschen. Die folgenden Schritte wurden alle in Opti-MEM durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM ET (Tetrahedron, Paris, Frankreich) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und wieder gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 10 µM ReAsH (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um unspezifisches ReAsH aus den Zellen zu entfernen, wurde 2 x mit 250 µM Dimercaprol gewaschen. Im Anschluss wurden entweder floureszenzmikroskopische Bilder generiert oder ein Belichtungsversuch mit den 293 Zellen durchgeführt.

Die floureszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden generiert, um die Funktionsfähigkeit und die Spezifität dieses Systems zu überprüfen. Für die Aufnahmen wurden die Deckgläser

Material und Methoden

mit den 293 Zellen auf einen Objektträger übertragen und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DML, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) oder am Konfokalmikroskop (Olympus-Laser Conforcal Scanning Microscope FV1000D, Shinjuku, Tokio, Japan) aufgenommen. Verwendet wurde jeweils das Filter Set Texas Red.

Der Belichtungsversuch schloss an die Vorbereitungen des Aussäens, Induzierens, ET- und ReAsH-Inkubierens an, wobei Kontrollzellen ohne ReAsH inkubiert wurden. Darauf folgend wurde 2 mL PBS Puffer + 0,9 mM CaCl_2 + 0,493 mM MgSO_2 zu den Zellen hinzugegeben. Danach wurden die 60 mm Schalen 35 cm unter einer Halogenlampe (Ritos, 120 Watt Halogenfluter auf Ständertyp: 6095115AI20) im Wasserbad mit 37 °C platziert. Ein Beispiel für Belichtungsdurchführung ist für Zellen dargestellt, welche mit Begnal Rosa gefärbt wurden (Abbildung 14). Die Belichtungsdauer betrug 20 Minuten. Die Kontrollbedingungen ohne einschalten des Halogenstrahlers wurden dementsprechend angefertigt. Die getesteten Bedingungen sind im Folgenden kurz aufgelistet:

- Doxycyclin + ReAsH + Licht +
 - Doxycyclin + ReAsH - Licht +
 - Doxycyclin - ReAsH + Licht +
 - Doxycyclin - ReAsH - Licht +
 - Doxycyclin + ReAsH + Licht -
 - Doxycyclin - ReAsH + Licht -
- (+ = mit Behandlung; - = ohne Behandlung)

Alle diese Bedingungen wurden untersucht und nach dem Experiment entweder für die LC-MS/MS-Analyse in 1 mL Methanol (siehe 2.4.4) oder für die Proteinbestimmung in 1 mL 0,1% Triton-X in 5 mM TRIS (pH 7,4) lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).



Abbildung 14: Versuchsaufbau der Belichtung von PST gefärbten Zellen. Dargestellt ist beispielhaft die Belichtung mit Bengal Rosa gefärbten 293 Zellen. Die ReAsH-gefärbten Zellen wurden gleich wie die BR-gefärbten Zellen belichtet. Die 293 Zellen befinden sich im 37 °C Wasserbad in 6-Well-Platten. In 35 cm Höhe befindet sich die Halogenlampe, die für die Belichtung und somit für die Induktion der PST-Reaktion verantwortlich ist.

2.5.2 TMPyP & Bengal Rosa

TMPyP und Bengal Rosa (BR) sind häufig in Publikationen verwendete PST, welche für die $^1\text{O}_2$ -Generierung benutzt werden (siehe 1.3.1) [71]. In ihrer Funktion sind beide PST gleich, doch in ihrer chemischen Struktur sehr unterschiedlich (siehe 1.3.1; Abbildung 10, B und C).

Dabei favorisiert TMPyP aufgrund der positiven Ladung des Moleküls nach Aufnahme in die Zelle die Lokalisation im Zellkern an die negativ geladene DNA, aber auch im Zytosol und anderen Kompartimenten [72]. Der genaue Aufenthaltsort von TMPyP kann nicht kontrolliert gesteuert werden. Die optimale Anregungswellenlänge von TMPyP liegt bei 422 nm.

Die chemische Struktur von BR unterscheidet sich von der des TMPyPs. Strukturell betrachtet ist BR ein unpolares Molekül. Dadurch gelangt BR leicht in die Zelle aber akkumuliert dort hauptsächlich in Membranen, wie der Plasmamembran oder in verschiedenen Kompartimentmembranen. Die Kontrollierbarkeit ist wie bei TMPyP auch in dem BR-System nicht gegeben. Im Unterschied zu TMPyP liegt die optimale Anregungswellenlänge von BR bei 568 nm. Alle hier verwendeten PST haben gemeinsam, dass diese hauptsächlich $^1\text{O}_2$ generieren. Die Generierung der andere ROS ist aber nicht zu vernachlässigen. Ein großer Vorteil dieser Systeme liegt jedoch darin, dass ein multipler Umsatz an ROS, insbesondere von $^1\text{O}_2$, stattfindet. Die Generierung der ROS ist nur von der chemischen Reaktivität und

Material und Methoden

Stabilität der PST abhängig. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Behandlungen bei den TMPyP- und BR-Experimenten durch einen Schrägstrich TMPyP/(BR) dargestellt.

Bei den TMPyP/(BR)-Versuchen wurden die 293 + pEBTetD/ETT Zellen auf 60 mm Schalen ausgesät und nach 24 Stunden wurde die Proteinexpression des ETT durch Hinzugabe von Doxycyclin induziert. Bei den Kontrollzellen wurde lediglich das Selektionsmedium ohne Doxycyclinhinzugabe gewechselt (siehe 2.4.3). Nach weiteren 24 Stunden wurde das TMPyP-/(BR)-Belichtungsexperiment durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen auf den Schalen 3 x mit 4 mL eiskalten Krebs-Ringer-Henseleit (KRH)-Puffer gewaschen. Anschließend mit 100 µM TMPyP (Porphyrin Systems GbR, Appen, Deutschland)/(BR) und 100 µM ET in 37 °C warmen KRH-Puffer für 4/(1) Stunden im Inkubator inkubiert. Kontrollen wurden angefertigt, ohne dass zusätzliches TMPyP/(BR) in der Inkubationslösung enthalten war. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 3 x mit 4 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen. Anschließend folgte die Belichtung. Hierfür wurde den 293 Zellen 2 mL 37 °C warmer KRH-Puffer in die Schalen hinzugefügt. Die Belichtung erfolgte mit einem umgedrehten UV-Leuchttisch/ (Halogenstrahler) in einem dafür vorgesehen Stativ auf einem 37 °C warmen Wasserbad, das in 13 cm/ (35 cm) Höhe angebracht war (Abbildung 15/ (Abbildung 14)). Die Wellenlänge des UV-Leuchttisches wurde auf 365 nm eingestellt. Diese Wellenlänge lag noch in einem TMPyP anregenden Bereich, sodass $^1\text{O}_2$ freigesetzt wurde. Die Belichtungszeiten der PST für die Zeitverlaufsexperimente variierten. Dabei hat sich eine Belichtung von maximal 20 Minuten/ (3 Minuten) als Standard etabliert. Abweichungen sind in den jeweiligen Experimenten beschrieben. Kontrollen wurden auch angefertigt. Hierbei wurden die Zellen für die gleiche Zeit unter dem ausgeschalteten UV-Leuchttisch/ (Halogenstrahler) gestellt. Im Folgenden ist eine Kurzzusammenfassung der Bedingungen aufgeführt:

- Doxycyclin + TMPyP/(RB) + Licht +
 - Doxycyclin + TMPyP/(RB) - Licht +
 - Doxycyclin - TMPyP/(RB) + Licht +
 - Doxycyclin - TMPyP/(RB) - Licht +
 - Doxycyclin + TMPyP/(RB) + Licht -
 - Doxycyclin - TMPyP/(RB) + Licht -
- (+ = mit Behandlung; - = ohne Behandlung)

Nach der Belichtung wurde der KRH-Puffer abgesaugt und die Zellen lysiert. Die Zellen wurden für die LC-MS/MS Analyse in 1 mL Methanol (siehe 2.4.4) oder für die Proteinbestimmung in 1 mL Triton-Lösung lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden

Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).



Abbildung 15: Versuchsaufbau der Belichtung von TMPyP gefärbten Zellen. Dargestellt ist die beispielhafte Belichtung von TMPyP gefärbten 293 Zellen. Die Zellen befinden sich im 37 °C Wasserbad bei diesem Beispiel in 12-Well-Platten. In 13 cm Höhe befindet sich der umgedrehte UV-Leuchttisch, der für die Belichtung und somit für die Inangangsetzung der PST-Reaktion verantwortlich ist.

Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer:

25 mM HEPES (pH 7.4)
125 mM NaCl
4,8 mM KCl
1,2 mM KH_2PO_4
1,2 mM MgSO_4
1,2 mM CaCl_2
5,6 mM Glukose

2.5.3 Einfluss von Doxycyclin auf die Methionin-Sulfoxid-Bildung

Als Kontrollexperiment wurde überprüft, ob Doxycyclin einen Einfluss auf die Methionin-Sulfoxid (MSO)-Produktion hat. Doxycyclin wurde in der Literatur bereits als PST beschrieben [91]. Aus diesem Grund wurde ein Experiment mit 293 + pEBTetD/SLC22A11 durchgeführt. Das Plasmid pEBTetD/ETT konnte nicht verwendet werden, da es bei der Kultivierung zu 2-3% Hintergrundexpression [84] von ETT kommt und die transfizierten

293 Zellen ET in geringen Mengen aus dem FCS im Medium aufnehmen. Um den Einfluss von Doxycyclin unabhängig von ET zu untersuchen, wurde pEBTetD/SLC22A11 verwendet.

Für das Experiment wurden die 293 + pEBTetD/SLC22A11 Zellen auf 60 mm Schalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde Doxycyclin hinzugefügt, wobei bei den Kontrollzellen nur das Selektionsmedium gewechselt wurde (siehe 2.4.3). Nach weiteren 24 Stunden wurde ein Belichtungsexperiment mit TMPyP durchgeführt (siehe 2.5.2). Die Kontrollzellen wurden hierbei für 20 Minuten im Dunkeln gehalten. Zum Abschluss des Experiments wurden die 293 Zellen für die LC-MS/MS Analyse in Methanol (siehe 2.4.4) oder für die Proteinbestimmung in Triton lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

2.5.4 $^1\text{O}_2$ -Generierung mit DHPNO₂

Die $^1\text{O}_2$ -Generierung durch das Endoperoxid DHPNO₂ geschieht thermolytisch. DHPNO₂ ist bei -80 °C über Monate stabil. Erst ab einer Temperatur von 4 °C beginnt dieser Stoff reaktiven $^1\text{O}_2$ und reaktionsträgen $^3\text{O}_2$ abzugeben. Bei einer Temperatur von 37 °C hat DHPNO₂ eine Halbwertszeit von 23 Minuten [77]. Da DHPNO₂ nicht käuflich erwerbbar ist, wurde es für unsere Zwecke von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schmalz (Universität zu Köln, Institut für Organische Chemie) synthetisiert. Die Synthese des DHPNO₂ verlief über verschiedene Intermediate bis hin zum DHPN [74]. Dieses DHPN wurde dann bei 4 °C mit dem PST Methylenblau in einer sauerstoffreichen Atmosphäre belichtet. Dadurch reagierte $^1\text{O}_2$ über eine [4+2] Cycloaddition mit dem Naphthalinring des DHPN (Abbildung 5). Wird das Produkt DHPNO₂ erwärmt, gibt es zu 59% $^1\text{O}_2$ und zu 41% $^3\text{O}_2$ ab [77]. Der Nachteil der Anwendung dieses Systems ist, dass nur eine definierte Menge $^1\text{O}_2$ generiert werden kann. Nach der einmaligen $^1\text{O}_2$ -Abgabe eines DHPNO₂-Moleküls bleibt DHPN übrig, welches nicht länger $^1\text{O}_2$ freigibt. Der große Vorteil dieses Systems ist jedoch, dass nur $^1\text{O}_2$ und $^3\text{O}_2$ gebildet werden und nicht wie bei den PST weitere ROS. Ein weiterer Vorteil des DHPNO₂ ist, dass die Struktur gut wasserlöslich und nicht zu polar ist. Laut Literatur ist DHPNO₂ für Zelleexperimente somit die beste Wahl unter den synthetischen Endoperoxiden, um in Zellen $^1\text{O}_2$ zu generieren (siehe 1.3.2) [76].

Für Experimente mit DHPNO₂ in 293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden die Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden die ETT-Expression durch Hinzugabe von

Doxycyclin induziert. Bei den Kontrollzellen wurde das Selektionsmedium ohne Doxycyclin ausgetauscht um die ETT-Expression nicht zu induzieren (siehe 2.4.3). Nach weiteren 24 Stunden wurde das DHPNO₂-Experiment begonnen. Hierfür wurden die Zellen 3 x mit 1 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 500 µL 100 µM ET in 37 °C warmen KRH-Puffer inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift, wobei die Zellen wieder 3 x mit 1 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen wurden. Die Zellen wurden auf einem 37 °C warmen Wasserbad platziert. Eine 300 µL Lösung mit 30 mM DHPNO₂ in 37 °C warmen KRH-Puffer wurde den Zellen für 2 Stunden zugeführt. Kontrollzellen wurde mit 30 mM DHPN (abdissoziiertes DHPNO₂) in 37 °C warmen KRH-Puffer für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 x mit 1 mL eiskalten KRH-Puffer gewaschen und anschließend lysiert. Für die LC-MS/MS Analyse wurden die Zellen in 0,5 mL Methanol (siehe 2.4.4) oder für die Proteinbestimmung in Triton lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

2.6 Potentielle Indikatormoleküle für ¹O₂

Damit der ¹O₂-Effekt auf Zellen eindeutiger validiert werden kann wurden weitere ¹O₂-Indikatormoleküle, abgesehen von MSO, untersucht. Hierfür wurden drei verschiedene Methoden angewandt: (1) die gezielte *in vitro* Suche nach Indikatoren durch Reaktionen von in der Literatur beschrieben Molekülen mit ¹O₂ [43], (2) durch den ungerichteten ¹O₂-Stress auf 293 Zellen mit anschließender Analyse der Zelllysate, oder (3) durch Hinzugabe von exogenen TEMP in Zellen, welches spezifischen mit ¹O₂ reagiert. Im Folgenden werden alle drei Vorgehensweisen genauer beschrieben.

2.6.1 Gezielte ¹O₂-Indikatorsche

Die gerichtete ¹O₂-Indikatormolekülsuche zielt darauf ab, die ¹O₂-Produkte mit Hilfe in der Literatur bereits beschrieben ¹O₂-quencheden Molekülen zu identifizieren [43]. Hierfür wurden jeweils in separaten Ansätzen 100 µM Desoxyguanosin, Histidin, Cystein, Tryptophan, Tyrosin oder Harnsäure mit 10 mM DHPNO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle diente Methionin, welches mit ¹O₂ zu MSO reagiert.

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde für 60 Minuten bei 37 °C auf dem Thermoschüttler (Eppendorf Thermomixer Compact) inkubiert. Als Referenz dienten Ansätze mit den jeweiligen $^1\text{O}_2$ -Quenchern, die für 60 Minuten auf Eis also 0 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS. Hierbei wurde von den Proben zuerst eine Analyse im Fullscanmodus durchgeführt (siehe 2.11.2). Im Fullscan identifizierte rote Signale (Intensität in den 60 Minuten Proben höher als in den 0 Minuten Proben) wurden daraufhin mit Hilfe des Produktionenscan fragmentiert und die Fragmentmuster analysiert (siehe 2.11.5). Das gewonnene Fragmentmuster wurde dann mit der Datenbank „Metlin“ [92] verglichen oder durch plausibles Erklären der Fragmente selbst interpretiert. Sofern die Molekülidentität geklärt werden konnte, wurde das identifizierte Molekül mit Fragment in eine SRM-Methode überführt und auf der Säule mit den Laufmitteln, wie es im Fullscan gefunden wurde, gemessen.

2.6.2 Ungerichtete $^1\text{O}_2$ -Indikatorsuche

Bei der ungerichteten $^1\text{O}_2$ -Indikatormolekülsuche wurde die Reaktion von nicht definierten Molekülen mit $^1\text{O}_2$ herbeigeführt. Hierbei wurden 293 Zellen, wie in 2.5.2 (TMPyP) beschrieben, vorbereitet. Die resultierenden Zelllysate wurden daraufhin mit Hilfe des Fullscanmodus (siehe 2.11.2) analysiert und wie in 2.6.1 verfahren. Danach wurde das identifizierte $^1\text{O}_2$ -Produkte quantitativ analysiert und mit unbelichteten Kontrollen verglichen.

2.6.3 TEMP, TEMPO

Einen Sonderfall stellt das Molekül TEMP dar. Es ist ein exogenes Molekül, welches spezifisch mit $^1\text{O}_2$ zu dem stabilen Radikal TEMPO reagiert (siehe 1.4). In Anwesenheit von Reduktionsmittel, wie Ascorbinsäure oder Glutathion können diese stabilen Radikale zu TEMPOH reduzieren werden. Um TEMP als spezifischen $^1\text{O}_2$ -Indikator nutzen zu können, müssen alle $^1\text{O}_2$ -Produkte, wie TEMPO, TEMPOH oxidiert und reduziert, untersucht werden (Abbildung 12).

Wenn nicht anders beschrieben, wurden 293 Zellen + pEBTetD/ETT wie in 2.4.3 beschrieben auf 6-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden vor dem Experiment wurde die ETT-Expression mit Doxycyclin induziert. Kontrollen wurden ohne Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit 2 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen und für 4 Stunden mit 1 mL

20 mM TEMP, 100 μ M ET und 100 μ M TMPyP in 37 °C warmen KRH-Puffer inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 3 x mit 2 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen und für die Belichtung mit 1 mL in 37 °C warmen KRH-Puffer versetzt. Die Belichtung erfolgte mit dem UV-Leuchttisch für 20 Minuten (siehe 2.5.2, TMPyP). Danach wurde der KRH-Puffer abgenommen und die Zellen in Methanol lysiert (siehe 2.4.4). Die verschiedenen Bedingungen wurden mittels LC-MS/MS bezüglich der TEMP-, TEMPO- und TEMPOH-Konzentration analysiert. Die optimalen Messbedingungen der Moleküle wurden zuvor mit Hilfe des Tunemodus und der Methodenoptimierung bestimmt (siehe 2.11.4). Die entstanden Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

2.7 Inhibition der Methionin-Sulfoxid-Reduktase durch Iodoacetamid

Das in dieser Arbeit als Oxidativerstressmarker verwendete MSO kann durch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase (MSR) zurück zu Methionin regeneriert werden [93]. Da 293 Zellen dieses Enzym exprimieren [94] und der intrazelluläre MSO-Gehalt als Indikator nach einem Belichtungsexperiment entscheidend ist, sollten Techniken etabliert werden, um die MSR zu hemmen. In der Literatur wurde bisher kein spezifischer Inhibitor erwähnt. Moskovitz *et al.* haben mit Hilfe von *in vitro* Experimenten versucht, die MSR mit Iodoacetamid zu inhibieren [95]. Der Mechanismus beruht auf der Alkylierung von Cysteinresten. Dadurch wird der Cysteinrest im aktiven Zentrum der MSR irreversibel alkyliert, wodurch die MSR inhibiert wird. Ein Nachteil dieses Mechanismus ist, dass Iodoacetamid unspezifisch mit Enzymcysteinresten interagiert. Iodoacetamid reagiert zusätzlich langsamer im Vergleich zu Cysteinresten mit Histinresten [96]. Insgesamt kann es dadurch zu einem erheblichen Zellschaden bis hin zum Zelltod kommen, da jegliche Enzyme mit Cystein oder Histidin im aktiven Zentrum inhibiert werden.

Bei den Versuchen mit Iodoacetamid wurden die 293 Zellen + pEBTetD/ETT, wie in 2.4.3 beschrieben, auf 60 mm Schalen ausgesät und die ETT-Expression durch Hinzugabe von Doxycyclin induziert. Nach 24 Stunden wurde 3 x mit 4 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen und 2 mL 10 mM Iodoacetamid in 37 °C warmen KRH-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Kontrollen wurden mit 37 °C warmen KRH-Puffer ohne Iodoacetamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Belichtungsexperiment, wie in 2.5.2 für TMPyP beschrieben,

durchgeführt. Hierbei wurde dann zwischen den folgenden Bedingungen die MSO-Generierung verglichen:

- Iodoacetamid + TMPyP + Licht +
 - Iodoacetamid - TMPyP + Licht +
 - Iodoacetamid - TMPyP - Licht +
 - Iodoacetamid - TMPyP + Licht -
- (+ = mit Behandlung; - = ohne Behandlung)

Die Belichtungszeit mit UV-Licht betrug für TMPyP 20 Minuten. Für die LC-MS/MS Analyse wurden die Zellen in 1 mL Methanol lysiert (siehe 2.4.4). Die entstandenen Methanolzelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

2.8 Minimierung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quenchern

Um den ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ mit verschiedenen endogenen $^1\text{O}_2$ -Quenchern zu vergleichen und herauszustellen, wurden verschiedene Methoden getestet um die anderen $^1\text{O}_2$ -Quencher zu minimieren. Hauptsächlich zielten diese Methoden auf die Minimierung von intrazellulärer Ascorbinsäure (ASC) und Glutathion (GSH) ab.

2.8.1 Ascorbinsäure

ASC ist ein bereits gut bekanntes und wichtiges Antioxidans für Zellen [97]. Bei der Reaktion wird ASC sehr schnell zu Dehydroascorbinsäure (DHS) oxidiert und kann durch einen Regenerationskreislauf mit GSH und Vitamin E zurück zu ASC reduziert werden [98]. In der Literatur beschriebene Möglichkeiten zur Minimierung von ASC sind durch Ni(II)SO_4 und Co(II)Cl_2 . Ihre Wirkung beruht, laut Literatur, nicht auf der direkten Oxidation von ASC zu DHS, sondern auf der intrazellulären Metallbindung und dadurch auf dem durch das Metall induzierten Stress, der zur Oxidation und hydrolytischen Reaktionen führt. ASC soll genau gegen diese Aspekte schützen. Außerdem ist der Transport von ASC in die Zelle durch Einsatz von Co(II) und Ni(II) gehemmt, wodurch ASC nicht mehr aus dem Nährmedium aufgenommen wird [99]. Ein weiterer Ansatz, ASC zu minimieren, war die Verwendung von TEMPO, da TEMPO mit ASC sehr schnell zu TEMPOH und DHS reagieren [100]. Durch diese verschiedenen Behandlungen sollte ASC der Zelle nicht mehr als Antioxidans zur Verfügung stehen.

Die Durchführung der ASC-Minimierungsexperimente begann mit dem Aussäen von nicht transfizierten 293 Zellen für vier verschiedene experimentelle Ansätze in 60 mm Schalen (2.4.3).

- 0,25 mM Co(II)Cl₂,
- 0,5 mM Ni(II)SO₄,
- 0,5 mM TEMPO
- nur NT-Medium

Diese vier NT-Medien mit den unterschiedlichen Zusätzen wurden jeweils den ausgesäten 293 Zellen hinzugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation mit den verschiedenen Additiven wurden die Zellen 3 x mit 4 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen und in 1 mL 4 mM HClO₄ für die LC-MS/MS Analyse (siehe 2.4.4) oder in Triton für die Proteinbestimmung lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden HClO₄-Zelllysate wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

2.8.2 Glutathion

GSH ist eines der Hauptantioxidantien, welches intrazellulär Konzentrationen von 5 - 10 mM erreicht [101]. Es ist ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Die GSH-Synthese ist ein zweistufiger Prozess. Hierbei entsteht zunächst γ -Glutamylcystein indem Glutaminsäure mit Cystein reagiert [102]. Diese Reaktion wird durch die γ -Glutamylcysteinsynthase katalysiert. Im zweiten Schritt wird dann Glycin unter der Katalyse der Glutathionsynthase addiert. In der Zelle liegt GSH als Thiol vor, weshalb es schnell autooxidiert und dabei Disulfidbrücken mit einem anderen GSH-Molekül ausbildet [103]. Das Glutathiondisulfid kann durch einen Regenerationsprozess wieder zu GSH reduziert werden [98].

Zum Minimieren der intrazellulären GSH-Konzentration sind in der Literatur zwei Wege beschrieben: Zum einen kann die intrazelluläre GSH-Konzentration durch Hemmung der GSH-Synthese gesenkt werden, zum anderen durch eine direkte Reaktion des freien, bereits gebildeten GSH. Die Hemmung der GSH-Synthese kann mit Hilfe von Buthioninsulfoximin (BSO) erfolgen (Abbildung 16, A). Dabei hemmt BSO das Schlüsselenzym der GSH-Synthese, die γ -Glutamylcysteinsynthase [104]. Die Reaktion des freien GSH erfolgt mit Diethylmaleat (DEM). Hierbei handelt es sich um einen

Maleinsäurediethylester, der eine Reaktion mit GSH am Schwefel induziert, wodurch GSH der Zelle nicht mehr zur Verfügung steht (B) [105].

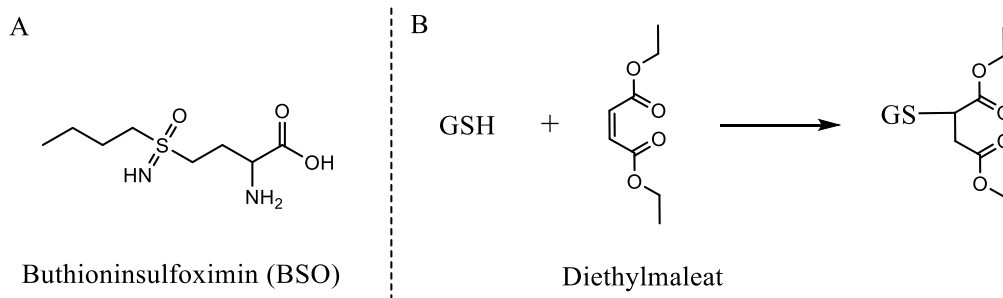


Abbildung 16: Chemische Struktur von Buthioninsulfoximin (A) und Reaktion von GSH mit Diethylmaleat (B)

Beide Methoden wurden in dieser Arbeit einzeln und kombiniert durchgeführt und verglichen. Dafür wurden 293 + pEBTetD/ETT Zellen auf Schalen/ 6-Well-Platten (TMPyP-Zeitverlaufexperiment)/ 12-Well-Platten (DHPNO₂-Experimente) ausgesät und nach 24 Stunden wurde die Proteinexpression des ETT durch Doxycyclinhinzugabe induziert (siehe 2.4.3). Zusätzlich startete die BSO-Behandlung der 293 Zellen additiv oder parallel zur Doxycyclin induzierten Proteinexpression. Dabei wurde dem Selektionsmedium oder Induktionsmedium, je nach Bedingung, zusätzlich 50 µM BSO hinzugegeben. Bei den Kontrollzellen wurde das Selektionsmedium gewechselt ohne Hinzugabe von BSO. Dadurch wurden vier Bedingungen generiert:

- Doxycyclin + BSO +
 - Doxycyclin + BSO -
 - Doxycyclin - BSO +
 - Doxycyclin - BSO -
- (+ = mit Behandlung; - = ohne Behandlung)

Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen 3 x mit 4 mL eiskaltem KRH-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die BSO(+) Zellen mit 5 mM DEM in 37 °C warmen KRH-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur versetzt. Die BSO(-) Zellen wurden in KRH-Puffer ohne DEM inkubiert. Die Zellyse zur Analyse mittels LC-MS/MS wurde, wie in 2.4.4 beschrieben, mit Methanol + 10 mM DTNB durchgeführt, um freies GSH zu derivatisieren und messen zu können (siehe 2.4.4). Parallel wurde ein weiterer Zellansatz für die Proteinbestimmung in Triton lysiert (siehe 2.4.5). Die entstanden Methanolzellysate

wurden daraufhin mittels SRM mit den Fragmentübergängen und Bedingungen aus Tabelle 7 quantifiziert (siehe 2.11.6).

Als besonders effektive Methode zur Minimierung der intrazellulären GSH-Konzentration hat sich eine Kombination aus 50 μM BSO und 5 mM DEM erwiesen. Deswegen wurden diese Konzentrationen für Belichtungsexperimente mit und ohne GSH-Minimierung gewählt (siehe 3.5.2). Diese zusätzliche Vorbehandlung der 293 Zellen mit BSO und DEM wurde in den Belichtungsexperimenten angewendet, wie in 2.5.2 oder 2.5.4 beschrieben.

2.9 Herstellung von Hercynin

Hercynin (HER) ist ein mit ET verwandtes Molekül, welches sich durch den fehlenden Schwefel am Imidazolring unterscheidet (Abbildung 17). HER war nicht käuflich erwerbbar, weswegen eigens mit Mhmd Oumari eine Synthese von HER durchgeführt wurde [106].

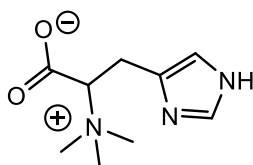


Abbildung 17: Strukturformel von Hercynin

Für die HER-Synthese wurden 60 mg N,N-Dimethylhistidin (Bachem, Bubendorf, Schweiz) zusammen mit 60 μL Iodmethan, 100 μL Ammoniak (28%) und 1,26 mL Methanol in einem 50 mL Reaktionsgefäß gemischt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden bei 300 UpM auf einem Schüttler (Typ VXR, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Lösungsmittel unter Atmosphärendruck verdampft und anschließend in 1,5 mL H_2O aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte über eine Kieselgelchromatographie, um Edukt und Nebenprodukte von HER abzutrennen. Hierbei wurde Kieselgel (Fluka) als stationäre Phase gewählt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Gründemann haben eine gute Abtrennung von Nebenprodukten zum Produkt mittels Dünnschichtchromatographie ergeben. Für die Aufreinigung wurde Kieselgel in eine 50 mL Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gegeben. Aufgefüllt wurde diese mit Säure gereinigter und geglühter Seesand (Merck) und als Laufmittel wurde Methanol/ H_2O /Ammoniak (28%) (10/2/1) verwendet. Die Chromatographie wurde mit Gravitationsfluss durchgeführt. Eine Fraktionierung erfolgte in 2 mL

Reaktionsgefäßen, wobei jede 5. Fraktion mittels Dünnschnittchromatographie (Kieselgel 60 F₂₅₄ Plastikblätter 20 x 20, Merck, Darmstadt, Deutschland) analysiert wurde. Als Laufmittel wurde wieder Methanol/H₂O/Ammoniak (28%) (10/2/1) verwendet. Danach wurde das Edukt (Negativkontrolle) und das 2005 synthetisierte HER (Positivkontrolle) aufgetragen.

Die erste bis letzte Fraktion, die mit der Positivkontrolle übereinstimmte wurden vereint und das Laufmittel unter Atmosphärendruck über Nacht verdampft. Die Kristalle wurden mittels Dimethylether und Methanol über Nacht umkristallisiert und die Lösungsmittel anschließend erneut unter Atmosphärendruck verdampft. Die entstandenen reineren Kristalle wurden abgewogen und eine Ausbeute von 80% bestimmt. Danach wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Reinheit mittels LC-MS/MS bestimmt.

2.10 *In vitro* Reaktion von ¹O₂ mit Ergothionein oder Hercynin

Für die *in vitro* Reaktion von ¹O₂ mit ET oder HER wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet. Alle Ansätze wurden mit 100 µM ET oder HER in braunen Polypropylenreaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) bei 37 °C in H₂O angefertigt. Dabei wurde ein Volumen von 100 µL angesetzt. Bei einigen Ansätzen wurden noch zusätzliche Bedingungen getestet. Hierbei handelte es sich um TRIS (5 und 25 mM; pH 7,4), GSH (0,1, 1 oder 5 mM) oder ASC (0,1, 1 oder 5 mM; pH 7,4). Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Reaktion nach Hinzugabe von eiskaltem 10 mM DHPNO₂ gestartet. Ein Experiment wurde mit einem Reaktionsansatz mit 1 mM DHPNO₂ im Vergleich zu 10 mM DHPNO₂ durchgeführt. Für Fullscananalysen wurden die Reaktionsansätze für 0 und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (siehe 2.11.2). Die Daten aus den Fullscananalysen wurden mittels Differenzabtönung visualisiert (siehe 2.11.3). Ein Produktionscan der identifizierten roten Signale liefert das zugehörige Fragmentmuster (siehe 2.11.5). Das Intensitätsstärkste Fragment wurde dann in eine SRM-Methode übertragen (siehe 2.11.6). Ein Zeitverlauf wurde mit den Zeitpunkten 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten angefertigt und anschließend mittels SRM analysiert. Kontrollen wurden zusätzlich angefertigt, entweder mit DHPN im Reaktionsansatz oder ohne DHPNO₂. Nach den beschriebenen Inkubationszeiten wurden die Reaktionen durch Hinzugabe von 100 µL eiskaltem H₂O gestoppt und die Reaktionsansätze auf Eis gelagert. Die Zeitpunkte bei 0 Minuten inkubierten direkt auf Eis.

Parallel wurden Ansätze mit TMPyP als PST zur Generierung von ¹O₂ und dessen Reaktion mit ET oder HER getestet. Dafür wurden Ansätze mit 100 µM ET und TMPyP (10 oder

100 μM) in 300 μL inkubiert. Die Reaktion fand in 12-Well-Platten aus Polystyren (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) auf einem Schüttler (300 UpM) bei Raumtemperatur statt. Gestartet wurde durch Anschalten des UV-Tischs, welcher umgedreht auf einem Stahlgerüst positioniert war (Abbildung 15; modifiziert mit Schüttler statt Wasserbad). Die Belichtungsdauer betrug 20 Minuten. Kontrollen wurden ohne TMPyP oder bei ausgeschaltetem UV-Tisch angefertigt. Anschließend wurden die Proben mittels LC-MS analysiert (siehe 2.11.3). Für jeden Analyten wurde die Fläche der Intensität über die Zeit des Peaks integriert.

2.11 Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie

Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Analyseverfahren Hochflüssigkeitschromatographie-Tandem Massenspektroskopie (LC-MS/MS) ist eine Kombination aus einer HPLC-Anlage (SLC-20AD Prominence, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) und einem Massenspektrometer (Q Trap 4000, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland). Es ermöglicht die massenspektrometrische Analyse von aufgetrennten Substanzgemischen durch eine HPLC-Säule.

Bei dem Verfahren der HPLC handelt es sich um eine Interaktionschromatographie. Die Substanzen werden über eine HPLC-Säule aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der Säule getrennt. Besteht eine starke Wechselwirkung zwischen Analyt mit der stationären Phase der Säule, so wird dieser langsamer durch die mobile Phase von der Säule abgetragen. Die Retentionszeit ist höher. Zum Beispiel hat ein polares Molekül auf einer HILIC-Säule (hydrophilic interaction liquid chromatography) eine höhere Retentionszeit als ein hydrophobes Molekül. Die in dieser Arbeit verwendeten Säulen sind in Tabelle 5 gelistet. Nach der Auftrennung der Analyten durch die HPLC gelangen diese mit unterschiedlichen Zeiten in das Massenspektrometer.

Tabelle 5: HPLC-Säulen

Säule	Hersteller	Vorsäule	Abmessung
ZIC-HILIC	Dichrom, Marl, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 x 100 mm
HILIC	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 50 mm
DC18	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 100 mm
T3	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 100 mm
ZIC-pHILIC	Dichrom, Marl, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 x 100 mm
xBridge Shield RP18	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 3,5 µm, Ø 3 x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 100 mm

2.11.1 Aufbau und Arbeitsweise eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

Die durch HPLC aufgetrennten Eluenten des Stoffgemischs gelangen nun ins Massenspektrometer. Dort durchlaufen diese die drei verschiedenen Komponenten des Triple-Quadrupol-MS: Die Ionenquelle, der Massenanalysator und den Massendetektor. In der Ionenquelle werden die Moleküle durch Spannung in Ionen überführt. Der Massenanalysator sortiert diese Ionen bei deren Masse-zu-Ladung (m/z) Verhältnis in einem angelegten elektromagnetischen Feld. Der Detektor nimmt das Signal auf, wandelt es um und berechnet die Intensität des Massenspektrums (Abbildung 20) [107].

Die Ionenquelle des in dieser Arbeit verwendeten Systems Q TRAP 4000 MS ist eine Elektronenspray-Ionisierung (ESI). Die ESI ist verantwortlich für die Zerstreuung des flüssigen Analyten in viele geladene Tröpfchen mit der Hilfe eines elektrostatischen Feldes. In dem elektrostatischen Feld werden die Ionen in die Gasphase unter Atmosphärendruck überführt. Die Ionisierung der Eluenten kann in 4 Prozessteile gegliedert werden. (1) Zuerst werden kleine geladene Tropfen der zu analysierenden Flüssigkeit gebildet. (2) Danach wird durch Erhitzen das Lösungsmittel in den geladenen Tropfen verdampft, wodurch die Ladungsdichte der Tropfen ansteigt. (3) Aufgrund der Ladungsdichte kommt es zur Coulomb-Explosion, wobei die kleinen Tropfen in kleinere stabilere Mikrotropfen zerfallen. (4) Das Lösungsmittel ist komplett von den zu analysierenden Ionen entfernt und diese werden zum Massenanalysator überführt (Abbildung 18) [107].

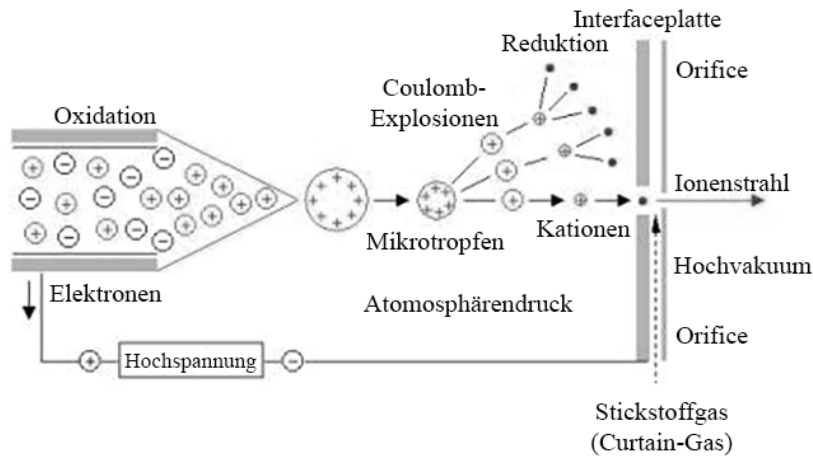


Abbildung 18: Elektrospray-Ionisation. Dargestellt ist der Reaktionsablauf an der Elektrospray-Ionisations (ESI)-Quelle. Die Eluenten kommen an der ESI-Quelle an. Durch die Angelegte Hochspannung und Temperatur gehen die Ionen aus der Flüssigkeitsphase in die Gasphase über. Die steigende Ladungsdichte in den Tropfen führt zu einer Coulomb-Explosion, wobei kleinere stabilere Mikrotropfen entstehen. Das Lösungsmittel wird während des kompletten Vorganges durch die hohen Temperaturen von 400 °C vollkommen verdampft und die übrig bleibenden Ionen kommen an der Interfaceplatte an und gehen dort in das Massenspektrometer über. Modifiziert nach [108].

Die geladenen Analyten gelangen zum ersten von drei Quadrupolfiltern (Q1), welcher als erster Massenfilter dient. Dabei lässt der Massenfilter nur Ionen mit einer bestimmten m/z durch. Die drei Quadrupole arbeiten bei Hochvakuumbedingungen. Ein Quadrupolfilter besteht aus vier parallelen Metallstäben mit dem gleichen diagonalen Abstand zueinander und einer angelegten elektrischen Spannung. Durch die vier elektrisch miteinander verbundenen Stäbe kann ein elektrisches Feld aus Gleich- und Wechselspannung erzeugt werden, wodurch ein Ion mit dem geeigneten m/z Verhältnis auf einer stabilen oszillierenden Bahn durch den Quadrupol fliegt. Alle anderen Ionen mit anderen m/z Verhältnissen fliegen auf instabilen Kurven und kollidieren mit den Metallstäben des Massenfilters, wobei diese sich entladen (Abbildung 19) [109].

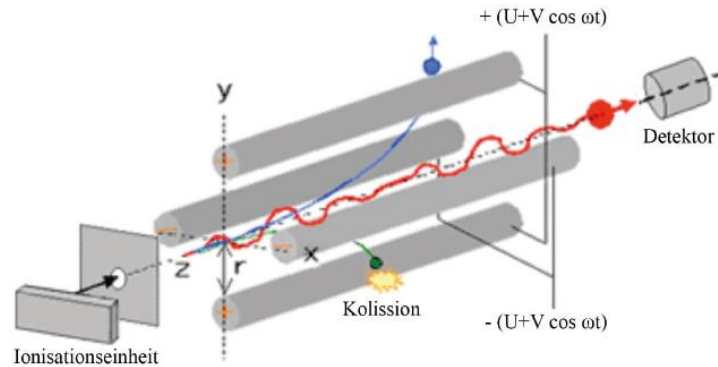


Abbildung 19: Flugbahn eines Ions durch einen Massenquadrupolfilter. Nachdem das Ion die Interfaceplatte durchquert hat kommt es zum Quadrupolfilter. Dieser besteht aus vierparallelen Stäben, an denen entgegengesetzte Wechsel- und Gleichstromspannungen angelegt sind. Die angelegten Spannungen lassen nur ein bestimmtes Ion mit der eingestellten m/z den Quadrupol passieren (rote Flugbahn). Andere Ionen weichen von der Oszillationsbahn ab und kollidieren mit den Stäben, wo diese dann entladen werden. Modifiziert nach [110].

Nachdem das ausgewählte Ion Q1 durchfliegen konnte, gelangt es zum zweiten Quadrupol (Q2; Abbildung 20). Dort wird es in der Kollisionszelle fragmentiert. In diesem Quadrupol kollidiert das Ion dann mit Stickstoffgas, wodurch es in ein für jedes Ion unterschiedliches Fragmentmuster zerfällt. Die Fragmentmuster basieren auf der molekularen Struktur der gemessenen Muttermasse und sind spezifisch für jedes Molekül. Die gemessenen Fragmente einer Muttermasse können mit Referenzmustern verglichen werden und führen so zu der genauen Identifizierung und quantitativen Analyse des gemessenen Analyten [111].

Die spezifischen Fragmente werden dann durch den zweiten Massenfilter (Q3) aufgrund ihrer m/z und der dementsprechenden stabilen Flugkurve geleitet. Dabei ist Q3 genauso wie Q1 aufgebaut. Nach dem Durchfliegen von Q3 erreichen die spezifischen Fragmente dann den Detektor. Durch die Kollision der Ionen mit dem Detektor wird ein Elektronenstrom freigesetzt. Diese Elektronenstromfreisetzung der einzelnen Ionen wird dann gesammelt und in ein digitales Signal überführt [111].

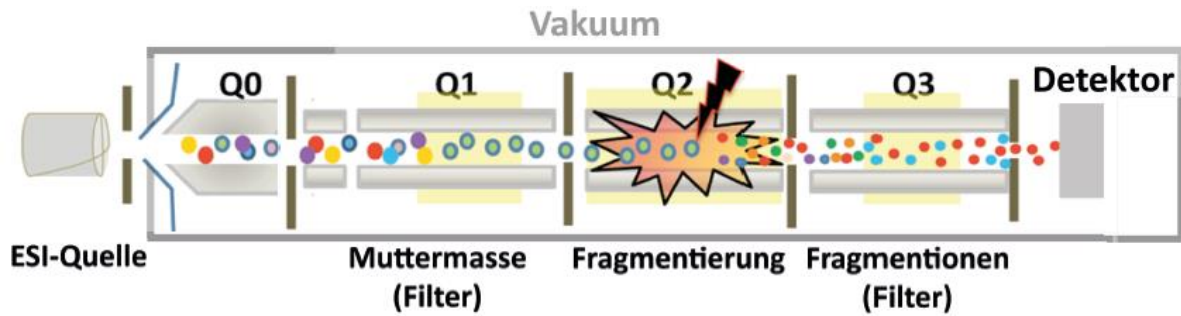


Abbildung 20: Aufbau eines Massenspektrometers. Die Eluenten kommen an der ESI-Quelle an. Dort werden diese ionisiert und in Q0 beschleunigt. Den ersten Massenfilter (Q1) passieren nur Ionen mit den entsprechenden m/z -Verhältnissen. In Q2 kommt es dann zur Kollision mit einem Stickstoffstrom, wodurch das Mutterion fragmentiert wird. Nur die entstandenen Fragmente mit dem spezifischen m/z Verhältnis passieren, nach entsprechender Einstellung, den zweiten Massenfilter (Q3). Danach erreicht ein Fragment den Detektor. Dort wird ein Elektronenstrom freigesetzt und dieser wird daraufhin in ein digitales Signal umgewandelt. Modifiziert nach [112].

2.11.2 Fullscan

Bei einer Fullscan (FS)-Analyse werden alle Moleküle in einem Reaktionsansatz in einem definierter m/z -Bereich detektiert, es kommt nicht zur Fragmentierung in Q2. In dieser Arbeit liegt dieser Bereich bei 50 - 650 m/z . Dabei wird dann die Intensität der in der Lösung vorkommenden Moleküle bestimmt. Das Auftragen von Intensität wird Totalionenchromatogramm genannt. Die gemessenen Massen lassen sich auch durch ein reduziertes Ionenchromatogramm erfassen, wobei die Signalintensität einer bestimmten Masse herausgezogen werden kann. Dieses Verfahren ist weniger sensitiv als die Analyse mittels Selected Reaction Monitoring (SRM), weil nur eine Muttermasse analysiert wird. Diese kann bei verschiedenen Molekülen identisch sein. Jedoch bietet der Fullscan erste Hinweise, welche Moleküle bei verschiedenen Bedingungen gemessen werden. Dabei werden in der Arbeitsgruppe Gründemann standardmäßig fünf verschiedene Säulen mit unterschiedlichen Laufmitteln getestet (Tabelle 6). Zusätzlich werden noch unterschiedliche Ionisierungen, also positiv oder negativ, durch das Massenspektrometer festgelegt. Die erzeugten Rohdaten der Fullscans können mittels LC-MS Differenzabtönung analysiert werden (siehe 2.11.3).

Tabelle 6: HPLC-Konditionen für Fullscananalysen bei verschiedenen Säulen.

Säule	DC18	HILIC	ZIC-HILIC	xBridge	ZIC-pHILIC
Scan-Modus	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
Laufmittel A	0,1% Ams in H ₂ O	0,1% Ams in H ₂ O	10 mM Af pH 3,75	10 mM Aa pH 8.9	10 mM Aa pH 8.9
Laufmittel B	0,1% Ams in Acn	0,1% Ams in Acn	MeOH	MeOH	Acn
Flussrate	0,3 mL/min	0,3 mL/min	0,2 mL/min	0,2 mL/min	0,2 mL/min
Gradient	10% B bei 0 min; 10% B bei 0,25 min, 80% B bei 6 min, 10% B bei 9 min	0% B bei 0 min, 90% B bei 0,5 min, 10% B bei 9 min, 10% B bei 10 min, 90% B bei 14 min	70% B bei 0 min, 70% B bei 0,5 min, 30% B bei 9 min, 30% B bei 10 min, 70% B bei 14 min	30% B bei 0 min, 30% B bei 0,5 min, 70% B bei 9 min, 70% B bei 10 min, 30% B bei 14 min	70% B bei 0 min, 70% B bei 0,5 min, 30% B bei 9 min, 30% B bei 10 min, 70% B bei 14 min
Laufdauer	11 min	15 min	15 min	15 min	15 min
Injektions- volumen	20 µL	10 µL	20 µL	10 µL	10 µL
Temperatur	35 °C	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C

Aa = Ammoniumacetat (VWR); Acn = Acetonitril (Chem-Solutions); Af = Ammoniumformiat (Fluka);
Ams = Ameisensäure (Fluka); MeOH = Methanol (Chem-Solutions)

2.11.3 Differenzabtönung

Die Rohdaten des Fullscans wurden für die Differenzabtönung zuerst in *.jdx* Dateien mit dem Programm Analyst 1.6.3 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) überführt. Anschließend erfolgte die Konvertierung der Daten mit dem Programm „*DS DataConvert*“ (Version 1.6) in *.bd* Dateien, welche mit dem Programm *DS FullView* ausgewertet werden konnten. Beide Programme wurden von Prof. Dr. Gründemann (Zentrum für Pharmakologie, Universität zu Köln) geschrieben [16].

Die umgewandelten Daten können nun in drei Dimensionen dargestellt werden: *m/z* (x-Achse), Retentionszeit (y-Achse) und Intensität (z-Achse). Zu beachten ist hierbei dass die dargestellte Intensität nur ein relativer Wert ist. Denn hierbei werden die Daten von zwei verschiedenen Datensätzen übereinandergelegt. Die dargestellten Intensitäten werden im 8 Bit Farbmodell abgebildet. Die Übereinanderlagerung der Bilder zeigt bei maximalen Intensitäten weiße und bei minimalen Intensitäten schwarze Farbe im Bild. Dazwischen führen verschiedene Molekülintensitäten zu unterschiedlichen Grauabstufungen der Signale, welche daraufhin analysiert werden können. Ein Beispiel hierfür sind zwei Datensätze von ET-Reaktionsansätzen, welche mit und ohne DHPNO₂ inkubieren. Die durch Reaktion von ¹O₂ mit ET entstandenen Moleküle würden dann rot und die verbrauchten Moleküle, in dem Fall ET, würden türkis dargestellt werden (Abbildung 42). Aus dieser Analyse können *m/z* der Mutterionen und die Retentionszeiten der verschiedenen Stoffe bestimmt werden. Diese können daraufhin zur genaueren Analyse mittels Produktionenscan identifiziert werden.

2.11.4 Tunemodus und Methodenoptimierung

Der Tunemodus des Massenspektrometers ist für die Identifikation der optimalen Messbedingungen eines Mutterions verantwortlich. Hierbei wird eine möglichst reine Substanz mittels einer Spritze direkt in das Massenspektrometer - ohne HPLC-Auftrennung - gegeben. Diese Substanz kann dann anhand der Muttermasse identifiziert und anschließend mit verschiedenen Kollisionsenergien fragmentiert werden. Dabei ist zu beachten, ob die Substanz besser positiv oder negativ ionisiert wird. Da die Fragmente bei verschiedenen Kollisionsenergien unterschiedlich gebildet werden, bestimmt das Gerät automatisch die optimalen Fragmentierungsbedingungen der sechs dominantesten Fragmente des Mutterions und speichert diese in einer Methode.

Anschließend werden verschiedene HPLC-Bedingungen getestet mit denen der zu messende Stoff am besten aufgetrennt wird. Dabei werden verschiedene Laufmittelkombinationen und Säulen verwendet, welche in Tabelle 6 für Fullscananalysen stehen. Die dort genannten Konditionen können, unter Berücksichtigung der jeweiligen Säuleneigenschaften, verschieden kombiniert werden. Durch den Tunemodus und die Methodenoptimierung konnten in dieser Arbeit Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, TEMP und TEMPO mittels LC-MS/MS gemessen werden.

2.11.5 Produktionenscan

Der Produktionenscan (MS^2)-Scan ist zur genauen Identifizierung eines zu analysierenden Moleküls geeignet. Dabei wird ein Molekül mit einer bestimmten m/z durch Q1 selektiert. Danach wird es in Q2 fragmentiert, wie in 0 beschrieben. Doch statt ein bestimmtes Fragment Q3 passieren zu lassen, werden alle Fragmente von m/z 50 bis zur in Q1 selektierter Muttermasse detektiert.

Das beispielsweise im Fullscan detektierte Mutterion kann durch den MS^2 -Scan in ein Molekül-spezifisches Fragmentmuster überführt werden. Danach kann das Fragmentmuster mit Datenbanken wie Metlin [92] oder durch plausible Erläuterung der entstandenen Fragmente des Fragmentmusters einem Molekül zugeordnet werden. So ist eine Strukturaufklärung unbekannter Substanzen möglich. Weiterhin können die Fragmente aus dem Fragmentmuster in einen Selected Reaction Monitoring (SRM)-Methode übertragen werden, wodurch das Mutterion genauer quantifiziert werden kann als im Fullscan, da die Quantifizierung auf einem spezifischen Fragment beruht.

2.11.6 Selected Reaction Monitoring

Das Selected Reaction Monitoring (SRM) wird für die Quantifizierung von Stoffen mittels LC-MS/MS verwendet. Dieser basiert auf der in 0 beschriebenen Arbeitsweise des MS. Dabei durchfliegt ein Mutterion mit einer definierten m/z Q1, gelangt zu Q2, wo es durch eine definierte Kollisionsspannung fragmentiert wird. Die spezifischen Fragmente, die dem Mutterion zugehörig sind, werden dann durch Q3 geleitet und anschließend detektiert. So kann ein bestimmtes Molekül mittels einer Eichreihe genau quantifiziert werden. Bei den ET-Quantifizierungen wurde eine Eichreihe mit den Konzentrationen 0, 25, 50, 100, 200, 400

und 800 ng/mL in NT-Zelllysate angesetzt. Das Zelllysate soll eventuelle Matrixeffekte bei der Messung normieren. Für die MSO Eichreihe wurden niedrigere Konzentrationen von 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 ng/mL gewählt. Die GSH-Konzentration konnte nicht mittels Eichreihe bestimmt werden. Hierbei kam es zu keiner Konzentrationssteigerung bei erhöhtem Einsatz von GSH. Aus diesem Grund wurde für die Quantifizierung von GSH eine Nullpunktbestimmung angefertigt. Dafür wurde jede einzelne zu messende Probe auf $4 \times 10 \mu\text{L}$ aufgeteilt. Hinzu kamen $80 \mu\text{L}$ 10 mM DTNB in Methanol und $10 \mu\text{L}$ von unterschiedlichen derivatisierten GSH-TB-Konzentrationen. Diese Konzentrationen betragen 0, 100, 200 und $400 \mu\text{M}$ GSH-TB, sodass eine Probe letztlich 1:10 verdünnt war und entweder 0, 10, 20 oder $40 \mu\text{M}$ GSH-TB enthielt. Aus diesen vier Werten von einer generierten Probe, konnte dann mit Hilfe der Konzentrationssteigerung und der daraus resultierenden Geraden die tatsächliche GSH-TB Konzentration bestimmt werden.

Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm „Analyst 1.6.3“. Die Peakflächen wurden entweder automatisch oder manuell identifiziert und integriert, wenn der Peak vom Programm nicht erkannt wurde. Der entstandene Peak ist erst bei einer bestimmten Retentionszeit und einer Intensität mit einem Signal zu Hintergrund Verhältnis von 3:1 als Peak definiert. Dabei wurden die Ergebnisse in Bezug zu deren stoffspezifischen Eichreihen gesetzt. Voraussetzung hierfür war die Erwerbbarkeit des Stoffes in der Reinform. Die Tabelle 7 zeigt verschiedene Stoffe, welche mit und ohne Eichreihenstandard quantifiziert und unter welchen Bedingungen diese gemessen wurden.

Für die Auswertung wurde der Quotient aus der analytischen Peakfläche des gemessenen Moleküls und der Eichreihensteigung gebildet (Gleichung 1). Das Ergebnis wird durch das Molekulargewicht der Verbindung geteilt, um die Konzentration im Zelllysate oder den *in vitro* Ansätzen zu berechnen (Gleichung 2). Bei Zellversuchen wurde die zuvor berechnete Konzentration auf die Zellzahl bzw. auf die Proteinmenge normiert (siehe 2.4.5; Gleichung 3). Dabei wurde die Konzentration durch die Proteinmenge geteilt. Ein Vergleich der Zellzahl mit der Proteinkonzentration zeigt, dass 10^7 -Zellen einem mg Protein entsprechen [16]. Weiterhin zeigten Volumenberechnungen von 10^7 -Zellen, dass diese ein Volumen von $6,7 \mu\text{L}$ haben. Anhand dieses Volumens kann nun die Analytenkonzentration in μM berechnet werden (Gleichung 4).

Gleichung 1: Berechnung der Analytkonzentration [ng/mL]:

$$\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Analyt Peakfläche [cps]}}{m \left(\frac{\text{Peakfläche [cps]}}{\frac{\text{ng}}{\text{mL}}} \right)}$$

Gleichung 2: Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mL]:

$$\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right]}{\text{molare Masse (Analyt)} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * 1000}$$

Gleichung 3: Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mg Protein]:

$$\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg Protein}} \right] = \frac{\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mL}} \right]}{\text{Proteinkonzentration} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

Gleichung 4: Berechnung der Analytkonzentration [μM]:

$$\text{Analytkonzentration} \left[\mu\text{M} \right] = \frac{\text{Analytkonzentration} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg Protein}} \right]}{6,7 \mu\text{L}}$$

Material und Methoden

Tabelle 7: Analyse der Substanzen im Massenspektrometer mittels SRM

Substanz	Mutterion [m/z]	Fragment [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Eichreihe	Säule	Laufmittel A	Laufmittel B	Lauf	Flussrate [mL/min]
Ascorbinsäure	174	71	-35	-22	-1	ja	DC18	0,05% Ess	0,005% Ess in MeOH	Iso. 1	0,3
Dehydroascorbinsäure	172	99	-70	-6	-15	ja	DC18	0,05% Ess	0,005% Ess in MeOH	Iso. 1	0,3
DHPN	419	401	96	23	10	ja	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
DHPNO ₂	451	300	81	21	16	ja	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
Ergothionein	230	127	41	27	8	ja	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Disulfid	229	185	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Sulfonsäure	278	154	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
Glutathion	308	179	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
GS-TNB	505	273	46	19	14	ja	T3	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 2	0,4
Hercynin	198	95	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
Methionin-Sulfoxid	165	74	31	19	12	ja	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
TEMP	156	58	51	25	10	ja	HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
TEMPO	171	83	36	23	14	ja	HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
TEMPOH	172	102	36	30	22	nein	HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Iso. 2	0,4
Thioharnstoff	77	60	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2

Acn = Acetonitril; Ams = Ameisensäure; Ess = Essigsäure (Roth); MeOH = Methanol; m/z = Masse/Ladung; V = Volt
 Ionisierungsmodus: positiv, außer Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, dort wurde im negativ Modus gemessen.

Iso. = Isokratischer Lauf; Iso. 1: 70% B bis 4,5 min; Iso. 2: 60% B bis 6 min;

Grad. 1: 0% B bei 0 min, 90% bei 0,5 min, 10% B bei 9 min, 10% B bei 10min, 90% B bei 14 min, 90% bei 15 min.

Grad. 2: 20% B bei 0 min, 60% bei 6 min, 60% bei 7 min, 20% bei 8 min, 20% bei 9 min

Material und Methoden

Substanz	Mutterion [m/z]	Fragment [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	Eichreihe	Säule	Laufmittel A	Laufmittel B	Lauf	Flussrate [mL/min]
ET-Produkt	246	143	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	262	245	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	264	188	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	365	244	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	365	230	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	493	230	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	551	244	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
ET-Produkt	553	246	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	214	111	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	230	153	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	246	229	60	30	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	248	188	41	15	8	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	288	212	41	25	8	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	333	274	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	349	290	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	519	460	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2
HER-Produkt	535	228	60	25	10	nein	ZIC-HILIC	0,1% Ams	0,1% Ams in Acn	Grad. 1	0,2

Ionisierungsmodus war positiv; Acn = Acetonitril; Ams = Ameisensäure;

Grad. 1: 0% B bei 0 min, 90% bei 0,5 min, 10% B bei 9 min, 10% B bei 10min, 90% B bei 14 min, 90% bei 15 min

2.11.7 Ionenfalle (MS³)

Die Ionenfalle dient der weiteren Fragmentierung von Fragmenten des Mutterions. Hierbei durchquert ein Mutterion das MS wie für den Produktionenscan beschrieben (siehe 2.11.5). Anstelle Q2 zu verlassen und durch den Massenfilter Q3 zu gelangen, wird das spezifische Fragment des Mutterions in der Ionenfalle durch elektrostatische und magnetische Wechselwirkungen gesammelt und anschließend mittels Produktionenscan fragmentiert.

Dies war zum Beispiel der Fall beim Molekül m/z 365, welches als Hauptfragment m/z 230 aufwies (Abbildung 48). Hierbei sollte herausgefunden werden, ob es sich bei m/z 230 um ET handelt. Daher wurde m/z 365 durch den Massenfilter Q1 selektiert und anschließend in Q2 fragmentiert. Das entstandene m/z 230-Fragment wurde in der Ionenfalle angereicherter und zusätzlich fragmentiert. Das Fragmentmuster wurde von dem Detektor aufgenommen und in ein digitales Signal überführt.

2.11.8 Akkurate Massenmessung

Die gefundenen ET-Produkte wurden zur Bestätigung der vermuteten Summenformel sowie postulierten chemischen Struktur nicht nur mittels Produktionenscan fragmentiert (siehe 2.11.5), sondern es wurde auch die akkurate Masse bestimmt [107]. Die Messungen wurden an der Massenspektrometer Plattform Biocenter, CEPLAS, Universität zu Köln, zusammen mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Sabine Metzger an einem maXis 4G Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts USA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Quadrupol Time-of-flight Massenspektrometer mit einer ESI Quelle, welches hinter eine HPLC von Dionex HPG 3200 system (Thermo Fisher Scientific) geschaltet war. Die HPLC-Methode ist unter 2.11.6 (Grad. 1) beschrieben. Die gefundenen Moleküle wurden im positiven Ionisierungsmodus mit den folgenden Einstellungen gemessen: Trockengas Stickstoff: 8 l/min, Trockenheizer: 220 °C, Vernebler (nebulizer) Druck: 1,8 Bar, Kapillar Spannung: 4500 V. Eine interne Kalibrierung wurde automatisch im high precision calibration mode mit einer Referenzmassen Liste von Natriumformiatcluster durchgeführt. Die resultierenden Fehler lagen für alle Referenzmassen unter 1 ppm.

2.12 Statistische Methoden

Alle durchgeführten Experimente wurden mindestens dreifach, an verschiedenen Tagen, mit mindestens drei Replikaten (= n) pro Bedingung durchgeführt. Die Graphen, welche Zeitverläufe von Zellexperimenten zeigen, wurden meist durch lineare Regression beschrieben. Ansonsten wurden die Zellexperimente sowie die *in vitro* Experimente mit der nicht linearen Regressionsfunktion dargestellt:

$$y = \text{Scale}_1 * \exp(-k_{\text{down}} * x) - \text{Scale}_2 * \exp(-k_{\text{up}} * x)$$

Dabei ist Scale_1 und Scale_2 als maximale Ableitungen und k_{down} und k_{up} als Intensitätskonstanten bestimmt [74].

Für die massenspektroskopisch gemessenen (LC-MS, LC-MS/MS) Substanzen wurde das Signal-Hintergrundverhältnis auf 3:1 als untere Detektionsgrenze definiert. In den angefertigten Tabellen der Ergebnisse wurden die Fehler stets ganzzahlig aufgerundet.

Fullscanintensitäten zeigen die subtrahierten unterschiedlichen Flächen unter der Kurve von den 60 minus 0 Minuten Proben in der Elutionszeit des identifizieren Signals.

3 Ergebnisse

Die physiologische Bedeutung von Ergothionein (ET) ist noch nicht eindeutig geklärt, weshalb ein Ziel dieser Arbeit ist, ET als Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)-Quencher unter physiologischen Bedingungen zu analysieren. Dazu wurde in 293 Zellen $^1\text{O}_2$ durch Photosensibilisatoren (PST) und thermolytisch durch DHPNO₂ generiert. Der $^1\text{O}_2$ -Schaden wurde mit Hilfe des reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Indikators Methionin-Sulfoxid (MSO) quantifiziert. Dabei werden die intrazellulären MSO-Konzentrationen von 293 Zellen mit ET und ohne ET verglichen. Weiterhin wurde der Einfluss von Glutathion (GSH) auf die Reaktion von ET mit $^1\text{O}_2$ in Gegenwart und Abwesenheit von intrazellulärem GSH analysiert.

Abschließend wird die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET erst *in vitro* und anschließend in 293 Zellen genauer untersucht, da über diese noch nichts bekannt ist. Hierbei wurde auch der Einfluss von Ascorbinsäure (ASC), GSH und TRIS auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET näher betrachtet.

Zuerst werden nun Abkürzungen und Vereinfachungen definiert, welche zum Verständnis der folgenden Ergebnisse beitragen sollen:

- (1) (+) ist „mit“. Bsp.: ETT(+) = mit ETT-Expression;
GSH(+) = mit intrazellulärem GSH
- (2) (-) ist „ohne“. Bsp.: ETT(-) = ohne ETT-Expression;
GSH(-) = ohne intrazellulärem GSH. GSH wurde mit BSO/DEM minimiert;
- (3) Effektzellen = Zellen die $^1\text{O}_2$ ausgesetzt wurden. Bsp.: PST (ReAsH, BR oder TMPYP) mit Belichtung oder DHPNO₂-Inkubation
Effektzelllysate = Zelllysate von Effektzellen
- (4) Kontrollzellen = Zellen die entweder ohne PST Inkubation oder ohne Belichtung behandelt wurden. Beide Bedingungen sollten kein $^1\text{O}_2$ generieren.
Kontrollzelllysate = Zelllysate von Kontrollzellen

3.1 Intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung mit Photosensibilisatoren

3.1.1 ReAsH

Bei der Wahl der PST schien ReAsH sich als besonders hervorzuheben. ReAsH ist beschrieben, spezifisch an ein Tetracysteinmotiv (TC) zu binden [113]. Proteine können mit dem TC modifiziert werden und somit ReAsH an den Lokalisationsort des Proteins koppeln. In dieser Arbeit wurde der Tetracyclin-Repressor (TetR) mit dem TC modifiziert. TetR wird bei dem Expressionssystem pEBTetD/ETT kontinuierlich exprimiert und durch Hinzugabe von Doxycyclin wird zusätzlich der Ergothionein-Transporter (ETT) gebildet. Dadurch ist gewährleistet, dass ET in die Zelle aufgenommen werden kann und gleichzeitig das TC modifizierte Protein gebildet wird. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem ReAsH-TC-Proteinkomplex um ein $^1\text{O}_2$ -generierendes System handelt, dessen Lokalisation kontrollierbar scheint (siehe 1.3.1), wurden Experimente mit ReAsH in 293 Zellen mit und ohne ET durchgeführt um den ET-Effekt gegenüber $^1\text{O}_2$ zu untersuchen.

Dafür wurden transfizierte 293 + pEBTetD/ETT/TetR-TC Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert, damit die Zellen ET aufnehmen können (Kontrolle ohne ETT-Expression). Die Zellen wurden mit einer ReAsH/ET-Lösung inkubiert und ReAsH, welches nicht an das TC gebunden hat, mit Dimercaprol herausgewaschen (Kontrollen ohne ReAsH). Im Anschluss wurden die 293 Zellen belichtet und lysiert (Kontrollen ohne Belichtung). Die MSO- und ET-Konzentration wurde in den generierten Zelllysaten mittels LC-MS/MS analysiert (siehe 2.5.1).

Die Ergebnisse zeigten, dass in ETT(+) Effektzellen durch Belichtung des ReAsH-TC-Proteinkomplexes 42% weniger MSO entstand als in den ETT(-) Effektzellen (Abbildung 21, A; Tabelle 8). Die ETT(+/-) Kontrollzelllysate von 293 Zellen ohne Belichtung oder ReAsH wiesen untereinander verglichen eine ähnliche MSO-Konzentration von etwa 5 pmol/mg Protein auf. Dort war keine MSO-Erhöhung zu beobachten. Die erhöhte MSO-Konzentration kam nur bei Effektzellen zustande.

Für die Messung der intrazellulären ET-Konzentration wurde die gleichen Zelllysate verwendet, wie zuvor für die Messung der MSO-Konzentration (Abbildung 21, B; Tabelle 8). Die Funktionalität des induzierbaren ETT-Systems durch pEBTetD/ETT/TetR-TC zeigte sich anhand der ETT(-) Zellen ohne induzierte Transporterexpression. Diese wiesen nahezu keine ET-Konzentration auf, wobei die untere Nachweisgrenze der LC-MS/MS-Analysen mit einem Signal-Hintergrundverhältnis von 3:1 definiert wurde. In Zelllysaten von ETT(+) Zellen war

Ergebnisse

die ET-Konzentration hoch mit bis zu 24.000 pmol/mg Protein, wobei keine signifikante ET-Konzentrationsabnahme in den Effektzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen stattfand.

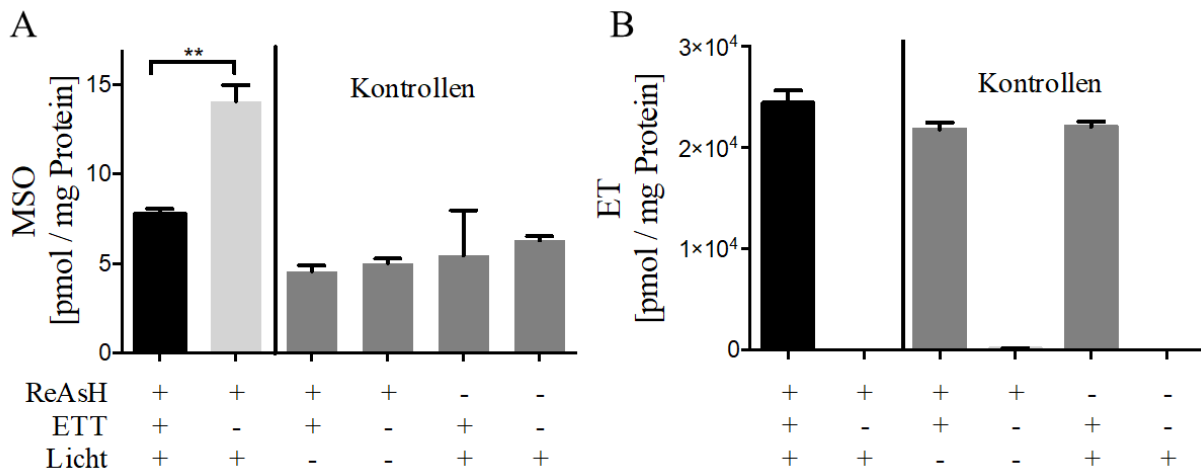


Abbildung 21: MSO- und ET-Konzentration in Zelllysaten von ETT(+/-) Zellen nach $^1\text{O}_2$ -Generierung durch ReAsH-Tetracystein-Proteinkomplex. Die 293 + pEBTetD/ETT-TetR-TC Zellen wurden ausgesät. Daraufhin wurde die ETT-Expression für 24 Stunden induziert (ETT(+); Kontrollen ohne ETT-Expression (ETT(-)) und schließlich für 1 Stunde mit einer ET/ReAsH-Lösung inkubiert (ReAsH(+); Kontrollen ohne ReAsH (ReAsH(-)). Anschließend erfolgte eine 20-minütige Belichtung (Licht(+); Kontrollen ohne Licht (Licht(-)). Die MSO- und ET-Konzentrationen wurden in den gleichen Zelllysaten gemessen (A, B; n = 3; Mittelwert \pm SEM; ** P = 0,0024).

Tabelle 8: MSO- und ET-Konzentrationen in Zelllysaten von ReAsH (+/-) inkubierten ETT(+/-) Zellen über die Belichtungszeit (+/-) von 20 Minuten.

ReAsH / ETT / Licht	MSO [pmol/mg Protein]	ET [pmol/mg Protein]
+ / + / +	8 \pm 1	24.000 \pm 1.000
+ / - / +	14 \pm 1	20 \pm 1
+ / + / -	5 \pm 1	22.000 \pm 1.000
+ / - / -	5 \pm 1	180 \pm 24
- / + / +	5 \pm 3	22.000 \pm 500
- / - / +	6 \pm 1	21 \pm 1

Laut Literatur bindet der ReAsH-Farbstoff spezifisch an ein TC. ReAsH sollte am Ort des Proteins mit modifiziertem TC lokalisiert sein. Des Weiteren ist bekannt, dass ReAsH erst fluoresziert, wenn der Farbstoff an das TC gebunden hat. Martin *et al.* zeigten, dass die Bindung des ReAsH-Tetracystein-Proteinkomplexes stabiler ist als intrazelluläre, unspezifische Bindungen [73]. Daher kann unspezifisch gebundenes ReAsH mit Hilfe von

Ergebnisse

Dimercaprol entfernt werden. Ein Fluoreszenzexperiment zur Überprüfung der in der Literatur beschriebenen Sachverhalte wurde durchgeführt. Hierfür wurden 293 + pEBTetD/ETT und 293 + pEBTetD/ETT/TetR-TC Zellen auf Deckgläsern ausgesät, die Proteinexpression induziert und mit ReAsH inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit Dimercaprol gewaschen und die entstandene rote Fluoreszenz analysiert (siehe 2.5.1).

Dabei zeigten TC(-) Zellen rote Fluoreszenz, trotz Waschung mit Dimercaprol (Abbildung 22, B). Die Fluoreszenzintensität in den TC(+) Zellen war nahezu identisch mit TC(-) Zellen (D). Hierbei ist zu beachten, dass die Aufnahmen, aufgrund der unterschiedlichen Aussaat und Koloniebildung, nur eingeschränkt vergleichbar waren. Dennoch konnte durch unspezifische ReAsH-Bindung mit intrazellulären Molekülen bei den TC(-) Zellen eine hohe Hintergrundfluoreszenz gezeigt werden. Der ReAsH-TC-Proteinkomplex war kein kontrollierbares Lokalisationssystem für die $^1\text{O}_2$ -Generierung.

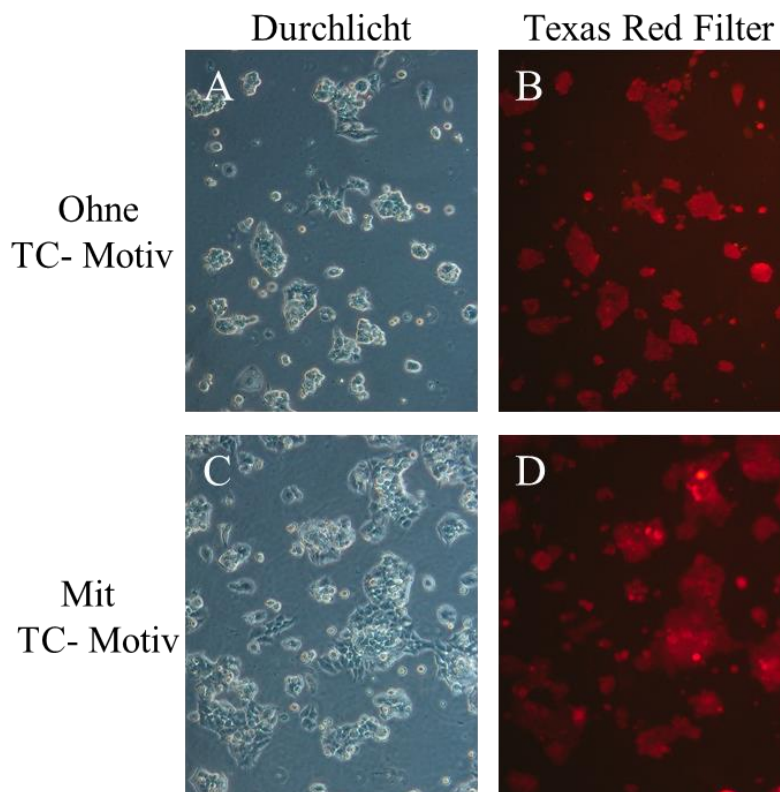


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293 Zellen mit und ohne TC. Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von ETT-exprimierenden und ReAsH gefärbten 293 + pEBTetD/ETT (A, B) und 293 + pEBTetD/ETT/TetR-TC (C, D) Zellen. Bei den TC(+) Zellen ist der Tet-Repressor mit dem TC modifiziert. Nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit ReAsH gefärbt und mit Dimercaprol gewaschen, um unspezifisch gebundenes ReAsH zu entfernen. Zu sehen sind Zellen im Durchlicht (A, C) und mit dem Texas-Red-Filterset (B, D).

3.1.2 Bengal Rosa

Durch ReAsH konnte $^1\text{O}_2$ in der Zelle nicht gezielt lokal generiert werden und war deshalb anderen PST nicht überlegen. Daher wurden andere PST getestet. In der Literatur werden meist die PST Bengal Rosa (BR) und TMPyP zur $^1\text{O}_2$ -Generierung verwendet (siehe 1.3.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob ein ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$, generiert durch BR, nachgewiesen werden kann.

Hierfür wurden 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert, damit die Zellen ET aufnehmen (Kontrolle ohne ETT-Expression). Anschließend folgte eine Inkubation der Zellen mit einer BR/ET-Lösung. Danach wurden die Zellen belichtet und lysiert. Die MSO- und ET-Konzentration in den erzeugten Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert (siehe 2.5.2).

Die ETT(+/-) Effektzelllysate wiesen ähnliche MSO-Ausgangskonzentrationen von durchschnittlich 7,5 pmol/mg Protein auf (Abbildung 23, A; Tabelle 9). Bis zur 3. Minute wurde in den Zelllysaten der ETT(-) Effektzellen im Vergleich zu den ETT(+) Effektzellen die doppelte MSO-Konzentration generiert. Bei Minute 4 und 5 war der Kurvenverlauf nicht mehr stetig und das Verhältnis der MSO-Konzentrationen in ETT(+) und ETT(-) Effektzelllysaten näherte sich an. Nach Minute 4 war die MSO-Konzentration 1,4-fach höher in den ETT(-) Effektzelllysaten im Vergleich zu den ETT(+) Zelllysaten und bei 5 Minuten 1,1-fach höher.

Für die Messung der intrazellulären ET-Konzentration wurde die gleichen Zelllysate verwendet, wie zuvor für die Messung der MSO-Konzentration. Dabei wiesen die ETT(-) Zellen nahezu keine intrazelluläre ET-Konzentration auf (Abbildung 23, B; Tabelle 10). Die ETT(+) Zellen zeigten eine Abnahme der ET-Konzentration über die Zeit. Diese Abnahme ähnelte einem exponentiellen Zerfall mit einer Halbwertszeit von 1,3 Minuten. Nach 3 Minuten war ET nahezu vollständig verbraucht. Auffällig war, dass nachdem ET verbraucht wurde, stieg die MSO-Konzentration in den ETT(+) Effektzellen stärker an.

Ergebnisse

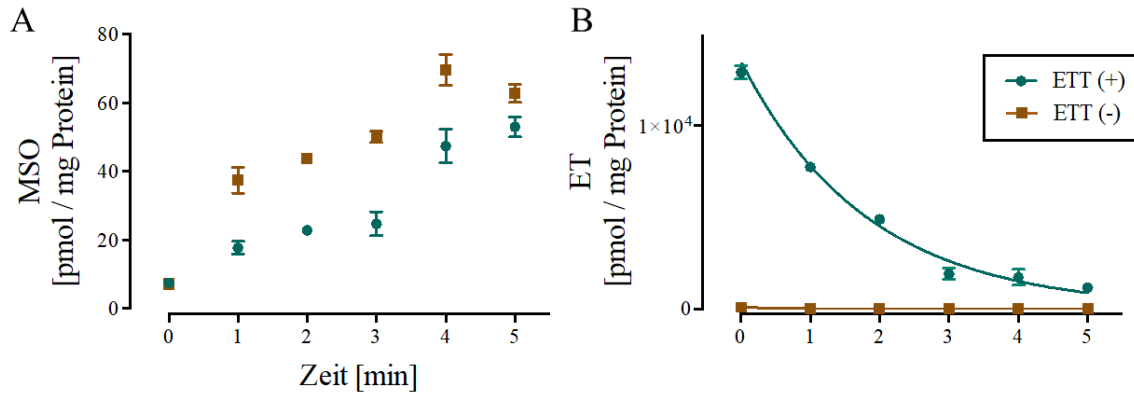


Abbildung 23: Zeitverlauf von $^1\text{O}_2$ -gestressten ETT(+/-) Zellen generiert durch BR-Belichtung. Dargestellt ist die MSO- und die ET-Konzentration in ETT(+/-) Zelllysaten gemessen mittels LC-MS/MS (A, B). Dafür wurden die Zellen mit einer BR/ET-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit sichtbarem Licht bestrahlt und die Zellen nach den Belichtungszeiten 0 bis 5 Minuten lysiert. Die MSO- und ET-Konzentration wurden innerhalb der gleichen Zelllysate gemessen. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Tabelle 9: MSO- und ET-Konzentrationen in ETT(+/-) Zelllysaten von Effektzellen über die Belichtungszeit von 5 Minuten.

Zeit [min]	MSO [pmol/mg Protein]		ET [pmol/mg Protein]	
	ETT(+)	ETT(-)	ETT(+)	ETT(-)
0	8 \pm 1	7 \pm 1	13.000 \pm 400	79 \pm 4
1	18 \pm 2	37 \pm 4	7.800 \pm 300	13 \pm 2
2	23 \pm 2	44 \pm 1	4.900 \pm 300	3 \pm 1
3	25 \pm 4	50 \pm 2	2.000 \pm 300	3 \pm 1
4	47 \pm 5	70 \pm 5	1.700 \pm 400	4 \pm 1
5	53 \pm 3	63 \pm 3	1.200 \pm 200	3 \pm 1

Beim BR-Zeitverlaufsexperiment wurde nach 3 Minuten kein ET-Schutzeffekt, aufgrund des ET-Verbrauchs, gegenüber $^1\text{O}_2$ nachgewiesen. Daher wurde im Folgenden ein Kontrollexperiment mit 3 Minuten Belichtung durchgeführt. Hierbei wurden die Faktoren Belichtung und BR unabhängig voneinander untersucht (siehe 2.5.2).

Hierfür wurden ETT(+/-) Kontrollzellen mit BR gefärbt, aber nicht belichtet (Abbildung 24, A, B; Tabelle 10). Zusätzliche ETT(+/-) Kontrollzellen wurden nicht mit BR gefärbt, aber belichtet. Die Kontrollzelllysate von Zellen mit BR-Färbung ohne Belichtungsbehandlung wiesen einen höheren Durchschnittswert von 15 pmol/mg Protein auf als Kontrollzellen ohne BR-Behandlung mit 6,4 pmol/mg Protein. Insgesamt waren die MSO-Konzentrationen in

Ergebnisse

Zelllysaten der Kontrollzellen im Vergleich zu den ETT(+) Effektzellen um etwa den Faktor 0,1 verringert. Ein MSO-Konzentrationsvergleich der ETT(+) Effektzellen mit den ETT(-) Effektzellen führte zu einer 2,3-fach erhöhten MSO-Konzentration in ETT(-) Effektzellen. Diese Erhöhung war auf die intrazelluläre Abwesenheit von ET zurückzuführen.

Die ET-Konzentration in Zelllysaten von ETT(+) Effektzellen zeigten nahezu kein intrazelluläres ET mehr (Abbildung 24, B; Tabelle 10). Die Kontrollzellen untereinander verglichen wiesen keine ET-Minimierung durch Behandlung von BR oder Belichtung auf.

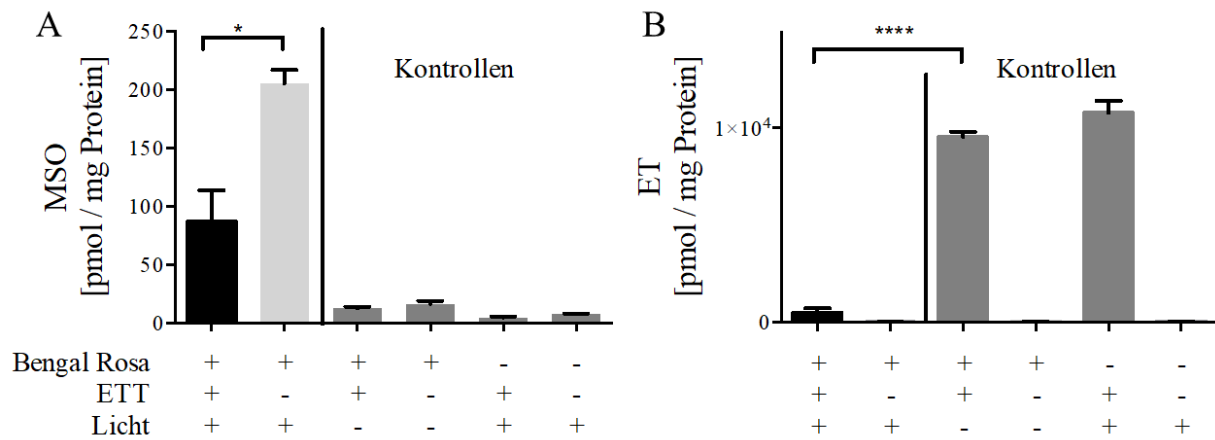


Abbildung 24: MSO- und ET-Konzentration in ETT(+/-) Kontrollzelllysaten nach zellulärer $^1\text{O}_2$ -Generierung durch BR-Belichtung. Die 293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden zunächst ausgesät. Daraufhin wurde die ETT-Expression für 24 Stunden induziert (ETT(+); Kontrollen ohne ETT-Expression (ETT(-)) und schließlich für 1 Stunde mit ET/BR-Lösung inkubiert (BR(+); Kontrollen ohne BR (BR(-)). Eine 3-minütige Belichtung erfolgte mit anschließender Zellyse (Licht (+); Kontrollen ohne Licht (Licht(-)). Die ET- und MSO-Konzentrationen wurden in den gleichen Zelllysaten mittels LC-MS/MS gemessen (A, B; n = 3; Mittelwert \pm SEM; * P = 0,0154, **** P < 0,0001).

Tabelle 10: MSO- und ET-Konzentrationen in Zelllysaten von BR (+/-) inkubierten ETT(+/-) Zellen mit einer Belichtungszeit (+/-) von 3 Minuten.

BR / ETT / Licht	MSO [pmol/mg Protein]	ET [pmol/mg Protein]
+ / + / +	87 \pm 27	500 \pm 200
+ / - / +	206 \pm 11	19 \pm 12
+ / + / -	13 \pm 1	9.500 \pm 300
+ / - / -	17 \pm 3	51 \pm 3
- / + / +	5 \pm 1	10.800 \pm 600
- / - / +	8 \pm 1	52 \pm 4

3.1.3 TMPyP

Parallel zu den BR-Experimenten wurden auch Experimente mit TMPyP durchgeführt. Hierbei wurde der ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ in Bezug auf die MSO-Generierung untersucht.

Dafür wurden die 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert, damit die Zellen ET aufnehmen können (Kontrolle ohne ETT-Expression). Anschließend wurden die Zellen in einer ET/TMPyP-Lösung inkubiert. Es folgte eine Belichtung mit einem UV-Leuchttisch. Zu dem jeweiligen Zeitpunkt wurden die 293 Zellen lysiert und die MSO- und ET-Konzentration in den Zelllysaten mittels LC-MS/MS analysiert (siehe 2.5.2).

Die Ergebnisse zeigten, dass ETT(+/-) Effektzelllysate eine nahezu gleiche MSO-Ausgangskonzentration hatten (Abbildung 25, A; Tabelle 11). Es kam zu einem linearen MSO-Konzentrationsanstieg über die Zeit. Dabei wiesen ETT(+) Effektzellen eine MSO-Konzentrationssteigerung von $0,6 \pm 0,1$ pmol/(min*mg Protein) auf, wohingegen ETT(-) Effektzellen eine Konzentrationssteigerung von $1,6 \pm 0,1$ pmol/(min*mg Protein) zeigten. Damit war die Steigung der MSO-Konzentration in den ETT(-) Effektzellen im Vergleich zu ETT(+) Effektzellen um den Faktor 2,7 erhöht.

Die ET-Konzentration in Zelllysaten von ETT(+) Effektzellen zeigte über die Zeit nur leichte Schwankungen (Abbildung 25, B; Tabelle 11). Die verschiedenen Zeitpunkte konnten anhand einer Geraden mit einer ET-Konzentrationssteigerung von -139 pmol/(min*mg Protein) beschrieben werden. Dies entspricht nahe einer Geraden parallel zur x-Achse unter Berücksichtigung der insgesamt erhöhten ET-Konzentration. Die geringe Abnahme der ET-Konzentration stand im Gegensatz zu dem Ergebnis aus dem BR-Experiment, wobei ET in den Effektzellen über die Zeit nahezu komplett verbraucht wurde (siehe Abbildung 23).

Ergebnisse

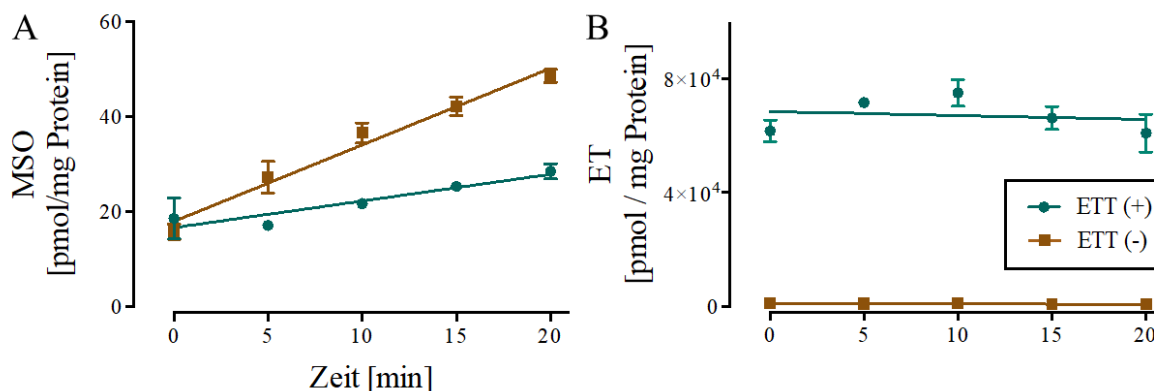


Abbildung 25: Zeitverlauf von $^1\text{O}_2$ -gestressten ETT(+/-) Zellen generiert durch TMPyP-Belichtung. Dargestellt ist die MSO- und die ET-Konzentration in ETT(+/-) Zellslysaten gemessen mittels LC-MS/MS (A, B). Dafür wurden die Zellen mit einer ET/TMPyP-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und die Zellen nach den Belichtungszeiten 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten lysiert. Die MSO- und ET-Konzentration wurden innerhalb der gleichen Zellslysate gemessen. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Tabelle 11: MSO- und ET-Konzentrationen in ETT(+/-) Zellslysaten von Effektzellen über die Belichtungszeitpunkte 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten. Unten sind die Geradengleichungen der linearen Anpassung beschrieben.

Zeit [min]	MSO [pmol/mg Protein]		ET [pmol/mg Protein]	
	ETT(+)	ETT(-)	ETT(+)	ETT(+)
0	19 \pm 4	16 \pm 2	62.000 \pm 4000	1.100 \pm 20
5	17 \pm 1	27 \pm 3	73.000 \pm 1000	1.100 \pm 70
10	22 \pm 1	37 \pm 2	75.000 \pm 5000	1.200 \pm 50
15	25 \pm 1	42 \pm 2	66.000 \pm 4000	900 \pm 50
20	29 \pm 2	49 \pm 1	61.000 \pm 7000	800 \pm 80
Geradengleichung [pmol/(min*mg Protein)]	0,6 x + 16,7	1,6 x + 18	-139 x + 68.000	-17,8 x + 1.200

Das TMPyP-Zeitverlaufexperiment wurde mit den entsprechenden Kontrollen überprüft (siehe 2.5.2). Dadurch kann ein Einfluss von TMPyP oder die UV-Leuchttischbelichtung auf die MSO-Bildung ausgeschlossen werden.

Die ETT (+/-) Kontrollzellen wurden mit TMPyP gefärbt und nicht belichtet oder belichtet und nicht mit TMPyP gefärbt (Abbildung 26; Tabelle 12). Die MSO-Konzentration in den Kontrollzellslysaten war um den Faktor 0,4 verringert, verglichen zu der ETT(+) Effektzellslysaten. Ein Vergleich von ETT(+) Effektzellslysaten mit ETT(-) Effektzellslysaten führte zu einer 2,4-fachen erhöhten MSO-Konzentration in

Ergebnisse

ETT(-) Zelllysaten. Die ETT(+) Effektzellen zeigten eine MSO-Konzentration von 29 pmol/mg Protein im Vergleich zu ETT(-) Effektzellen mit 69 pmol/mg Protein.

Die ET-Konzentration in Effektzelllysaten nahm um den Faktor 0,7 ab im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Belichtung (Abbildung 26, B; Tabelle 12). Dahingegen zeigte ein Vergleich der Kontrollzellen untereinander keine signifikante ET-Konzentrationsminderung durch die Belichtungs- oder TMPyP-Behandlung.

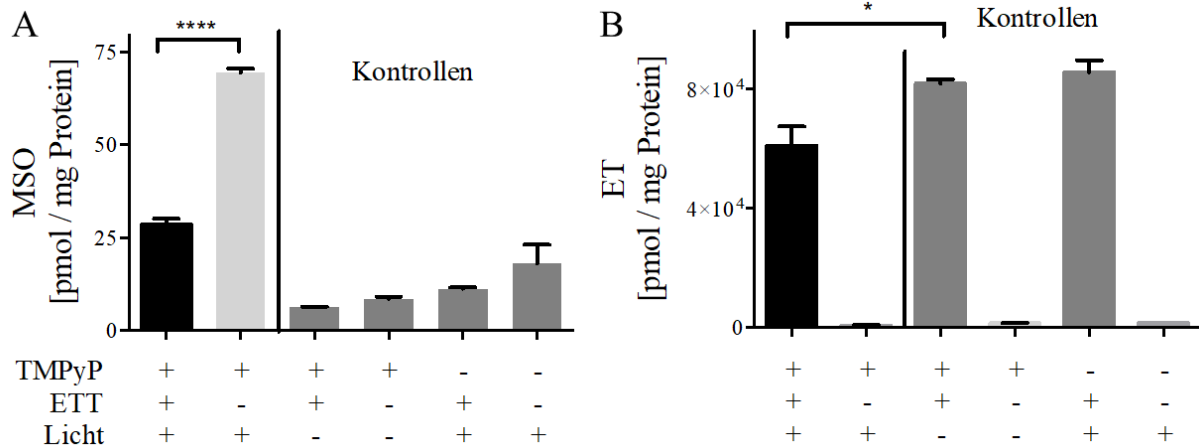


Abbildung 26: MSO- und ET-Konzentration in ETT(+/-) Zelllysaten nach zellulärer $^1\text{O}_2$ -Generierung durch TMPyP-Belichtung. Die 293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden zunächst ausgesät. Daraufhin wurde die ETT-Expression für 24 Stunden induziert (ETT(+); Kontrollen ohne ETT-Expression (ETT(-)) und schließlich für 4 Stunden mit ET/TMPyP-Lösung inkubiert (TMPyP(+); Kontrollen ohne TMPyP (TMPyP(-)). Eine 20-minütige Belichtung erfolgte mit anschließender Zelllyse (Licht(+); Kontrollen ohne Licht (-)). Die ET- und MSO-Konzentrationen wurden in den gleichen Zelllysaten mittels LC-MS/MS gemessen (A, B; n = 3; Mittelwert \pm SEM; **** P < 0,0001; * P = 0,0362)

Tabelle 12: MSO- und ET-Konzentrationen in Zelllysaten von TMPyP (+/-) inkubierten ETT(+/-) Zellen mit einer Belichtungszeit (+/-) von 20 Minuten.

TMPyP / ETT / Licht	MSO [pmol/mg Protein]	ET [pmol/mg Protein]
+ / + / +	29 \pm 2	61.000 \pm 7.000
+ / - / +	69 \pm 1	780 \pm 81
+ / + / -	6 \pm 1	82.000 \pm 1.000
+ / - / -	9 \pm 1	1.500 \pm 50
- / + / +	11 \pm 1	86.000 \pm 4.000
- / - / +	18 \pm 5	1.500 \pm 12

3.2 $^1\text{O}_2$ -Generierung mit Hilfe von DHPNO₂

Die PST BR, TMPyP und ReAsH generieren hauptsächlich $^1\text{O}_2$, aber auch andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Daher wurden Experimente mit dem spezifisch thermolytisch $^1\text{O}_2$ -freisetzenden Endoperoxid, DHPNO₂, durchgeführt (siehe 1.3.2). Zuerst wurde die Funktionalität des von der Arbeitsgruppe Schmalz synthetisierten DHPNO₂ *in vitro* und anschließend in 293 Zellen getestet.

3.2.1 *In vitro* Funktionalitätsprüfung von DHPNO₂

Zur DHPNO₂-Funktionalitätsprüfung wurde Methionin zusammen mit DHPNO₂ für 1 Stunde bei 37 °C reagieren gelassen (Abbildung 27). Ein weiterer Reaktionsansatz beinhaltete ET, Methionin und DHPNO₂. Als Kontrolle diente Methionin ohne ET und DHPNO₂. Anschließend wurden die Proben mittels LC-MS/MS auf die entstandene MSO-Menge analysiert. Dabei wurde die MSO-Menge, aus der Reaktion von DHPNO₂ mit Methionin, gleich $100 \pm 2,5\%$ gesetzt. Mit ET im Reaktionsansatz wurde $58,1 \pm 0,1\%$ MSO generiert. Die Methioninkontrolle zeigte mit $5 \pm 2\%$ MSO nahezu keine MSO-Produktion. Es konnte $^1\text{O}_2$ durch DHPNO₂ freigesetzt werden und ein ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ wurde *in vitro* gezeigt.

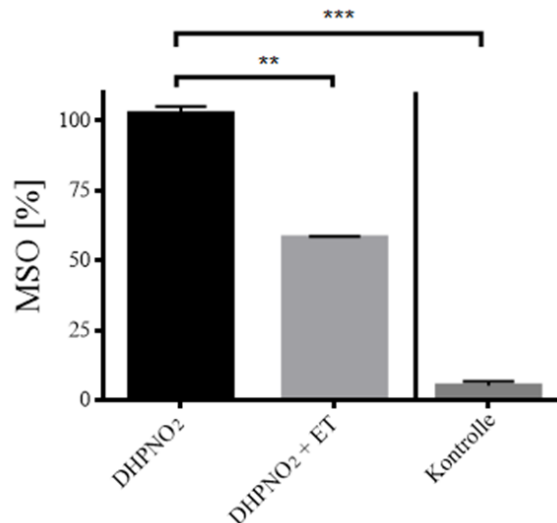


Abbildung 27: *in vitro* Funktionalitätsprüfung von DHPNO₂ bezogen auf die MSO-Produktion. Gezeigt ist die prozentuale MSO-Generierung entstanden aus der Reaktion von 10 mM DHPNO₂ mit 100 μM Methionin (DHPNO₂) bzw. zusätzlich in Gegenwart von 100 μM ET (DHPNO₂ + ET). Die Inkubation wurde für 1 Stunde bei 37 °C durchgeführt. Als Kontrolle diente 100 μM Methionin ohne DHPNO₂ und ET. (n = 3; Mittelwert ± SEM; ** P = 0,0032, *** P = 0,0009).

3.2.2 Intrazellulär $^1\text{O}_2$ -Generierung mit DHPNO₂

Nachdem *in vitro* die DHPNO₂-Funktionalität und die schützende ET-Wirkung durch die MSO-Produktion aus Methionin gezeigt wurde (siehe 3.2.1), folgte ein Experiment mit DHPNO₂ in 293 + pEBTetD/ETT Zellen.

Dafür wurden die Zellen ausgesät, die ETT-Expression induziert (Kontrolle ohne ETT-Expression). Anschließend wurden die Zellen mit ET und danach für 2 Stunden mit DHPNO₂ inkubiert (Kontrolle ohne DHPNO₂). Die MSO- und ET-Konzentration in den Zelllysaten wurden mittels LC-MS/MS analysiert (siehe 2.5.4).

Die Ergebnisse der Versuche waren unterschiedlich und konnten nicht reproduziert werden (Abbildung 28; Tabelle 13). In (A) wurde ein signifikanter MSO-Konzentrationsunterschied in ETT(+) und ETT(-) Effektzelllysaten gemessen. Die MSO-Konzentration war in ETT(-) Effektzelllysaten um den Faktor 1,9 erhöht im Vergleich zu ETT(+) Effektzelllysaten (Tabelle 13). Die ETT(+/-) Kontrollzelllysate (ohne DHPNO₂-Inkubation) zeigten einen ähnlichen Faktorunterschied. In ETT(-) Kontrollzellen wurde um den Faktor 1,9 mehr MSO generiert als in den ETT(+) Kontrollzellen. Die MSO-Konzentration war in ETT(+/-) Effektzelllysaten höher als in ETT(+/-) Kontrollzelllysaten.

Das Ergebnis war nicht reproduzierbar (Abbildung 28, B; Tabelle 13). Bei einem weiteren DHPNO₂-Experiment war bei allen Versuchsbedingungen kein signifikanter Unterschied zu sehen. Die MSO-Konzentration in den Zelllysaten ist nahezu in allen Proben gleich.

Auffällig war die gleichbleibende ET-Konzentration in den Zelllysaten der DHPNO₂-Experimente, selbst bei den Experimenten, in welchen der ET-Schutzeffekt beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Das Experiment wurde insgesamt vier Mal durchgeführt, wobei 2 x das Ergebnis von (A) und 2 x das Ergebnis von (B) geniert wurde.

Ergebnisse

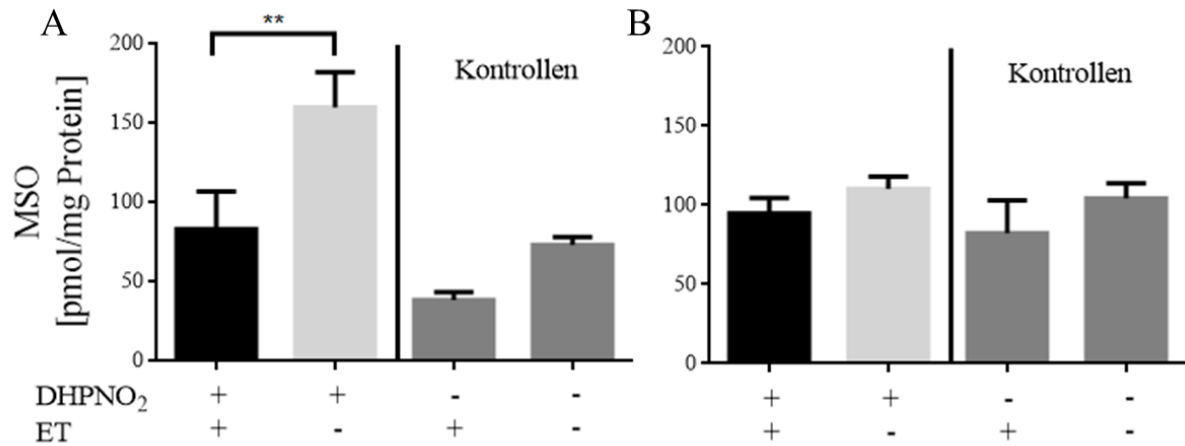


Abbildung 28: MSO-Konzentration in Zelllysaten von DHPNO₂ gestressten ETT(+/-) Zellen. Dargestellt sind exemplarisch zwei von vier Experimenten (A, B) bei denen 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert wurden (ETT(+); Kontrollen ohne ETT-Expression (ETT(-)). Anschließend inkubierten die 293 Zellen mit 100 µM ET für 1 Stunde und danach mit 10 mM DHPNO₂ für 2 Stunden bei 37 °C (DHPNO₂(+); Kontrolle ohne DHPNO₂ (DHPNO₂(-)). Die MSO-Konzentration wurde in den generierten Zelllysate mittels LC-MS/MS analysiert (n = 4, Mittelwert ± SEM, * P = 0,0033).

Tabelle 13: MSO-Konzentrationen in ETT(+/-) Zelllysaten von verschiedenen DHPNO₂- und ETT-behandelten Zellen in zwei unterschiedlichen Experimenten.

DHPNO ₂ / ETT	MSO [pmol/mg Protein]	
	Experiment A	Experiment B
+ / +	83 ± 12	95 ± 10
+ / -	160 ± 11	110 ± 8
- / +	38 ± 3	82 ± 21
- / -	73 ± 3	104 ± 10

3.2.3 Doxycyclineinfluss auf die intrazelluläre Methionin-Sulfoxidkonzentration

Beim DHPNO₂-Experiment wurden in den Zelllysaten von ¹O₂-ungestressten ETT(-) Kontrollzellen höhere MSO-Konzentrationen gemessen als in den ETT(+) Kontrollzellen (Tabelle 13). Die Doxycyclinzugabe ist das Unterscheidungsmerkmal in der Vorbehandlung und zusätzlich wurde Doxycyclin als PST in der Literatur beschrieben [91]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Doxycyclin auf die Ergebnisse überprüft.

Ergebnisse

Dafür wurde die Zelllinie 293 + pEBTetD/SLC22A11 verwendet. Diese Zelllinie war der Zelllinie 293 + pEBTetD/ETT ähnlich, nur dass diese den Transporter SLC22A11 statt ETT durch Doxycyclinhinzugabe exprimiert. SLC22A11 wurde verwendet, damit kein ET in die Zellen gelangt.

Die Zelllinie 293 + pEBTetD/SLC22A11 wurde ausgesät und die Transporterexpression durch Doxycyclinhinzugabe induziert (Kontrolle ohne Doxycyclin). Danach wurden die Zellen belichtet (Kontrolle ohne Licht). Die MSO-Konzentration wurde in den generierten Zelllysaten mittels LC-MS/MS gemessen (siehe 2.5.3).

Wie dem Ergebnis zu entnehmen war, hatte weder Doxycyclin noch die Belichtung einen Einfluss auf die MSO-Konzentration in den Zelllysaten (Abbildung 29; Tabelle 14). Die gemessene MSO-Konzentration betrug in allen Zelllysaten knapp 30 pmol/mg Protein und war nicht signifikant unterschiedlich. Doxycyclin hatte keinen Einfluss auf die MSO-Konzentration in den durchgeführten Experimenten.

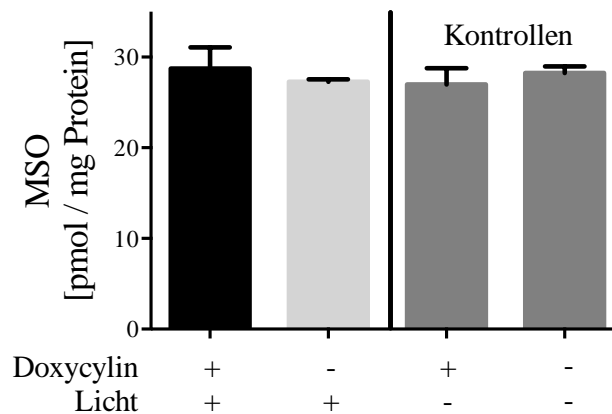


Abbildung 29: Einfluss von Doxycycline auf die Generierung von MSO. Die Zelllinie 293 + pEBTetD/SLC22A11 wurde ausgesät und die SLC22A11-Expression 24 Stunden vor dem Experiment induziert (Doxycyclin(+); Kontrollen ohne Doxycyclin (Doxycyclin(-)). Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 20 Minuten belichtet. Die Kontrollen wurden 20 Minuten im dunklen gehalten. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die MSO-Konzentration in den Zelllysaten mittels LC-MS/MS gemessen. (n = 3, Mittelwert ± SEM).

Tabelle 14: MSO-Konzentrationen in 293 + pEBTetD/SLC22A11 Zelllysaten nach verschiedener Doxycyclin- und Belichtungsbehandlungen von 293 Zellen.

Doxycyclin / Licht	MSO [pmol/mg Protein]
+ / +	29 ± 2
- / +	27 ± 1
+ / -	27 ± 2
- / -	28 ± 1

3.3 Identifizierung von $^1\text{O}_2$ -Indikatoren

Die DHPNO₂-Zellexperimente waren nicht reproduzierbar (siehe 3.2.2 und 3.6). Dadurch kam die Vermutung auf, dass MSO für die DHPNO₂-Experimente möglicherweise kein geeigneter intrazellulärer $^1\text{O}_2$ -Indikator ist. Deshalb wurden verschiedene Stoffe getestet, welche in der Literatur als $^1\text{O}_2$ -Reaktionspartner beschrieben sind (siehe 1.2.1), um zu prüfen, ob diese sich als zusätzliche $^1\text{O}_2$ -Indikator eignen.

3.3.1 Testung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Indikatoren

Zur Testung von $^1\text{O}_2$ -Indikatoren wurde Ascorbinsäure, Cystein, Desoxyguanosin, Histidin, Tryptophan und Tyrosin (Kontrolle mit Methionin) mit DHPNO₂ inkubiert. Danach wurden die Proben im Fullscanmodus mittels LC-MS gemessen. Die Daten wurden mithilfe der Differenzabtönung analysiert (siehe 2.6.1).

Außer für Histidin wurden keine Signale im Differenzabtönungsbild zugeordnet. Beim Histidin-Reaktionsansatz wurde ein türkises Signal bei m/z 156 mit einer Retentionszeit von 476 Sekunden und ein rotes Signal bei m/z 188 (Retentionszeit: 369 Sekunden) identifiziert (Abbildung 30). Dabei bedeuten türkise Signale, dass die gemessene Intensität im Kontrollansatz (0 Minuten bei 37°C) höher war und ein rotes Signal steht für eine höhere Intensität im Effektansatz (60 Minuten bei 37°C). Die Fenster oben links in der Abbildung zeigen das Signal m/z 188 in den Replikaten von zwei weiteren identischen Ansätzen zu der gleichen Retentionszeit von 369 Sekunden.

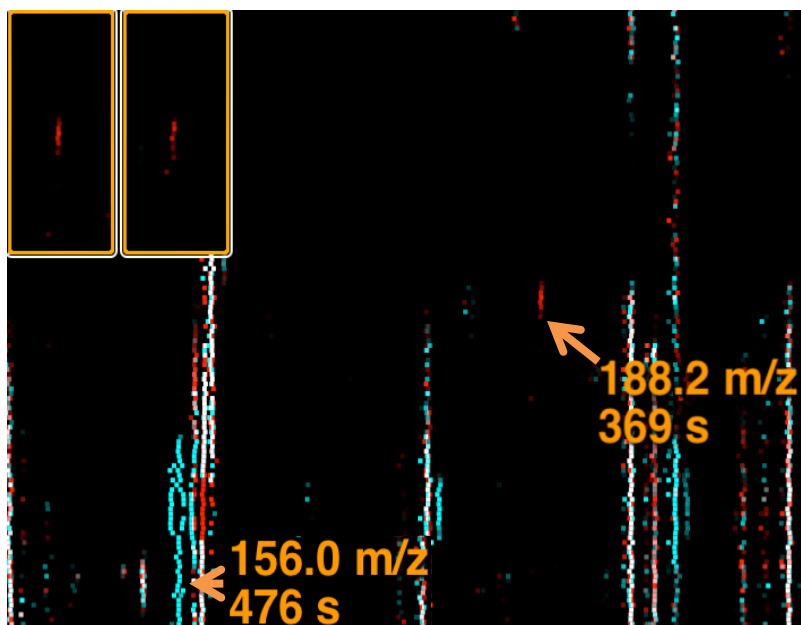


Abbildung 30: Differenzabtönungsbild der $^1\text{O}_2$ -Reaktion mit Histidin. Histidin wurde mit DHPNO₂ für 0 oder 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mittels Fullscananalyse per LC-MS gemessen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Differenzabtönungsbildern ausgewertet. Türkise Signale zeigen höhere Intensitäten in den Kontrollbedingungen und rote Signale zeigen höhere Intensitäten in den Effektbedingungen. Die beiden Fenster oben links zeigen die Replikate des Signals m/z 188 von insgesamt zwei weiteren unabhängigen Versuchsansätzen. ($n = 3$).

Die entdeckten Signale, m/z 156 und 188, wurden mittels Produktionenscan fragmentiert (siehe 2.11.5). Anhand des Fragmentmusters kann die Molekülstruktur durch Abgleich mit Datenbanken bestimmt werden. Sollte das Fragmentmuster nicht in Datenbanken zu finden sein, kann durch Interpretation der entstandenen Fragmente die mögliche Molekülstruktur postuliert werden.

Die m/z 156-Fragmentierungen wurde durch Abgleich mit der Datenbank „Metlin“ [92] Histidin zugeordnet (Abbildung 31; siehe 2.11.5). Durch die positive Elektrospray-Ionisierung kam es zu der Masse +1 u (atomare Masseneinheit; Molekulargewicht Histidin: 155 u). Die Identifikation war durch Fragmentzuordnung bestätigt. Das m/z 188-Molekül war möglicherweise Histidin mit einer Carbonylgruppe an Position 2 und einer Hydroxygruppe an Position 5 des Imidazolrings. Das m/z 188-Fragmentmuster konnte dem Molekül zugeordnet werden, aber war nicht in Datenbanken gelistet.

Ergebnisse

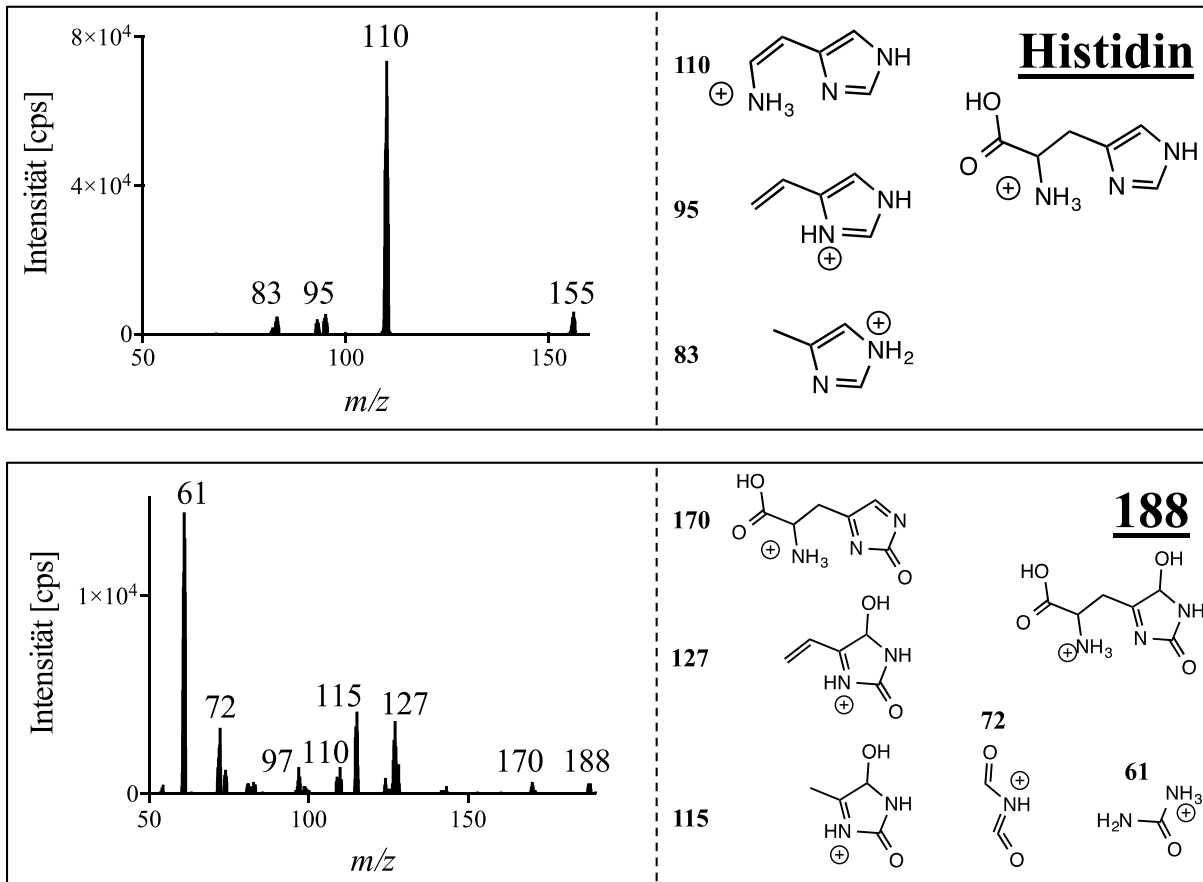


Abbildung 31: Fragmentmuster von Histidin und m/z 188. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster von Histidin (oben) und m/z 188 (unten). Dabei sind rechts die zu den einzelnen Fragmenten postulierten chemischen Strukturen und das Mutterion zu sehen. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

Nach der Fragmentierung und der Zuordnung der Fragmente erfolgte die Messung des intensivsten m/z 188-Fragments, m/z 61, mit einer Selected Reaction Monitoring (SRM)-Methode, um eine spezifische Messung der m/z 188-Menge mit Hilfe der LC-MS/MS durchzuführen (siehe 2.11.6).

In Zellexperimenten wurde mit TMPyP-Belichtung getestet, ob m/z 188 ein potenter ¹O₂-Indikator ist (siehe 2.5.2, TMPyP). Die SRM-Messung zeigte keine Unterschiede in der m/z 188-Intensität über die Zeit in ETT(+) und ETT(-) Effektzelllysaten (Abbildung 32, A). In der Kontrollmessung war ein MSO-Intensitätsunterschied in ETT(+) Zelllysaten im Vergleich zu ETT(-) Zelllysaten zu beobachten (B). ¹O₂-gestresste ETT(+) Zellen generierten weniger MSO über die Zeit als ETT(-) Zellen.

Das Molekül m/z 188 wurde nicht als ¹O₂-Indikator für Folgeexperimente genutzt.

Ergebnisse

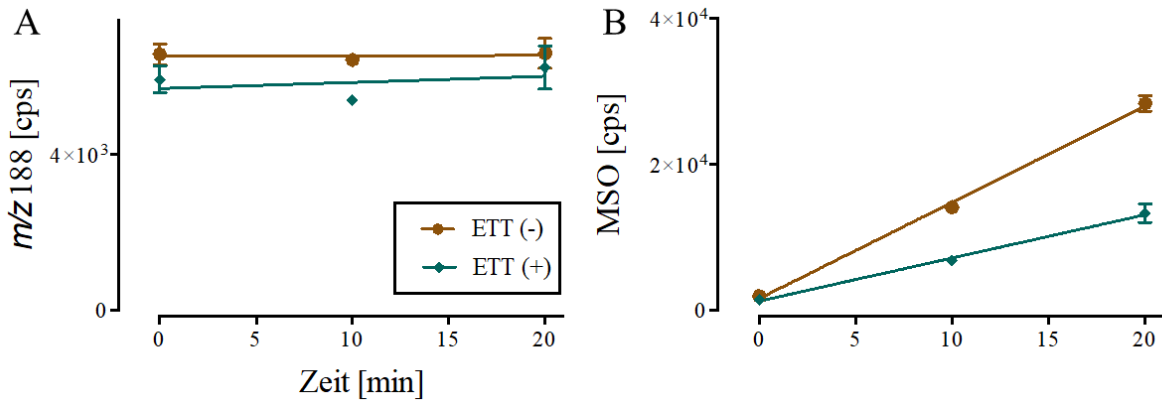


Abbildung 32: Testung des $^1\text{O}_2$ -Histidin-Produkts m/z 188 als intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Indikator. Dargestellt sind m/z 188- und MSO-Intensitäten in Zellysaten von $^1\text{O}_2$, generiert durch TMPyP, gestresste ETT(+/-) Effektzellen über die Zeit von 20 Minuten. Die Zellen wurden ausgesät, die ETT-Expression für 24 Stunden induziert (ETT(+)); ohne ETT-Expression (ETT(-)) und 4 Stunden mit $100 \mu\text{M}$ ET/TMPyP inkubiert. Anschließend wurden die 293 Zellen für 0, 10 und 20 Minuten belichtet und lysiert. Die Intensität von m/z 188 (A) und MSO (B) in den Zellysaten wurden im SRM-Modus mittels LC-MS/MS gemessen. ($n = 3$, Mittelwert \pm SEM).

3.3.2 Testung von TEMP als $^1\text{O}_2$ -Indikator

Es konnte kein endogenes Molekül als $^1\text{O}_2$ -Indikator identifiziert werden. Daher wurde Tetramethylpiperidone (TEMP) als exogener $^1\text{O}_2$ -Indikator getestet (siehe 1.4). TEMP reagiert spezifisch mit $^1\text{O}_2$ zu dem stabilen Radikal TEMPO. Bei Zellexperimenten kann TEMPO durch Ascorbinsäure (ASC) oder Glutathion (GSH) protoniert werden und zu TEMPOH reagieren.

Für das Experiment wurden die 293 +pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert (Kontrolle ohne ETT-Expression). Danach wurden die Zellen mit TEMP/ET/TMPyP-Lösung (Kontrolle ohne TEMP) inkubiert und anschließend belichtet. Die Zellyse erfolgte in HClO_4 mit Ascorbinsäure, damit das Reaktionsgleichgewicht von TEMPO zu TEMPOH verschoben wird (siehe 1.4). MSO- und ET-Konzentration sowie TEMPO- und TEMPOH-Intensität in den Zellysaten wurden mittels LC-MS/MS gemessen (siehe 2.6.3).

Die Kontrollzellen ohne TEMP-Inkubation zeigten in ETT(+) Zellysaten eine signifikant geringere MSO-Konzentration im Vergleich zu ETT(-) Zellysaten (Abbildung 33, A; Tabelle 15). Der gegenläufige Sachverhalt war bei den mit TEMP inkubierten Zellen zu beobachten. Dort wurden in ETT(+) Zellysaten größere MSO-Konzentrationen gemessen als in ETT(-) Zellysaten. Außerdem war die ET-Konzentration in den mit TEMP inkubierten Zellen nahe 0, wohingegen die ETT(+)-Kontrollzellen eine ET-Konzentration von etwa

Ergebnisse

10 nmol/mg Protein im Zelllysate aufwies (B). Die TEMPO-Intensität unterschied sich in allen Zelllysaten nicht signifikant (C). Auch die TEMPOH-Intensität im Vergleich der ETT(+/-) Zelllysaten zeigte keinen Unterschied (D). Hierbei wurden höhere TEMPOH-Intensitäten in den TEMP inkubierten ETT(+/-) Zelllysaten gemessen.

Zusammenfassend war TEMP kein geeigneter $^1\text{O}_2$ -Indikator für zellulären $^1\text{O}_2$ -Schaden. Durch die TEMP-Inkubation konnte der etablierte $^1\text{O}_2$ -Indikator MSO nicht verwendet und ET nicht gemessen werden.

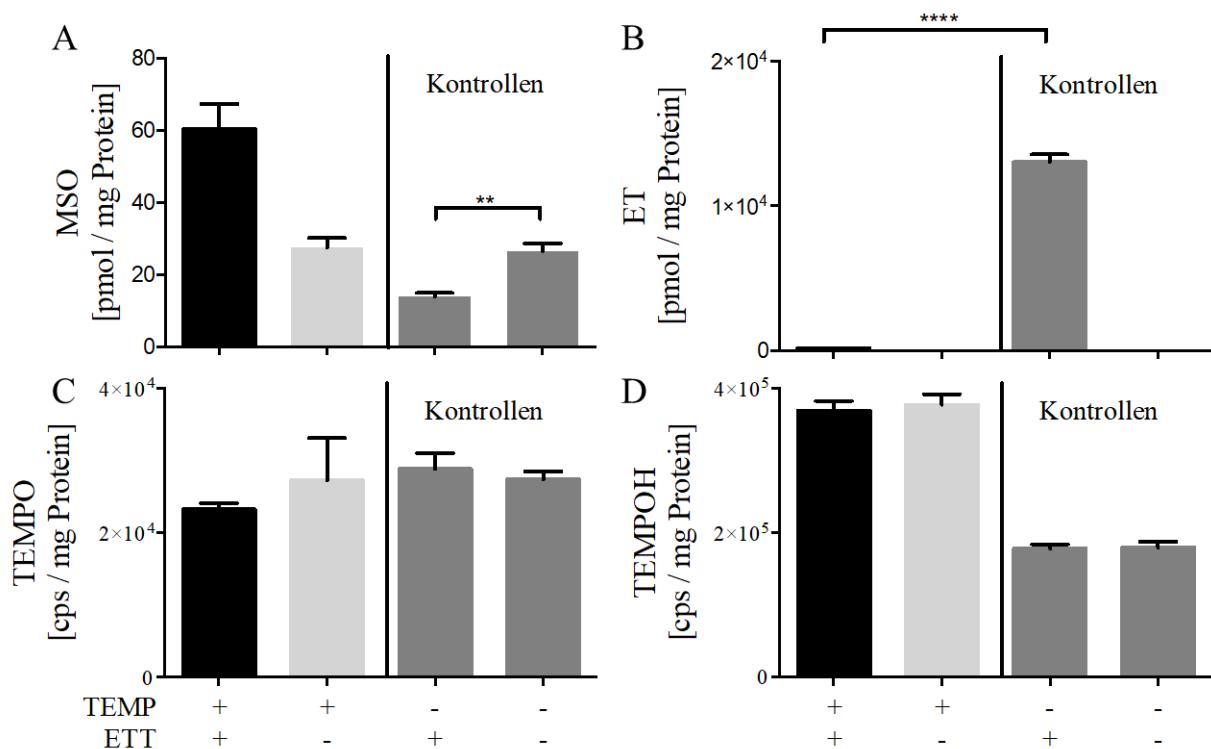


Abbildung 33: Testung von TEMP als intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Indikator. Dargestellt ist die gemessene MSO- (A), ET-Konzentration (B) sowie die TEMPO- (C) und TEMPOH-Intensität (D) in Zelllysaten von Zellen, welche zuvor mit oder ohne TEMP inkubiert wurden. Die Zelllinie 293 + pEBTetD/ETT wurde ausgesät, und die ETT-Expression 24 Stunden vor dem Experiment induziert (ETT(+); Kontrollen ohne ETT-Expression (ETT(-)). Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 4 Stunden mit 20 mM TEMP und 100 μM ET/TMPyP inkubiert (TEMP(+); Kontrollen ohne TEMP (TEMP(-)). Die Zellen wurden für 20 min mit dem UV-Licht belichtet. Im Anschluss wurden die Zellen in 4 mM HClO_4 + 3 mM Ascorbinsäure lysiert und die Zelllysate mittels LC-MS/MS gemessen. Die MSO- und ET-Konzentrationen sowie die TEMPO- und TEMPOH-Intensität wurden in den gleichen Zelllysaten gemessen. (n = 3, Mittelwert \pm SEM, ** P = 0,0017 und **** P < 0,0001).

Tabelle 15: MSO-, ET-Konzentrationen und TEMPO- und TEMPOH-Intensität in Zelllysaten von 293 + pEBTetD/ETT Zellen mit Unterschiedlichen TEMP- und ETT-Bedingungen.

TEMP / ETT	MSO [pmol/ mg Protein]	ET [pmol/ mg Protein]	TEMPO [cps/mg Protein]	TEMPOH [cps/mg Protein]
+ / +	60 ± 7	165 ± 8	23.000 ± 1.000	369.000 ± 14.000
+ / -	28 ± 3	0 ± 0	27.000 ± 6.000	377.000 ± 14.000
- / +	14 ± 1	13.000 ± 500	29.000 ± 2.000	178.000 ± 6.000
- / -	27 ± 2	11 ± 1	27.000 ± 1.000	180.000 ± 8.000

3.4 Versuch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase mit Iodoacetamid zu inhibieren

DHPNO₂ ist ein schwächerer ¹O₂-Generator als die PST BR und TMPyP. Deshalb wurden verschiedene Methoden getestet, mit denen die MSO-Konzentration in DHPNO₂-Experimenten erhöht werden kann. Intrazelluläres MSO wird durch das Enzym Methionin-Sulfoxid-Reduktase (MSR) wieder zu Methionin regeneriert. Aus diesem Grund wurde versucht, die MSR zu inhibieren, um höhere MSO-Konzentrationen durch DHPNO₂ zu generieren.

Literatur-Recherchen ergaben, dass die MSR *in vitro* unspezifisch durch Iodoacetamid inhibiert werden kann [95]. Daher wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät, die ETT-Expression induziert, die Zellen mit Iodoacetamid (Kontrolle ohne Iodoacetamid) und anschließend mit einer ET/TMPyP-Lösung inkubiert wurden (Kontrolle ohne TMPyP). Es folgte eine Belichtung mit Zellyse. Die ET-Konzentration in den Zelllysaten wurden mittels LC-MS/MS gemessen (siehe 2.7).

Die Daten sind in der Einheit „cps“ dargestellt, da keine ET-Eichreihe zur genauen Quantifizierung mitgemessen wurde. Zudem wurde keine Proteinbestimmung aus Gründen der Materialersparnis durchgeführt. Das Experiment diente der Überprüfung, ob 293 Zellen, welche mit ET inkubiert wurden, nach der Iodoacetamid Behandlung noch ET aufwiesen. Bei den Iodoacetamid behandelten Zellen wurde nahezu kein intrazelluläres ET in den Zelllysaten gemessen (Abbildung 34; Tabelle 16). Das Ergebnis bezieht sich auf die untere Nachweisgrenze bei einem Signal-Hintergrundverhältnis von 3:1. Die Kontrollzelllysate wiesen erhebliche ET-Intensitäten auf. Um den ET-Schutzeffekt bei ¹O₂-gestressten Zellen zu

Ergebnisse

analysieren, muss ET der Zelle zur Verfügung stehen. Die Vorbehandlung der Zellen mit Iodoacetamid eignete sich nicht für Experimente zur Untersuchung des ET-Schutzeffekts.

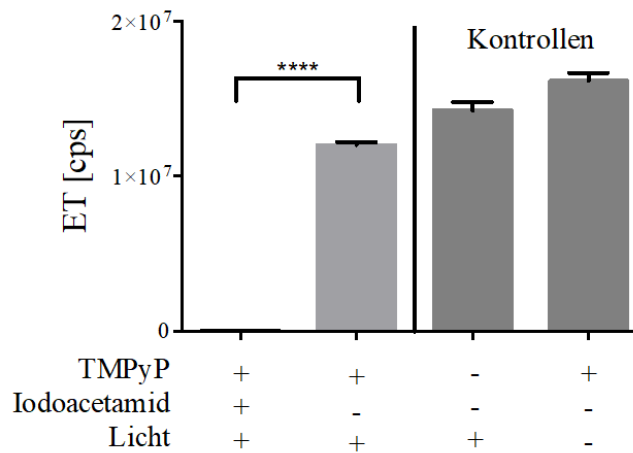


Abbildung 34: ET-Intensität nach Iodoacetamidbehandlung zur Inhibition der Methionin-Sulfoxid-Reduktase in 293 Zellen. Die Zelllinie 293 + pEBTetD/ETT wurde ausgesät, und die ETT-Expression 24 Stunden vor dem Experiment induziert. Die Zellen inkubierten für 30 Minuten mit 10 mM Iodoacetamid (Iodoacetamid(+); Kontrollen ohne Iodoacetamid (Iodoacetamid(-)). Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ M TMPyP und 100 μ M ET für 4 Stunden versetzt (TMPyP(+); Kontrolle ohne TMPyP (TMPyP(-)). Die Zellen wurden für 20 Minuten belichtet (Licht(+); Kontrolle ohne Licht (Licht(-)). Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die ET-Intensität in den Zelllysaten mittels LC-MS/MS bestimmt. (n = 3, Mittelwert \pm SEM, **** P < 0,0001).

Tabelle 16: ET-Intensität in 293 + pEBTetD/ETT Zelllysaten nach unterschiedlichen TMPyP-, Iodoacetamid- und Lichtbehandlungen der Zellen.

TMPyP / Iodoacetamid / Licht	ET [cps]
+ / + / +	32.000 \pm 7.000
+ / - / +	12.000.000 \pm 200.000
- / - / +	14.000.000 \pm 500.000
+ / - / -	16.000.000 \pm 500.000

3.5 Minimierung intrazellulärer $^1\text{O}_2$ -Quencher

Ein neuer Angriffspunkt zur Erhöhung der MSO-Konzentration in der Zelle wurde in Betracht gezogen: die Minimierung der intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quencher. Dadurch soll die Konkurrenzreaktionen zu Methionin mit $^1\text{O}_2$ verringert werden. Dazu wurden zwei Angriffspunkte getestet: (1) Ascorbinsäure (ASC) und (2) Glutathion (GSH).

3.5.1 Ascorbinsäure

ASC ist laut theoretischen Berechnungen zu 16% an dem intrazellulären $^1\text{O}_2$ -quenchen beteiligt (siehe 1.2.1). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob ASC bzw. Dehydroascorbinsäure (DHS) intrazellulär minimiert werden kann. DHS ist die oxidierte Form der ASC und kann durch intrazelluläre Regenerationsmechanismen mit Glutathion und Vitamin E in ASC umgewandelt werden. Es wurde getestet ASC zu minimiert, damit die MSO-Konzentration in den DHPNO₂-Experimenten durch Minimierung von $^1\text{O}_2$ -Konkurrenzreaktion gesteigert wird.

293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden ausgesät und anschließend verschiedene Zusätze ins Medium hinzugegeben. Die Zusätze bestanden aus Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄ [99] oder TEMPO [100] (Kontrolle ohne Zusätze). Anschließend wurden die Zellen in HClO₄ lysiert. Die ASC- und DHS-Konzentration in den Zelllysaten wurden mittels LC-MS/MS bestimmt (siehe 2.8.1).

Keiner der verwendeten Zusätze, Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄ oder TEMPO, führte zu einer signifikanten ASC-Konzentrationsminimierung in den Zelllysaten verglichen zu den Kontrollzelllysaten (Abbildung 35, A; Tabelle 17). Die DHS-Konzentration (B) in den Zelllysaten von Kontrollzellen zeigte eine insgesamt 5,5-fach höhere Konzentration im Vergleich zur ASC-Konzentration. Weder Ni(II)Cl₂ noch Co(II)SO₄ hatten einen signifikanten Einfluss auf die DHS-Konzentration in den Zellen verglichen zu Kontrollzellen. TEMPO hatte einen signifikanten Einfluss auf die DHS-Konzentration, wobei diese in den TEMPO-behandelten Zelllysaten um den Faktor 0,6 verringert war verglichen zu den Kontrollzelllysaten.

Die Inhibitoren, Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄, oder TEMPO, haben gegenüber der Kontrolle keine Reduktion der ASC- oder DHS-Konzentration ergeben und wurden für weitere Experimente nicht verwendet.

Ergebnisse

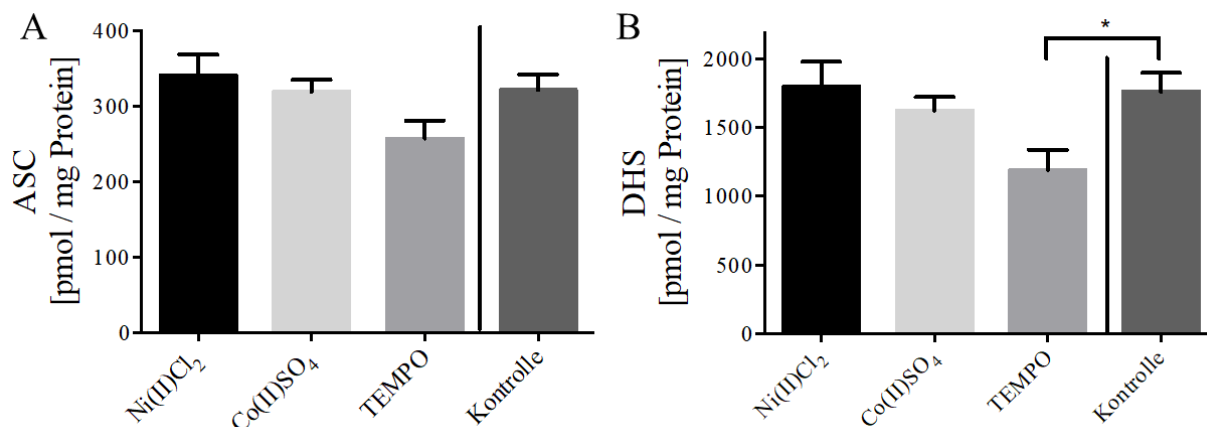


Abbildung 35: ASC- und DHS-Konzentration in Zelllysaten von Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄ oder TEMPO behandelten 293 Zellen. Dargestellt sind die intrazellulären ASC- oder DHS-Konzentrationen (A, B) von 293 + pEBTetD/ETT Zellen, welche mit 0,5 mM Ni(II)Cl₂, 0,25 mM Co(II)SO₄ oder 0,5 mM TEMPO inkubiert wurden. Die Inkubationszeiten betragen für Ni(II)Cl₂ und Co(II)SO₄ 24 Stunden und für TEMPO 30 Minuten. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Zellen in 4 mM HClO₄ lysiert. Die ASC- bzw. DHS-Konzentration in den Zelllysaten wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Dabei wurden ASC und DHS in den gleichen Zelllysaten gemessen (n = 3, Mittelwert ± SEM, * P = 0,0456).

Tabelle 17: ASC- und DHS-Konzentration in Zelllysaten nach Behandlung der Zellen mit Ni(II)Cl₂, Co(II)SO₄ oder TEMPO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bedingungen	ASC [pmol/mg Protein]	DHS [pmol/mg Protein]
Ni(II)Cl ₂	341 ± 28	1.800 ± 180
Co(II)SO ₄	320 ± 16	1.600 ± 100
TEMPO	257 ± 24	1.200 ± 150
Kontrolle	322 ± 20	1.800 ± 150

3.5.2 Glutathion

GSH wurde in der Literatur und einer Dissertation von Johanna Krüger als ¹O₂-Quencher beschrieben [29, 43]. Daher wurde getestet, ob die intrazelluläre GSH-Konzentration verringert werden kann, um die MSO-Konzentration bei DHPNO₂-Experimenten zu erhöhen. Zellen haben eine GSH-Konzentrationen von 5 - 10 mM [101], weshalb die schwache aber spezifische ¹O₂-Generierung mit DHPNO₂ beeinflussen werden könnte. Zur GSH-Minimierung sind in der Literatur zwei Wege bekannt: (1) Enzymatisch durch Buthioninsulfoximin (BSO) oder (2) durch Reaktion von GSH mit Diethylmaleat (DEM; siehe 2.8.2).

Ergebnisse

Die 293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden ausgesät und die ETT-Expression induziert. Zusätzlich wurde zum Induktionsmedium BSO hinzugegeben (Kontrolle ohne BSO). Anschließend wurden BSO(+/-) Zellen zusätzlich mit DEM behandelt (Kontrolle ohne DEM). Es folgte eine ET-Inkubation der Zellen. Danach wurden die Zellen lysiert. Die GSH- und ET-Intensität in den Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS gemessen (siehe 2.8.2).

Das Ergebnis zeigte die prozentuale GSH- und ET-Menge in den Zelllysaten, bezogen auf die Kontrollzelllysate von Zellen ohne BSO- und DEM-Behandlung (Abbildung 36; Tabelle 18). Die einzelnen Bedingungen, 5 mM DEM, 50 μ M BSO oder 100 μ M BSO, zeigten eine durchschnittliche GSH-Menge in den Zelllysate von etwa 20% bezogen auf die Kontrollzelllysate. Auffällig war die Kombination aus 50 μ M BSO und 5 mM DEM. Hierbei wurden 2,3% GSH im Zelllysate gemessen. Damit die GSH-Minimierung für folgende Experimente verwendet werden konnte, wurde der Einfluss von BSO oder DEM auf ET-Menge im Zelllysate untersucht (Abbildung 36, B). Die ET- und GSH-Menge wurden in den gleichen Zelllysaten gemessen. Durch die Zellbehandlung mit BSO/DEM fand keine signifikante ET-Minimierung in Bezug zu den Kontrollzellen statt. Alle Zelllysate wiesen nahezu 100% ET-Gehalt auf (Tabelle 18).

Zusammenfassend zeigte die Kombination aus 50 μ M BSO und 5 mM DEM die größte intrazelluläre GSH-Minimierung mit 97,7% und dabei war die ET-Menge unbeeinflusst.

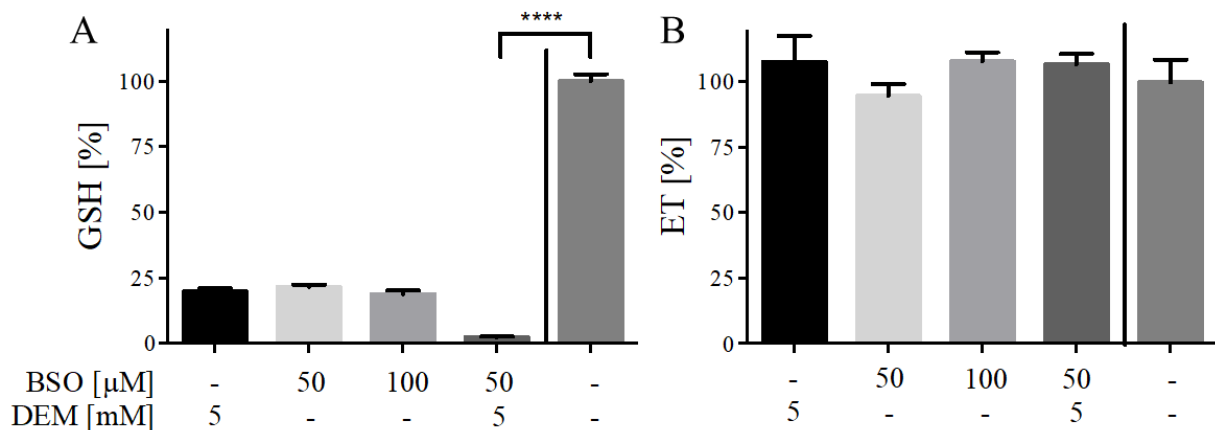


Abbildung 36: Prozentuale GSH- und ET-Menge nach Minimierung von intrazellulären GSH durch BSO und DEM. Dargestellt sind die intrazellulären prozentualen GSH- und ET-Mengen (A, B) in 293 + pEBTetD/ETT Zelllysaten nach verschiedenen BSO und DEM Behandlungen der Zellen. Diese wurden zunächst ausgesät und die ETT-Expression induziert. Anschließend inkubierten die Zellen mit 5 mM DEM, 50 μ M BSO, 100 μ M BSO oder eine Kombination von 50 μ M BSO und 5 mM DEM. Die Inkubationszeiten betragen für BSO 24 Stunden und für DEM 30 Minuten (Kontrolle ohne Behandlung). Die Zellen wurden mit 100 μ M ET für 1 Stunde versetzt und dann lysiert. Die GSH- und ET-Mengen im Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert. (n = 4, Mittelwert \pm SEM, **** P = 0,0001).

Tabelle 18: Prozentuale intrazelluläre GSH- und ET-Mengen in Zelllysaten nach verschiedenen BSO- und DEM-Behandlungen der Zellen im Bezug zur unbehandelten Kontrolle.

Bedingungen	GSH [%]	ET [%]
DEM	20 ± 1	108 ± 10
BSO (50 µM)	22 ± 1	95 ± 5
BSO (100 µM)	19 ± 1	108 ± 4
BSO (50 µM) + DEM	2 ± 1	107 ± 4
Kontrolle	100 ± 3	100 ± 9

3.6 ¹O₂-Generierung durch DHPNO₂ mit minimierten Glutathion in 293-Zellen

Nachdem eine Methode entwickelt wurde mit der intrazelluläres GSH zu 97,7% minimiert werden konnte (siehe 3.5.2), wurde diese Methode in einem DHPNO₂-Experiment mit 293 Zellen angewendet.

Die 293 + pEBTetD/ETT Zellen wurden ausgesät und die ETT-Expression induziert (Kontrolle ohne ETT-Expression). Zusätzlich wurden die Zellen mit BSO und DEM behandelt. Es folgte ein ET-Inkubation der Zellen mit anschließender DHPNO₂-Exposition (Kontrolle ohne DHPNO₂). Die MSO-Konzentration in den generierten Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert (siehe 2.8.2; 2.5.4).

Auch mit GSH-Minimierung in den Zellen konnten bei den DHPNO₂-Experimenten keine reproduzierbaren Ergebnisse generiert werden (Abbildung 37; Tabelle 19). Dabei stehen die Graphen von (A) und (B) beispielhaft für insgesamt vier Experimente. In den Zelllysaten von ETT(+) zu ETT(-) Effektzellen wurde ein signifikanter MSO-Konzentrationsunterschied gemessen (A). Dort wurde um den Faktor 4 mehr MSO in ETT(-) Effektzellen gebildet. Die Kontrollzellen (ohne DHPNO₂-Inkubation) zeigten keine erhöhte MSO-Konzentration in ETT(+/-) Zellen. In einem weiteren Experiment war weder in ETT(+) noch in ETT(-) Zelllysaten ein signifikanter Unterschied zu beobachten (B). Die MSO-Konzentration war nahezu gleich in allen Zelllysaten.

Abschließend konnten keine Aussagen über die Funktionalität des DHPNO₂-Systems in Zellen getroffen werden. Es gab Indizien für eine geringe MSO-Generierung durch DHPNO₂ in ETT(+) Zellen, jedoch zeigten zwei von vier Experimenten dieses Ergebnis nicht.

Ergebnisse

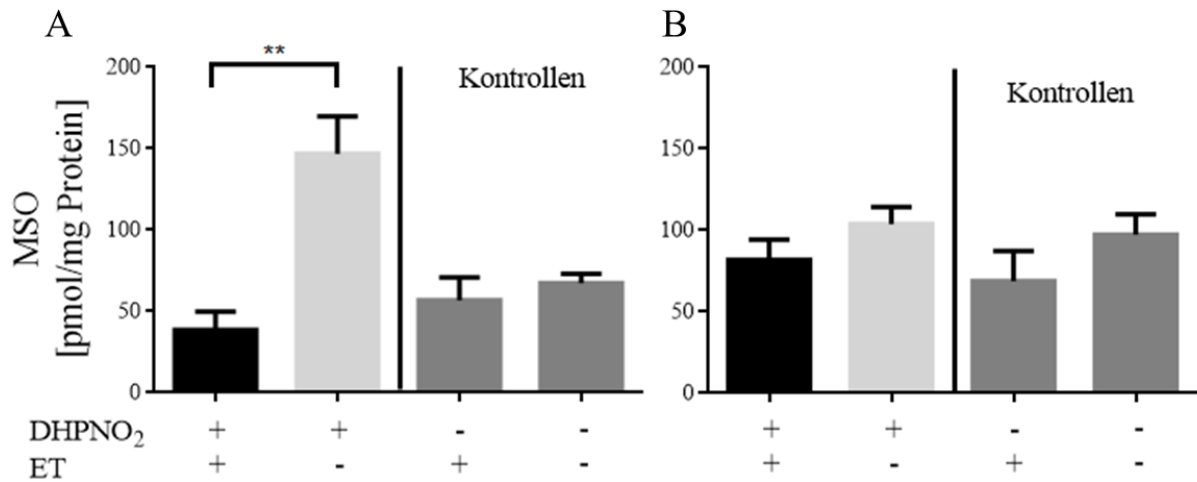


Abbildung 37: MSO-Konzentration in Zelllysaten von DHPNO₂ gestressten ETT(+/-) Zellen bei minimierten GSH-Mengen. Dargestellt sind zwei exemplarische Experimente (A, B) bei denen 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert wurde (ETT(+); Kontrolle ohne ETT-Expression (ETT(-)). Parallel zur Expressionsinduktion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50 μ M BSO versetzt. Anschließend wurden diese 30 Minuten mit 5 mM DEM, dann für 1 Stunde mit 100 μ M ET inkubiert und danach 10 mM DHPNO₂ bei 37 °C für 2 Stunden ausgesetzt (DHPNO₂(+); Kontrolle ohne DHPNO₂ (DHPNO₂(-)). Die MSO-Konzentration wurde in den generierten Zelllysate mittels LC-MS/MS gemessen. (n = 4, Mittelwert \pm SEM, ** P = 0,0059).

Tabelle 19: MSO-Konzentrationen in Zelllysaten von zwei unterschiedlichen Experimenten nach verschiedenen DHPNO₂- und ETT-Bedingungen von GSH-minimierten Zellen.

DHPNO ₂ / ETT	MSO [pmol/mg Protein]	
	Experiment A	Experiment B
+ / +	37 \pm 11	82 \pm 13
+ / -	147 \pm 23	104 \pm 11
- / +	57 \pm 14	69 \pm 19
- / -	67 \pm 6	97 \pm 12

3.7 Intrazellulärer ¹O₂-Quenchvergleich von Ergothionein und Glutathion

Mit der zuvor etablierten BSO/DEM-Methode konnte die GSH-Konzentration intrazellulär auf 2,3% minimiert werden (siehe 3.5.2). Diese wurde nun für einen intrazellulärer ¹O₂-Quenchvergleich von ET und GSH verwendet. GSH(-) wird vereinfach für die 2,3% GSH des Ausgangslevel und GSH(+) für die unbehandelten Zellen verwendet. Durch die Induzierbarkeit des ETT konnte mit ETT(+/-) die ET-Aufnahme in die Zellen gesteuert werden.

Ergebnisse

Es wurden vier verschiedene Bedingungen generiert:

- ETT(+)/GSH(+)
- ETT(+)/GSH(-)
- ETT(-)/GSH(+)
- ETT(-)/GSH(-)

Beim ET-GSH-Vergleichsexperiment wurden die 293 + pEBTetD/ETT Zellen ausgesät und die ETT-Expression induziert (ETT(-) ohne ETT-Expression). Parallel wurden die Zellen mit BSO versetzt (GSH(+) ohne BSO). Anschließend wurden die BSO behandelten Zellen mit DEM inkubiert (GSH(+) ohne DEM). Danach wurden alle Zellen mit einer ET/TMPyP-Lösung versehen (Kontrolle ohne TMPyP). Ein Zeitverlauf wurde durch Zelllyse nach unterschiedlichen Belichtungszeiten generiert (Kontrolle ohne Licht). Die MSO- und ET- und GSH-Konzentrationen wurden in den gleichen Zelllysaten per LC-MS/MS gemessen (siehe 2.8.2).

Die vier Bedingungen führten zu Zelllysaten, welche unterschiedlich hohe MSO-Konzentrationssteigerungen über die Zeit zeigten (Abbildung 38, A; Tabelle 20). Die MSO-Ausgangskonzentrationen der ETT(+/-) Effektzellen lag bei etwa 15 pmol/mg Protein. Die ETT(-)/GSH(-) Zelllysate zeigten die größte MSO-Konzentrationssteigerung mit 6 pmol/(min*mg Protein). Die zweitgrößte MSO-Steigerung hatten die ETT(-)/GSH(+) Zelllysate mit 4,2 pmol/(min*mg Protein), gefolgt von ETT(+)/GSH(-) Zelllysaten mit 2,1 pmol/(min*mg Protein), welche identisch mit den von ETT(+)/GSH(+) Zelllysaten waren. Somit entstand in ETT(+)/GSH(+/-) Zellen im Vergleich zu ETT(-)/GSH(+) Zellen halb so viel und im Vergleich zu ETT(-)/GSH(-) Zellen sogar ein Drittel weniger MSO. Die gemessenen Zelllysate der Kontrollzellen wiesen über die Zeit keinen MSO-Konzentrationsanstieg auf (B, C).

Ergebnisse

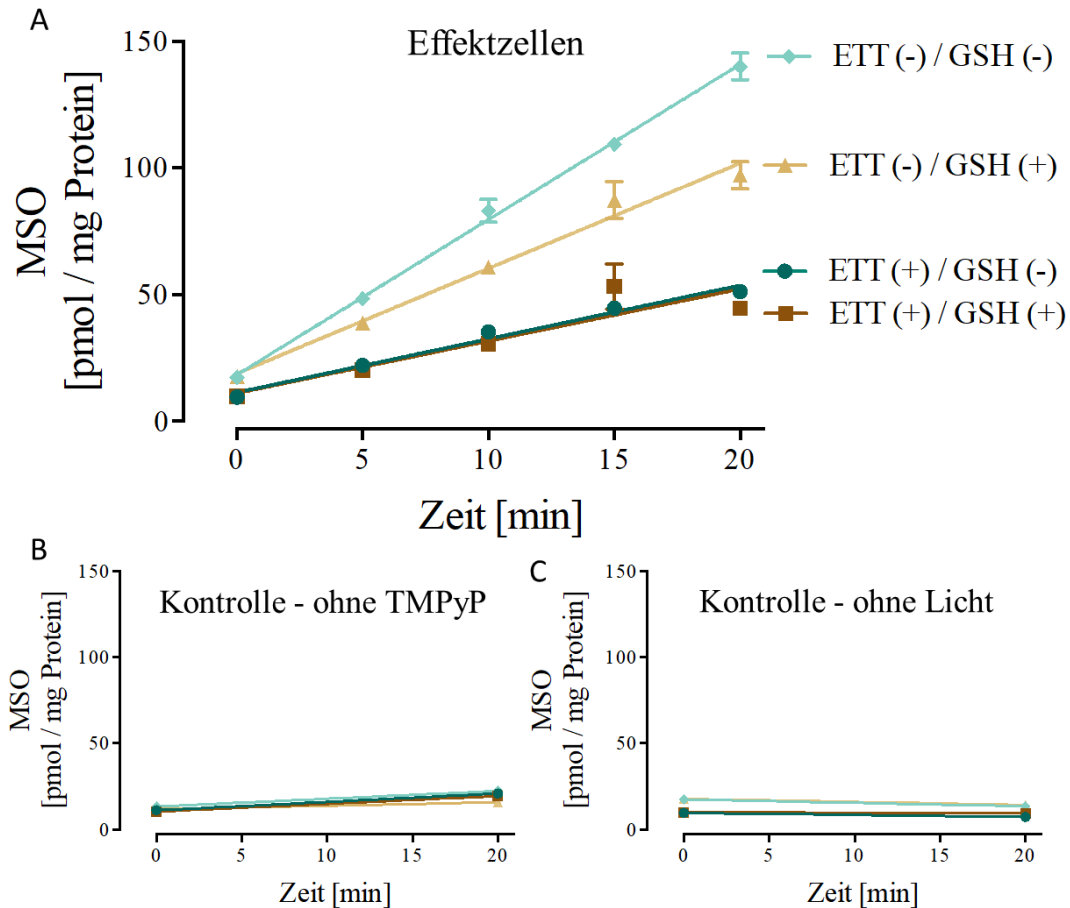


Abbildung 38: Vergleich des intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quenchverhaltens von ET und GSH. Dargestellt ist die MSO-Konzentration in Zelllysaten von Zellen mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-). Hierfür wurden die ETT-Expression in ETT(+) Zellen für 24 Stunden induziert (ETT(-) ohne ETT-Expression). Parallel wurden die GSH(-) Zellen mit 50 μM BSO versetzt (GSH(+) ohne BSO). Nach 24 Stunden wurden die GSH(-) Zellen zusätzlich mit 5 mM DEM behandelt (GSH(+) ohne DEM). Die Zellen wurden mit einer 100 μM ET/TMPyP-Lösung für 4 Stunden inkubiert. Es folgte eine Belichtung mit Zellyse nach den verschiedenen Belichtungszeiten. Die gemessenen MSO-Konzentrationen in Zelllysaten der Effektzellen sind in (A), die Kontrollzellen ohne TMPyP in (B) und die ohne Belichtung in (C) dargestellt. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Tabelle 20: Lineare Funktionsgleichungen zur Beschreibung der MSO-Konzentrationsgraphen gemessen in Zelllysaten von Effekt- und Kontrollzellen ohne Licht oder ohne TMPyP-Behandlung mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-).

Bedingung	MSO [pmol/(min*mg Protein)]		
	Effektzellen	ohne Licht	ohne TMPyP
ETT(+)/GSH(+)	$2,1 x + 11$	$- 0,02 x + 10$	$0,5 x + 10$
ETT(+)/GSH(-)	$2,1 x + 12$	$- 0,1 x + 10$	$0,5 x + 11$
ETT(-)/GSH(+)	$4,2 x + 19$	$- 0,2 x + 18$	$0,2 x + 12$
ETT(-)/GSH(-)	$6,0 x + 18$	$- 0,2 x + 17$	$0,5 x + 13$

Ergebnisse

Für die Messung der intrazellulären ET-Konzentrationen wurden die gleichen Zelllysate verwendet, wie zuvor für die Messung der MSO-Konzentration. Nahezu kein ET konnte in ETT(-) Zelllysaten gemessen werden (Tabelle 21; Abbildung 39, ETT(-)/GSH(+/-)). Die ET-Konzentration in ETT(+) Zelllysaten war über die Zeit auf einem gleichbleibenden Level (A). Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzelllysaten (B, C). Bezogen auf die MSO-Konzentrationen (Tabelle 20) stieg in ETT(+) Zellen die MSO-Konzentration am wenigsten an und die ET-Konzentration wurde über die Zeit nicht verbraucht.

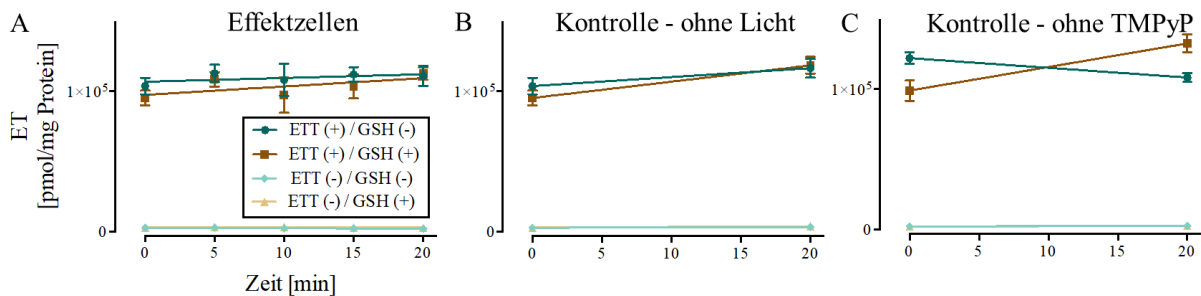


Abbildung 39: ET-Konzentration über die Zeit in ETT(+/-) Zelllysaten von Zellen mit und ohne GSH. Dargestellt ist die ET-Konzentration in Zelllysaten von Zellen mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-). Hierfür wurden die ETT-Expression in ETT(+) Zellen für 24 Stunden induziert (ETT(-) ohne ETT-Expression). Parallel wurden die GSH(-) Zellen mit 50 μ M BSO versetzt (GSH(+)) ohne BSO). Nach 24 Stunden wurden die GSH(-) Zellen zusätzlich mit 5 mM DEM behandelt (GSH(+)) ohne DEM). Die Zellen wurden mit einer 100 μ M ET/TMPyP-Lösung für 4 Stunden inkubiert. Es folgte eine Belichtung mit Zelllyse nach den verschiedenen Belichtungszeiten. Die gemessenen ET-Konzentrationen in Zelllysaten der Effektzellen sind in (A), die Kontrollzellen ohne TMPyP in (B) und die ohne Licht-Behandlung in (C) dargestellt. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Tabelle 21: Lineare Funktionsgleichungen zur Beschreibung der ET-Konzentrationsgraphen gemessen in Zelllysaten von Effektzellen und Kontrollzellen ohne Licht- oder ohne TMPyP-Behandlung mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-).

Bedingung	ET [pmol/min mg Protein]		
	Effektzellen	ohne Licht	ohne TMPyP
ETT(+)/GSH(+)	$597 x + 97.000$	$1.200 x + 95.000$	$1.700 x + 99.000$
ETT(+)/GSH(-)	$266 x + 107.000$	$637 x + 104.000$	$- 691 x + 122.000$
ETT(-)/GSH(+)	$-12 x + 3.000$	$43 x + 3.000$	$30 x + 2.000$
ETT(-)/GSH(-)	$-37 x + 3.000$	$23 x + 3.000$	$20 x + 2.000$

Ergebnisse

Für einen $^1\text{O}_2$ -Quenchvergleich von ET und GSH mussten vergleichbare Ausgangskonzentrationen der beiden Moleküle hergestellt werden. Nur wenn ET bei ETT(+)/GSH(-) Zellen und GSH bei ETT(-)/GSH(+) Zellen annähernd gleiche Konzentrationen aufwies, waren die Ergebnisse der MSO-Messung (Tabelle 20) vergleichbar.

Das jeweilige minimale GSH- oder ET-Grundlevel, welches durch den experimentellen Aufbau erreicht werden konnte, war durch die ETT(-)/GSH(-) Zelllysate gezeigt (Abbildung 40; Tabelle 22). In den ETT(+)/GSH(-) Zelllysaten wurde eine ET-Konzentration von 104 nmol/mg Protein gemessen, welche verglichen werden muss mit der GSH-Konzentration aus den ETT(-)/GSH(+) Zelllysaten mit 140 nmol/mg Protein. Die GSH-Konzentration im Vergleich zur ET-Konzentration war um den Faktor 1,3 erhöht. Bei den ETT(+)/GSH(+) Zelllysaten war die GSH-Konzentrationen um den Faktor 0,5 und die ET-Konzentration um den Faktor 0,9 verringert im Vergleich zu den ETT(+)/GSH(-) bzw. ETT(-)/GSH(+) Zelllysaten.

Zusammenfassend zeigte sich, dass es durch GSH-Minimierung nicht zu einer geringeren ET-Konzentration kam. Die ET-Konzentration beim Ausbleiben der GSH-Minimierung in den Zellen war signifikant erhöht. Für den Vergleich zur Einzelbetrachtung von ET und GSH als $^1\text{O}_2$ -Quencher, war kein signifikanter Unterschied dokumentiert. Die ET-Konzentration in ETT(+)/GSH(-) sowie die GSH-Konzentration in ETT(-)/GSH(+) in Abwesenheit des jeweils anderen war ähnlich. Somit wurde gezeigt, dass ET ein effektiverer $^1\text{O}_2$ -Quencher ist als GSH.

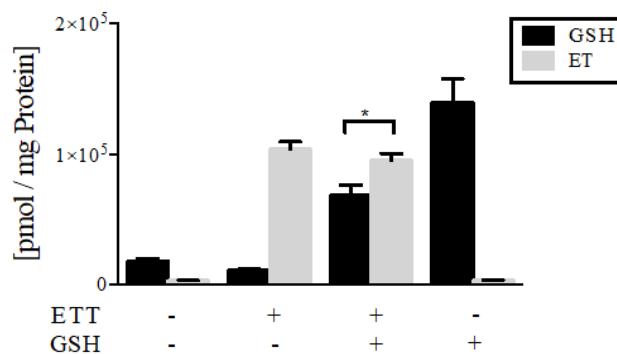


Abbildung 40: Vergleich der ET- und GSH-Ausgangskonzentrationen des ET-GSH-Quenchvergleichs. Dargestellt sind die ET- und GSH-Konzentrationen von Zelllysaten aus dem Experiment von Abbildung 38 mit den Zellbedingungen ETT(-)/GSH(-), ETT(+)/GSH(-), ETT(+)/GSH(+) oder ETT(-)/GSH(+). Hierfür wurden die ETT-Expression in den ETT(+) Zellen 24 Stunden induziert (ETT(-) ohne ETT-Expression). Parallel wurden die GSH(-) Zellen mit 50 μM BSO versetzt (GSH(+) ohne BSO). Nach 24 Stunden wurden die GSH(-) Zellen zusätzlich mit 5 mM DEM inkubiert (GSH(+) ohne DEM). Anschließend wurden die Zellen mit 100 μM ET/TMPyP-Lösung für 4 Stunden inkubiert und lysiert. Die Konzentration der gemessenen Intensitäten wurde mit Hilfe einer ET-Eichreihe oder mittels GSH-Nullpunktbestimmung berechnet. (n=3, Mittelwert \pm SEM, * P = 0,0492).

Tabelle 22: ET- und GSH-Anfangskonzentrationen in Zelllysaten von Zellen mit den Bedingungen ETT(+)/GSH(+), ETT(+)/GSH(-), ETT(-)/GSH(+) und ETT(-)/GSH(-).

ETT / GSH	GSH [pmol/mg Protein]	ET [pmol/mg Protein]
- / -	18.000 ± 2.000	2.800 ± 200
+ / -	11.000 ± 1000	104.000 ± 6.000
+ / +	68.000 ± 8.000	95.000 ± 5.000
- / +	140.000 ± 18.000	3.000 ± 200

3.8 Reaktion von Ergothionein und Hercynin mit $^1\text{O}_2$ *in vitro* und in 293 Zellen

Die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET oder Hercynin (HER; ET ohne Schwefel) ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Deshalb wurde in dieser Arbeit $^1\text{O}_2$ spezifisch mittels DHPNO₂ in Gegenwart von ET oder HER *in vitro* inkubiert und die Reaktionsprodukte untersucht. HER wurde hier als Kontrolle parallel analysiert, da es sich nur durch ein fehlendes Schwefelatom an Position 2 des Imidazolrings von ET unterscheidet. Durch diesen Unterschied könnten Rückschlüsse über die Reaktion und die Bedeutung des Schwefels gezogen werden. Zur Validierung wurde die Reaktion von $^1\text{O}_2$ aus DHPNO₂ mit ET zusätzlich mit TMPyP als $^1\text{O}_2$ generierendes System durchgeführt. Anschließend wurden Strukturformeln der gefundenen Reaktionsprodukte postuliert und die Reaktivität und Stabilität der entstanden ET- und HER-Produkte in verschiedenen Konzentrationen von Ascorbinsäure (ASC), Glutathion (GSH) oder Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) überprüft. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Für alle folgenden Versuche wurden Kontrollreaktionen angefertigt und zwar mit ET und ohne DHPNO₂ bzw. mit DHPNO₂ und ohne ET. Zusätzlich wurden Kontrollen zu den Zeitpunkten 0 und 60 Minuten mit ET und unterschiedlichen ASC-, GSH- oder TRIS-Konzentrationen durchgeführt, um eine Bildung von Reaktionsprodukten ohne DHPNO₂ auszuschließen. Wenn nicht anders beschrieben, konnte keine Reaktion von ET mit den einzelnen Komponenten nachgewiesen werden.

Die Proben wurden via LC-MS untersucht. Dabei wurden zunächst Fullscananalysen von den Reaktionsansätzen durchgeführt und die gefundenen roten Signale anschließend mittels Produktionenscan fragmentiert. Die entstanden Fragmente wurden mögliche Strukturen zugeordnet und dann mittels Zeitverläufen in Selected Reaction Monitoring (SRM)-Analysen beschrieben (siehe 2.10). Dabei werden im Folgenden alle Ergebnisse in Counts per second

(cps) angegeben, welches eine Maßeinheit für die Detektionsrate der gemessenen Moleküle am MS-Detektor ist. Die identifizierten Moleküle werden zur Vereinfachung als m/z des Mutterions benannt. Nur bei fehlender Eindeutigkeit der Mutterion- m/z wurde ein zugehöriges Fragment der Benennung hinzugefügt. Bei der Verwendung von $^1\text{O}_2$ in Reaktionsansätzen ist damit vereinfacht der Einsatz von DHPNO_2 gemeint. Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz als Reaktion von DHPNO_2 mit ET oder HER definiert.

3.8.1 Synthese von Hercynin

HER konnte nicht käuflich erworben werden. Deswegen wurde es durch die Reaktion von α -N,N-Dimethyl-L-Histidin und Iodmethan mit anschließender Aufreinigung über eine Kieselgelsäule mit Mhmd Oumari selbst hergestellt (siehe 2.9) [106]. Zur Überprüfung der Produkte wurde eine analytische Kieselgeldünnschichtchromatographie durchgeführt und anschließend mittels Ioddampf gefärbt (Abbildung 41). Dort zu sehen ist zum einen die HER-Positivkontrolle einer vorhergegangenen Eigensynthese aus der Arbeitsgruppe Gründemann (Kontrolle), das eingesetzte α -N,N-Dimethyl-L-Histidin (Edukt) und das neue selbst synthetisierte HER (Produkt). Bei einem Einsatz von 60 mg Edukt konnten 21 mg HER generiert werden. Fullscananalysen des synthetisierten HER (m/z 198) sollten die Reinheit überprüfen. Dabei wurde überwiegend HER (gleich 100% gesetzt), jedoch auch schwächere Signale bei m/z 196 (16% bezogen auf HER) und 212 (13,54% bezogen auf HER) im Ansatz gefunden. Diese Nebenprodukte werden bei den folgenden Reaktionen von $^1\text{O}_2$ mit HER nicht mehr aufgeführt.

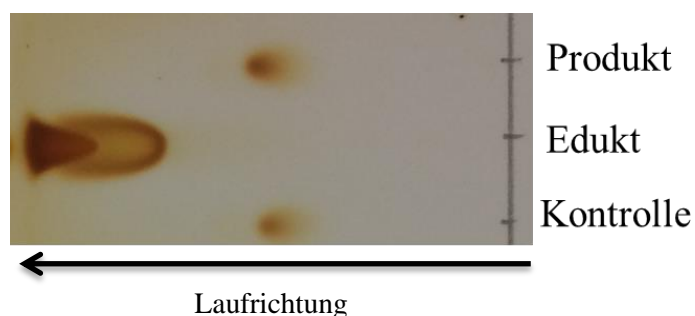


Abbildung 41: Analytische Dünnschichtchromatographie der HER-Synthese. Überprüfung des HER-Produkts nach der Reaktion von α -N,N-Dimethyl-L-Histidin mit Iodmethan. Gezeigt ist eine in der AG Gründemann synthetisierte HER-Positivkontrolle (Kontrolle), das α -N,N-Dimethyl-L-Histidin als Negativkontrolle (Edukt) und das selbst synthetisierte HER (Produkt). Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Ioddampf gefärbt.

3.8.2 Fullscananalyse der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Ergothionein

Zum Detektieren der entstandenen Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER wurden diese im Fullscanmodus der LC-MS analysiert (siehe 2.10). Durch die Methode der Differenzabtönung konnten die gemessenen Proben visualisiert werden. Bei dem Vergleich von Proben nach 0 und 60 Minuten Reaktionszeit bei 37 °C konnten rote Signale Molekülen zugeordnet werden, die zu Beginn der Reaktion nicht vorhanden waren und über die Zeit entstanden sind. Türkise Signale zeigten Moleküle, die bei der Reaktion verbraucht wurden.

Abbildung 42 zeigt ein beispielhaftes Differenzabtönungsbild mit den Hauptprodukten der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET in H_2O . Dabei sind in gelber Schrift die m/z (x Achse) der wichtigsten Signale beschrieben und die y-Achse spiegelt die Retentionszeit der Moleküle wieder.

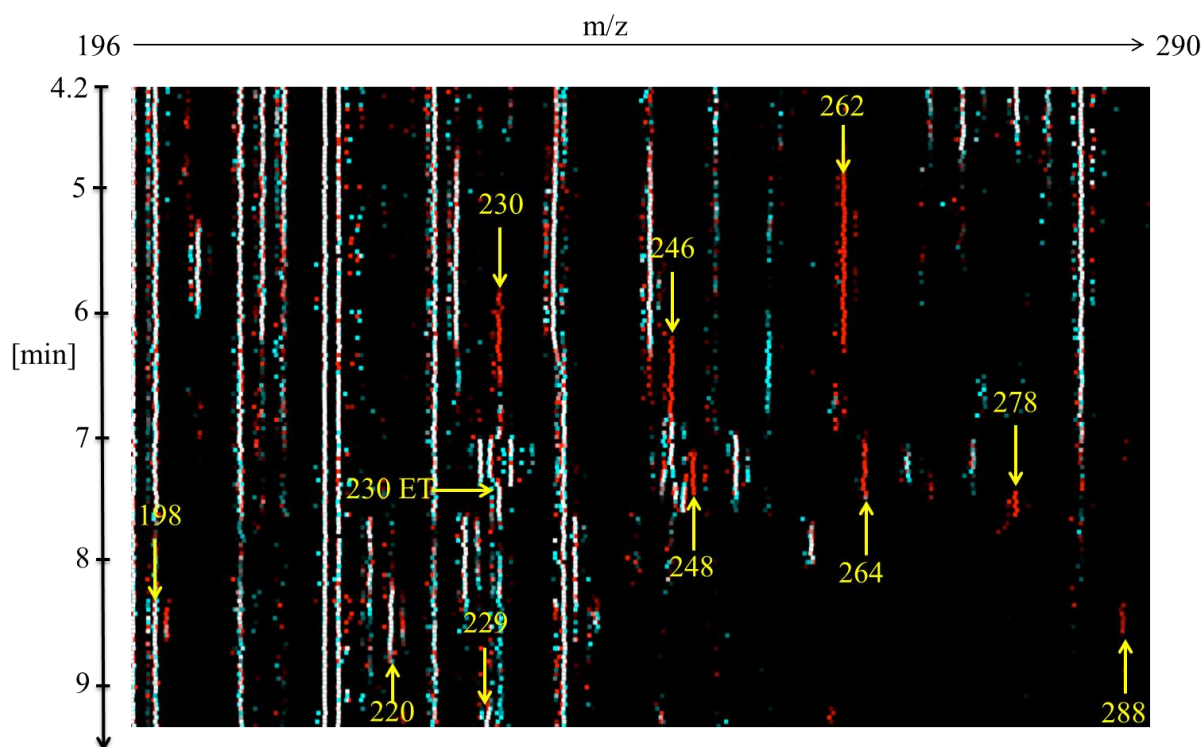


Abbildung 42: Differenzabtönungsbild der $^1\text{O}_2$ + ET-Reaktion in H_2O . Dargestellt sind rote (in Effektbedingungen erhöhte Intensität) und türkise (in Kontrollbedingungen erhöhte Intensität) Signale detektiert bei der Reaktion von DHPNO₂ (10 mM) mit ET (100 μM) in H_2O bei 37 °C für 0 oder 60 Minuten. Die detektierten ET-Produkte sind mit gelben Pfeilen und dem m/z -Verhältnis gekennzeichnet. Anhand der y-Achse kann die Retentionszeit der Signale bestimmt werden.

Ergebnisse

Durch diese Vorgehensweise wurden weitere Reaktionsprodukte in den verschiedenen Reaktionsansätzen von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER in GSH oder TRIS gefunden (Differenzabbildungsbilder nicht gezeigt). Eine Zusammenfassung der gefundenen ET- oder HER-Produkte ist in der Tabelle 23 beschrieben. Dabei spielte die Retentionszeit eine wichtige Rolle bei der Identifizierung von Konstitutionsisomeren, wie bei m/z 365 (Abbildung 48). Die Moleküle hatten das gleiche m/z -Verhältnis, aber andere chemische Strukturen, weswegen das Laufverhalten über die HPLC-Säule und somit die Retentionszeit unterschiedlich war. Die in der Tabelle aufgeführten Ansätze beschreiben, bei welchen Reaktionsansätzen das jeweilige Reaktionsprodukt gefunden wurde. Aus diesen jeweiligen Ansätzen der identifizierten Moleküle wurden dann die Fullscanintensitäten berechnet (siehe 2.12). Die strukturelle Aufklärung der Produkte war anhand des Fragmentierungsmusters nicht vollkommen eindeutig. Daher wurde zusätzlich die akkurate Masse mit der exakten Masse (berechnete Masse) verglichen, um die Summenformel des Produkts zu bestätigen.

Ergebnisse

Tabelle 23: Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER. Hier sind die Mutterionprodukte mit den in der SRM-Methode verwendeten Fragmenten, Retentionszeit, akkurate Massen, exakte Massen, Fullscanintensitäten und Reaktionsansätze, in welchen die Produkte gefunden wurden, aufgelistet.

Mutterion [m/z]	Fragment [m/z]	Ret [min]	akkurate Masse [m/z]	exakte Masse [m/z]	FS- Intensität [*10 ⁶ cps]	Reaktionsansatz
77	60	2,1	n. m.	n. m.	0,3	ET + $^1\text{O}_2$
198	95	8,1	198,1237	198,1242	9,1	ET + $^1\text{O}_2$
214	111	6,9	214,1181	214,1186	n. m.	HER + $^1\text{O}_2$
220	n. m.	8,1	220,105	220,1054	3,8	ET + $^1\text{O}_2$
229	185	9	229,0866	229,0884	-8,5	ET + $^1\text{O}_2$
230	127	6,8	230,0959	230,0963	n. m.	ET + $^1\text{O}_2$
230	153	7,2	230,1137	230,114	4,2	HER + $^1\text{O}_2$
230	171	6,1	230,1133	230,114	7,1	HER + $^1\text{O}_2$
246	143	6,6	246,0905	246,0912	-1,9	ET + $^1\text{O}_2$
246	229	6,2	246,1084	246,1089	3,1	HER + $^1\text{O}_2$
248	188	7	248,1241	248,1246	6,2	HER + $^1\text{O}_2$
262	245	5,4	262,085	262,0861	10	ET + $^1\text{O}_2$
264	188	6,7	264,1012	264,1018	1,3	ET + $^1\text{O}_2$
270	n. m.	7	270,1056	270,1058	0,5	ET + $^1\text{O}_2$
278	188	7,2	278,0802	278,081	1,5	ET + $^1\text{O}_2$
288	212	8,5	288,1121	288,113	1	ET + $^1\text{O}_2$
333	274	6,7	333,1767	333,1774	29	HER + 5 mM TRIS + $^1\text{O}_2$
349	290	6,9	n. m.	n. m.	0,3	HER + 5 mM TRIS + $^1\text{O}_2$
365	230	6,9	365,149	365,1494	13*	ET + 5 mM TRIS + $^1\text{O}_2$
365	244	7,2	365,149	365,1494		ET + 5 mM TRIS + $^1\text{O}_2$
493	230	6,9	493,1891	493,1903	0,2	ET + $^1\text{O}_2$
519	460	7,9	519,1863	519,1873	4,4	HER + 1 mM GSH + $^1\text{O}_2$
535	228	7,8	535,1814	535,1822	6,4	HER + 1 mM GSH + $^1\text{O}_2$
551	244	7,7	551,5983	551,1593	1,7	ET + 0,1 mM GSH + $^1\text{O}_2$
553	246	7,9	553,1741	553,175	0,95	ET + 1 mM GSH + $^1\text{O}_2$

cps = counts per second; FS = Fullscan; n. m. = nicht messbar; Ret = Retentionszeit;

*Peaks waren nicht separat integrierbar, deswegen wurden die Peakflächen beider Moleküle zusammengefasst.

Durch die Parameter in der Tabelle 23 konnte eine spezifische Identifikation der einzelnen Produkte gewährleistet werden. Die einzelnen Produkte werden im Folgenden anhand der chemischen Strukturen basierend auf dem Fragmentmuster vorgestellt. Weiterhin werden die Eigenschaften in Abhängigkeit der DHPNO₂-Konzentration und dem Einfluss von ASC, GSH und TRIS auf die ET- und HER-Produktbildung über die Zeit beschrieben. Zusätzlich werden diese Produkte in ETT(+/-)/GSH(+/-) Zelllysaten analysiert.

3.8.3 Fragmentierungen der Ergothionein- und Hercyninprodukte

Die gefundenen ET- und HER-Produkte aus den Differenzabtönungsbildern wurden fragmentiert (siehe 2.11.5). Beim Fragmentieren werden intramolekulare chemische Verbindungen des Mutterions durch Kollision mit Stickstoffgas aufgebrochen. Die entstandenen Tochterionen, welche die stabilen Fragmente des Mutterions darstellen, werden detektiert und ergeben ein mutterionspezifisches Fragmentmuster. Die Intensität der entstandenen Fragmente spiegelt die Stabilität wieder. Höhere Intensitäten bedeuten hierbei eine höhere Stabilität des Fragments. Durch Abgleich mit Datenbanken können Rückschlüsse über die Struktur des Mutterions gezogen werden (siehe 2.11.5). Sollte das Molekül nicht beschrieben sein, wird das Fragmentmuster interpretiert. Dabei werden die einzelnen Fragmente dem Mutterion plausibel zugeordnet, um dessen mögliche Struktur zu beschreiben. Zu beachten ist hierbei, welche chemischen Reaktionen bei einer Fragmentierung möglich sind. Es hat sich herausgestellt, dass meist ungeladene, kleine Moleküle das Mutterion verlassen und sie somit gute Molekülabgangsgruppen darstellen.

Im Folgenden sind die Fragmentierungen der in den Differenzabtönungsbildern (Abbildung 42) detektierten Signale dargestellt. Alle Fragmentmusteranalysen zeigen links das gemessene Fragmentmuster des Mutterions und rechts die postulierten Strukturen der Fragmente und das Mutterion (Beispiel: Abbildung 43). Hierbei wurden die exakten Massen der Summenformeln durch Messung der akkuraten Masse bestätigt (Tabelle 23). Die genaue Struktur der Moleküle wurde aufgrund von Plausibilitäten beschrieben, dies ist jedoch kein eindeutiger Beweis für die postulierte Struktur. Einzelne Doppelbindungen oder Anordnungen können sich vom tatsächlichen Molekül unterscheiden.

Beispielhaft werden das Vorgehen und die Besonderheiten für ET (m/z 230) beschrieben (Abbildung 43). Die ET-Fragmentierung zeigte die Fragmente m/z 186, 127 und 60. Bei der m/z 186 verlässt ein CO₂, bei der m/z 127 ein CO₂ und eine Trimethylamingruppe (C₃H₉N)

Ergebnisse

das Mutterion. m/z 60 stellte die positiv geladene Trimethylammingruppe dar. Alle Fragmente wurden dem Mutterion zugeordnet. Charakteristisch war m/z 60, welches nahezu bei allen folgenden Fragmentmustern auftritt und nicht mehr als Fragmenterklärung aufgeführt wird. Die Nummerierung des Imidazolrings ist exemplarisch für ET gezeigt, welches auf alle Produkte übertragen werden kann.

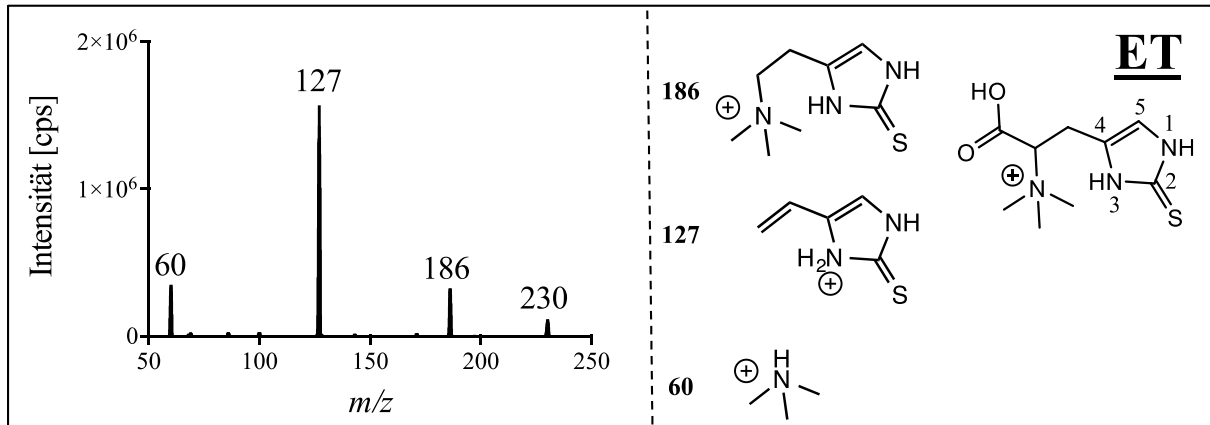
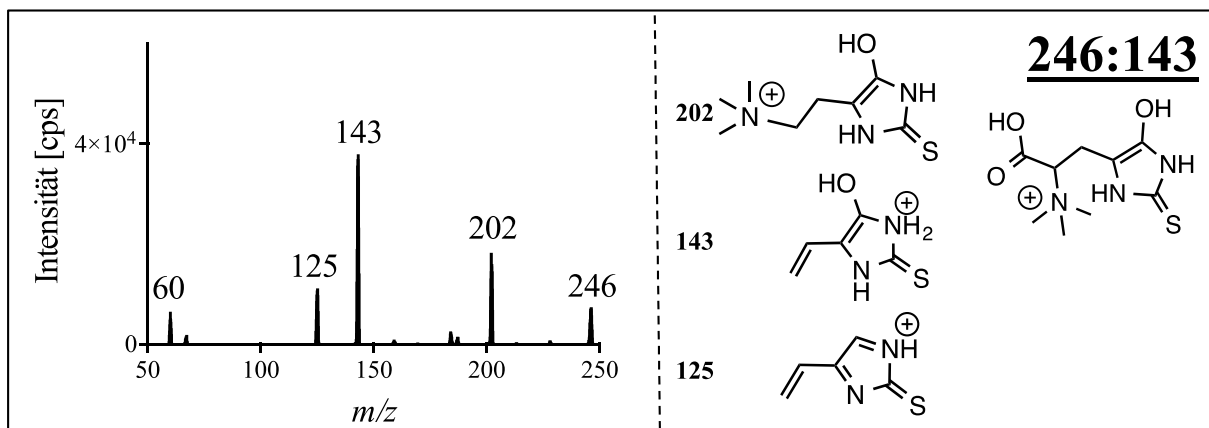


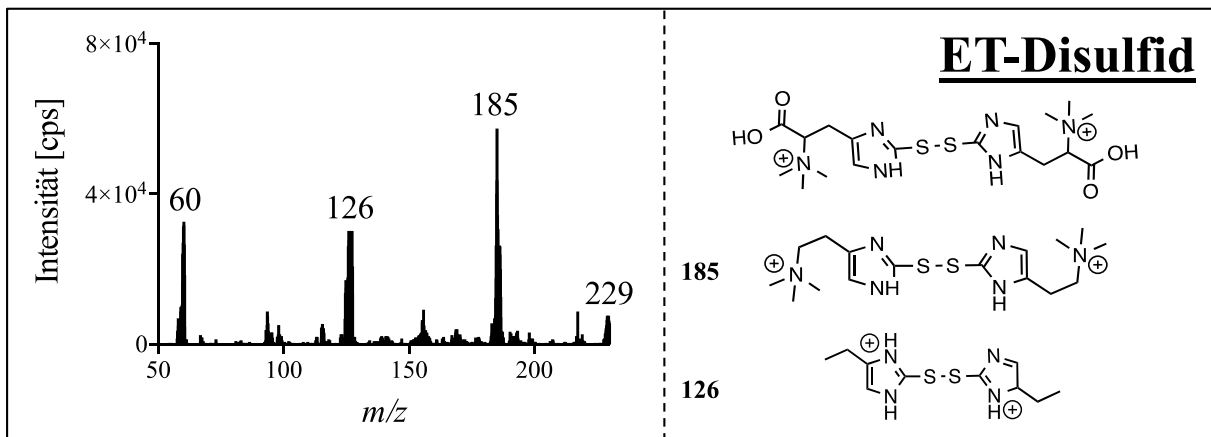
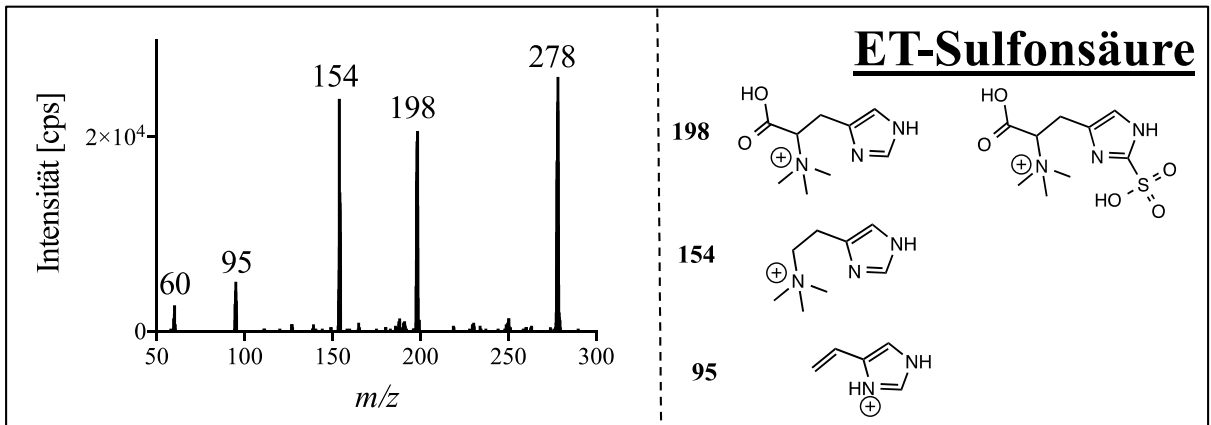
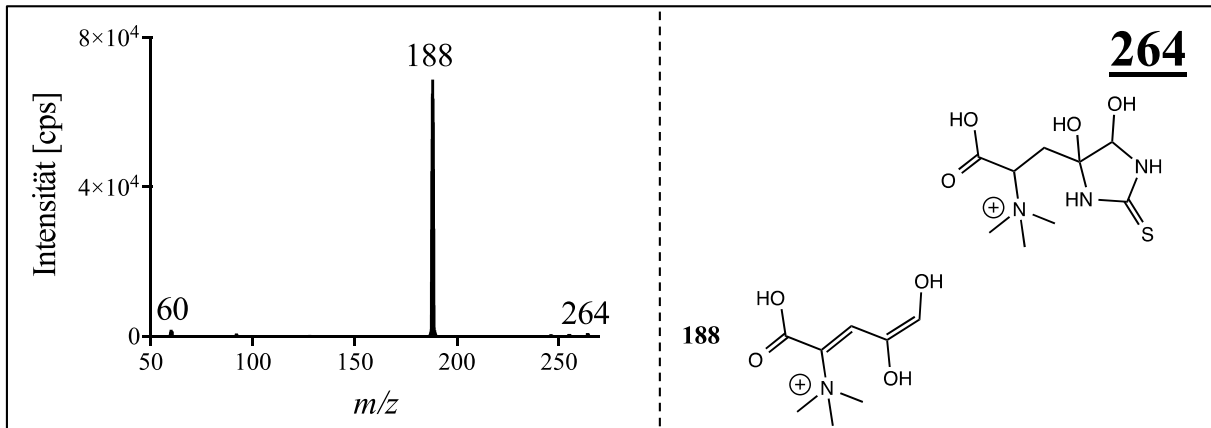
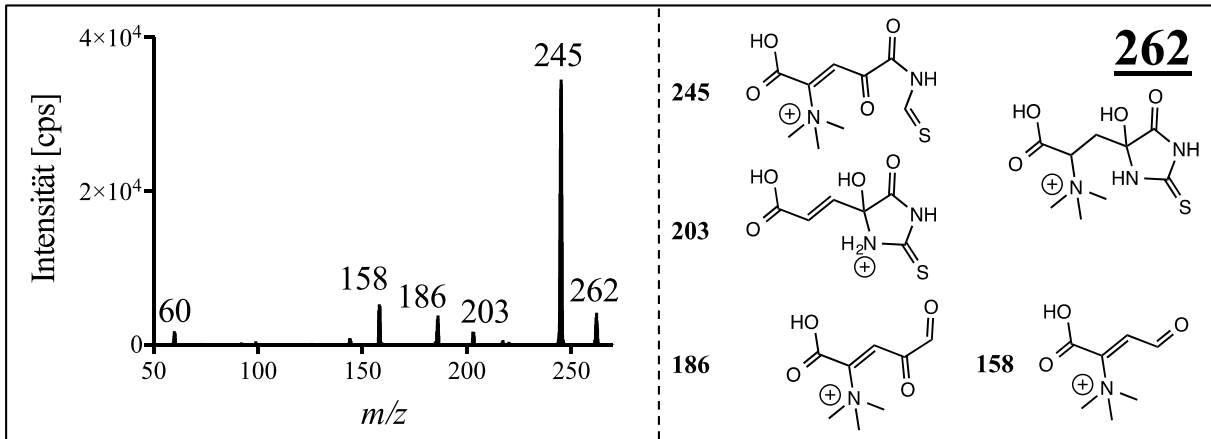
Abbildung 43: Fragmentmuster mit Strukturklärungen von ET und dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene ET-Fragmentmuster und rechts, unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des Mutterions mit den zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

3.8.3.1 Fragmentierungen der Ergothioneinprodukte

Mit den im Fullscan identifizierten ET-Produkten m/z 246:143, 262, 264, ET-Sulfonsäure (m/z 278), ET-Disulfid (m/z 229) und m/z 493 wurde wie mit ET verfahren (Abbildung 44). Die Anordnung wurde aufgrund der postulierten chemischen Struktur gewählt, wobei m/z 246:143, 262 und 264 möglicherweise Reaktionen von 1O_2 mit ET am Imidazolring und m/z 278, 229 und 493 Reaktionen am Schwefel von ET darstellen könnten.



Ergebnisse



Ergebnisse

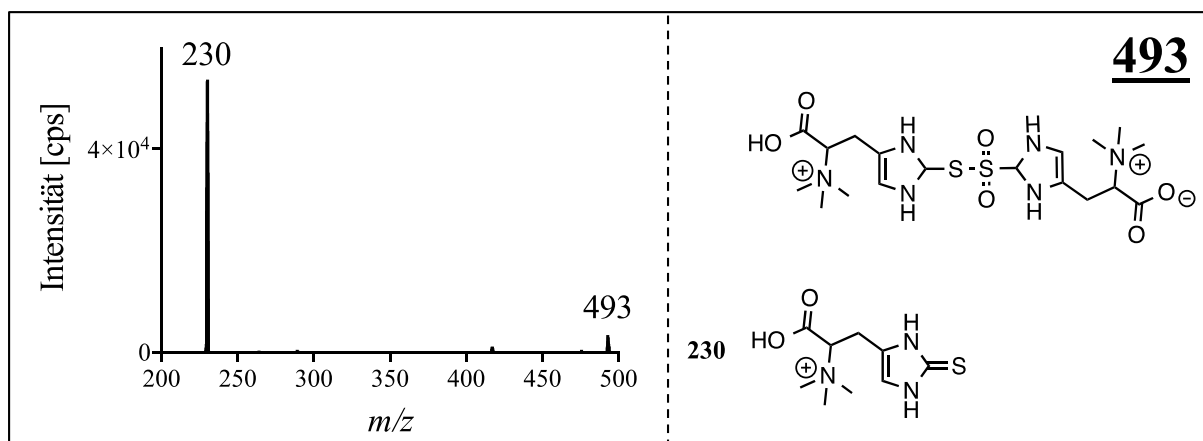


Abbildung 44: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von m/z 246:143, 262, 264, ET-Sulfonsäure (m/z 278), ET-Disulfid (m/z 229) und m/z 493 sowie dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster der einzelnen Mutterionen und rechts, unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des postulierten Mutterions mit den möglichen zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

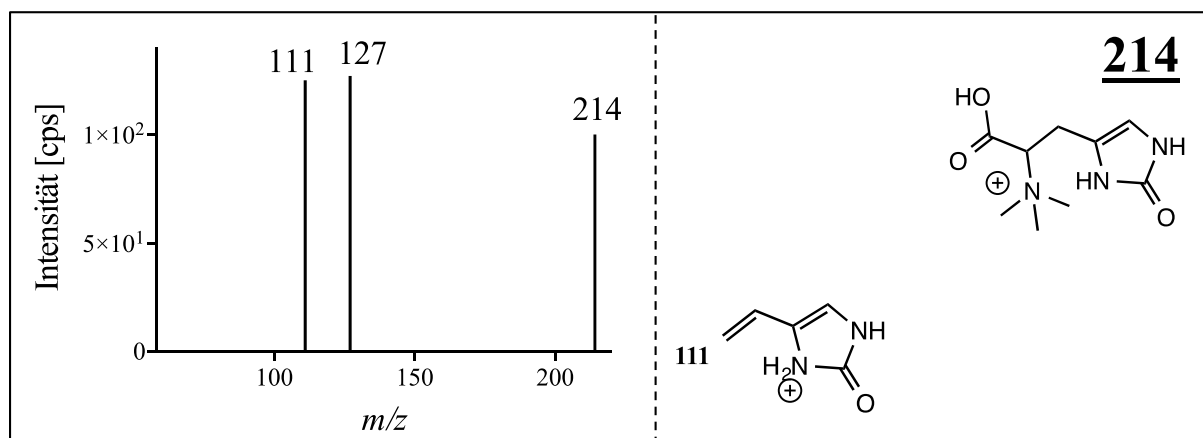
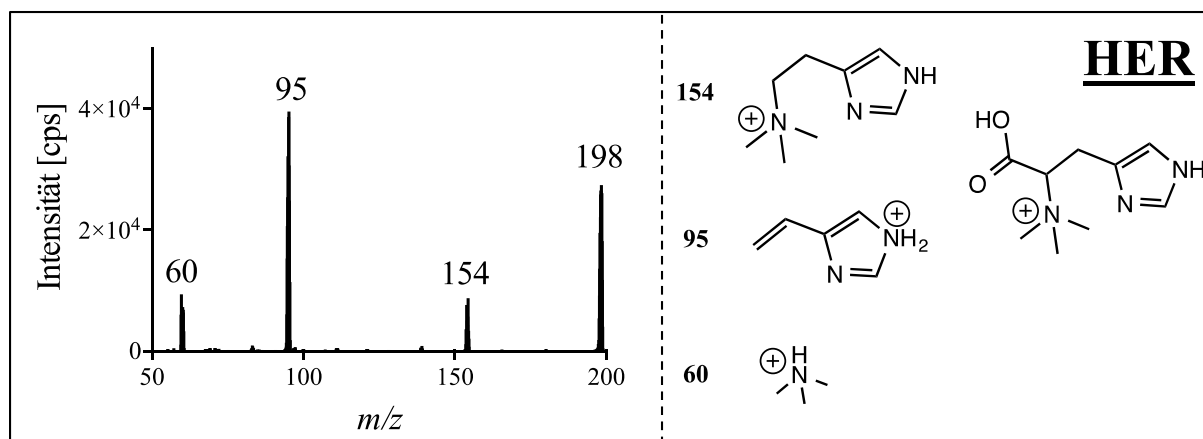
Nach Zuordnung der Fragmente könnte m/z 246:143 ET mit Hydroxygruppe an Position 5 des Imidazolrings, m/z 262 ET mit einer Hydroxygruppe an Position 4 und einer Carbonylgruppe an Position 5 und m/z 264 ET mit zwei Hydroxylgruppe an Position 4 und 5 sein. Dabei wurden alle Fragmentierungen den möglichen ET-Produkten plausibel zugeordnet. Auffällig war ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Abgang von CO_2 aus dem Mutterion bei aromatischen Ringverbindungen am Imidazolring, wie bei m/z 246:143, und dem Verbleib von CO_2 bei nicht aromatischen Verbindungen, wie den Molekülen m/z 262 und 264.

Anhand des Fragmentmusters konnte m/z 278 als ET-Sulfonsäure mit drei Sauerstoffen am Schwefel bestimmt werden. m/z 229 wurde als ET-Disulfid identifiziert, welches doppelt geladen ist und daher diese erniedrigte m/z aufweist. Die beiden ET-Produkte, m/z 278 und 229, konnten nicht nur durch Fragmentmusteranalysen dem möglichen Mutterion zugeordnet werden, sondern wurden auch durch Abgleich mit Literaturspektren bestätigt [33]. Bei der m/z 493 handelte es sich möglicherweise um das oxidierte ET-Disulfid mit zwei Sauerstoffen am Schwefel des ETs, wobei das einzige entstandene Fragment durch die akkurate Masse bestätigt wurde.

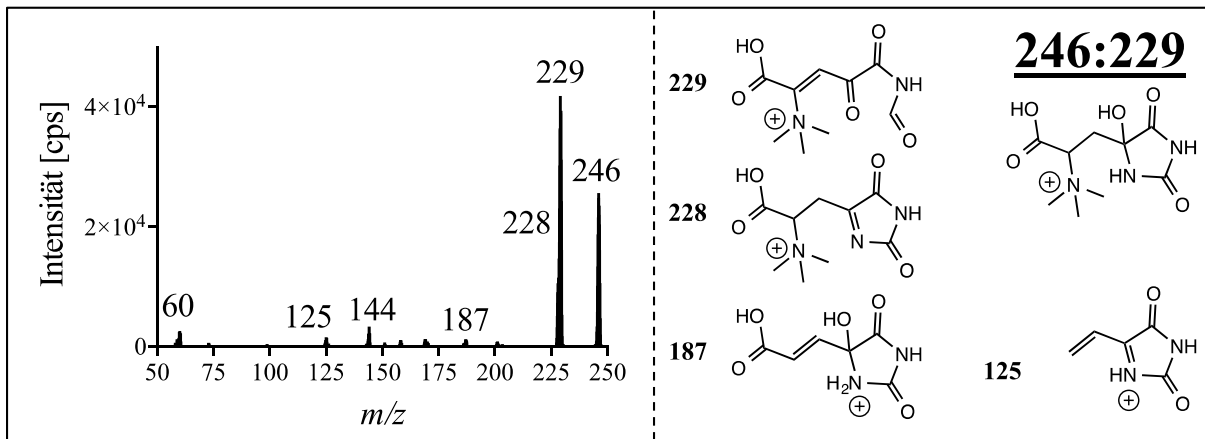
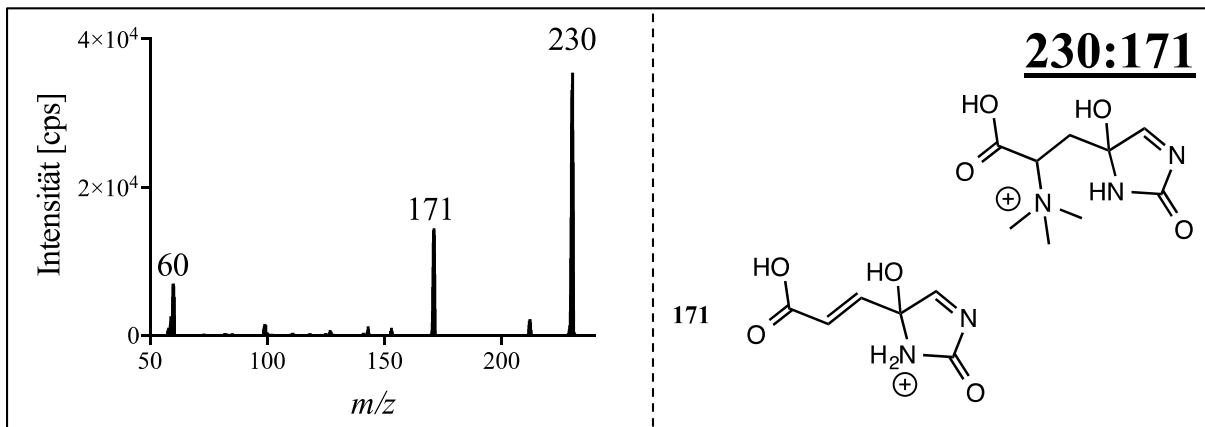
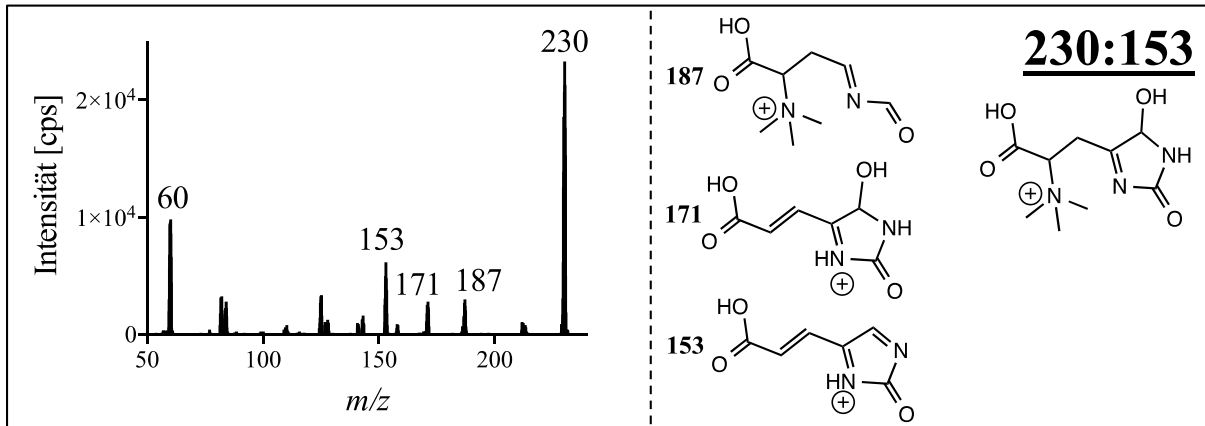
3.8.3.2 Fragmentierungen der Hercyninprodukte

Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET entstand HER (m/z 198; Abbildung 42). Das Fragmentmuster von HER (m/z 198) zeigte die gleichen Abgangsgruppen wie ET und wurde mit der Literatur abgeglichen (Abbildung 45) [33]. Weiterhin zeigte sich im Differenzabtönungsbild ein rotes Signal bei m/z 220, welches das HER-Natriumecho darstellte. Hierbei handelt es sich um eine Na^+ - statt einer H^+ -Anlagerung an das Mutterion während der MS-Ionisierung. Daher kommt es bei den entstandenen Natriumechos zu einer m/z -Erhöhung von +22 u bei der gleichen Retentionszeit. Die nicht dargestellte m/z 199 war ein HER-Isotop (Abbildung 42). Dies wurde aufgrund der gleichen Retentionszeit und der akkuraten Masse bestätigt.

HER reagierte zusätzlich mit $^1\text{O}_2$ und neue $^1\text{O}_2$ + HER-Produkte wurden gebildet. Dabei wurden weitere fünf HER-Produkte entdeckt: m/z 214, 230:171, 230:153, 246:229 und 248 (Abbildung 45).



Ergebnisse



Ergebnisse

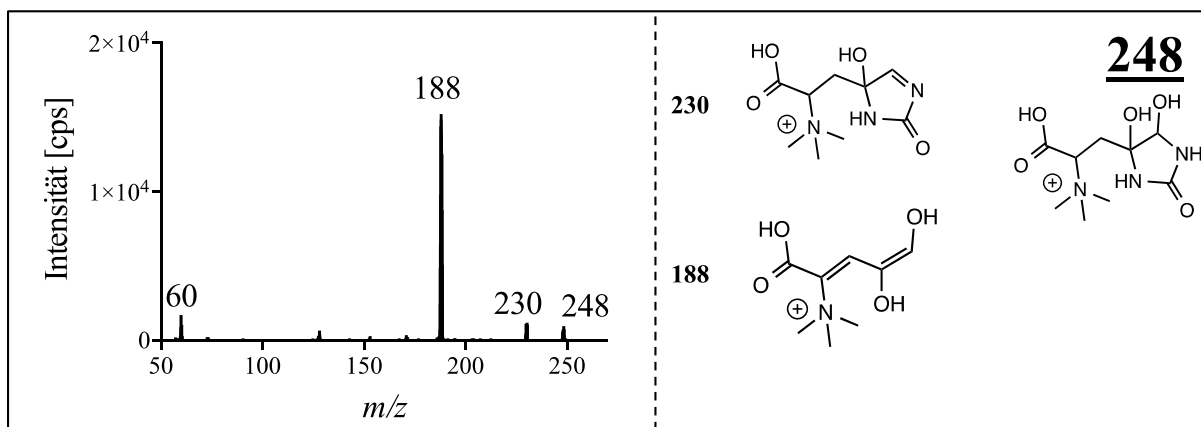


Abbildung 45: Fragmentmuster mit Strukturerläuterungen von HER, m/z 214, 230:153, 230:171, 246:229 und 248 sowie dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster der einzelnen Mutterionen und rechts, unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des postulierten Mutterions mit den möglichen zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

m/z 214 wurde erst nach Analyse der akkuraten Masse einer möglicher Struktur zugeordnet (siehe 2.11.8). Hierbei handelt es sich vermutlich um HER mit einer Carbonylgruppe an Position 2 des Imidazolrings (Abbildung 45). Die Schwierigkeit bei m/z 214 war die Überlagerung von anderen Stoffen im Differenzabtönungsbild (Abbildung 42). Die m/z 214-Spur ist im Bild weiß (Intensität in Kontroll- und Effektprobe zu groß zum Detektieren) und überdeckt das rote Signal. Erst anhand der gezielten Quantifizierung der akkuraten Masse wurde die Summenformel von m/z 214 und die zugehörigen Fragmente bestimmt. Dabei entstanden zwei Fragmente bei m/z 111 und 127. Jedoch wurde nur m/z 111 einer möglichen Struktur zugeordnet, wobei CO_2 und die Trimethylamingruppe das Mutterion verlässt. Dem Fragment m/z 127 konnte keine Struktur zugewiesen werden. Folgeanalysen hatten gezeigt, dass es sich bei dem m/z 127-Fragment um kein dem m/z 214-Mutterion zugehöriges Fragment handelte, da es bei diesem Fragmentübergang in SRM-Analysen nicht zu einer Änderung der Intensität über die Zeit kam (Daten nicht gezeigt).

Bei der m/z 230-Fragmentierung konnten chromatographisch zwei Peaks unterschieden werden, zum einen mit einer Retentionszeit von 6,1 Minuten und zum anderen mit einer Retentionszeit von 7,2 Minuten. Beim Analysieren der Fragmentmuster wurden Konstitutionsisomere postuliert (Abbildung 45). Die vermuteten Strukturen zu m/z 230 sind HER mit zwei gebundenen Sauerstoffen, eine Carbonylgruppe an Position 2 und eine Hydroxygruppe entweder an Position 4 (Fragment: m/z 171, Retentionszeit: 6,1 min) oder Position 5 des Imidazolrings (Fragment m/z 153, Retentionszeit: 7,2 min). Die akkurate Masse

der beiden Peaks war identisch und stimmte mit der exakten Masse überein, wodurch die Hypothese der Konstitutionsisomere bestätigt wurde. Das Konstitutionsisomer m/z 230:171 wurde erst nach den SRM-Analysen gefunden, weshalb m/z 230:171 in diesen Zeitverlaufsexperimenten nicht gemessen wurde.

Das im Differenzabtönungsbild detektierte rote Signal m/z 246 wurde bei zwei unterschiedlichen Retentionszeiten mit unterschiedlichen akkuraten Massen nachgewiesen (Vergleiche m/z 246:143, Tabelle 23). Hier wurde nun die m/z 246:229 (Hauptfragment: m/z 229) mit einer Retentionszeit von 6,2 Minuten vorgestellt (Abbildung 45). Bei m/z 246:229 handelte es sich wahrscheinlich um HER mit zwei Carbonylgruppen an Position 2 und 5 sowie einer Hydroxygruppe an Position 4 des Imidazolrings. Die Fragmente konnten dem Mutterion zugeordnet werden.

Die Analyse des Fragmentmusters ergab, dass es sich bei m/z 248 wahrscheinlich um HER mit einer Carbonylgruppe an Position 2 und zwei Hydroxygruppen an Position 4 und 5 des Imidazolrings handelte (Abbildung 45). Alle entstanden Fragmente konnten zugeordnet werden. Zusätzlich wurde in dem Differenzabtönungsbild das Natriumecho bei m/z 270 mit der gleichen Retentionszeit wie bei m/z 248 gefunden. Die für m/z 270 gemessene akkurate Masse war identisch mit der Summenformel von m/z 248 mit Na^+ und konnte somit unterstützend zur m/z 248-Beschreibung herangezogen werden.

3.8.3.3 Fragmentierung der m/z 288 und 77

Bei den gefundenen roten Signalen im Differenzabtönungsbild m/z 288 und 77 handelte es sich um spezielle Moleküle, da diese nicht direkt auf eine Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER zurückzuführen waren. Dabei konnte m/z 288 über die akkurate Masse einer möglichen Molekülstruktur zugeordnet werden. Hier handelte es sich wahrscheinlich um HER mit einer Carbonylgruppe an Position 2 und mit Schwefel gebundenen Thioharnstoff an Position 5 des Imidazolrings (Abbildung 46). Die entstandenen Fragmente konnten der möglichen m/z 288-Struktur zugeordnet werden. In einem Reaktionsansatz mit HER, DHPNO_2 und Thioharnstoff wurde in einem Differenzabtönungsbild ausschließlich hohe m/z 288-Intensitäten beobachtet (Tabelle 23). Dies belegte die postulierte chemische Zusammensetzung des Moleküls. Es wurden keine mit m/z 288 vergleichbare Molekülzusammensetzungen in den Reaktionsansätzen mit $\text{ET} + \text{DHPNO}_2 + \text{Thioharnstoff}$,

Ergebnisse

ET + DHPNO₂ + Harnstoff oder HER + DHPNO₂ + Harnstoff entdeckt. Dem Schwefel von Thioharnstoff kam eine entscheidende Funktion zu.

Da m/z 288 eindeutig ein HER-Reaktionsprodukt mit ¹O₂ und Thioharnstoff darstellte, wurde vermutet, dass Thioharnstoff in den Reaktionsansätzen mit ET und DHPNO₂ gebildet wurde. Dieser konnte bei m/z 77 detektiert werden (Abbildung 46). Die Fragmentierung zeigte ein Fragment mit m/z 60, das mit Eintragungen in den bekannten Datenbanken übereinstimmte (siehe 2.11.5).

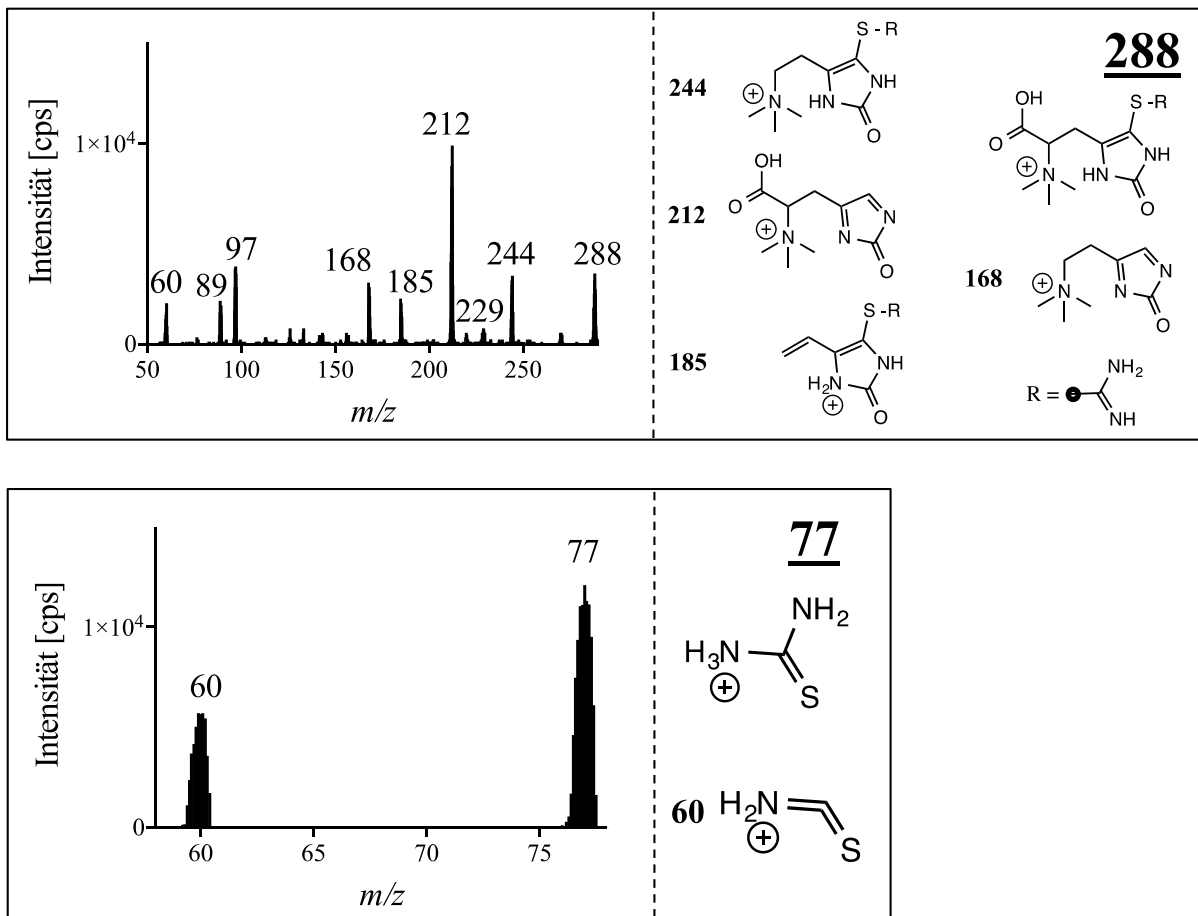


Abbildung 46: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von m/z 288 und 77 sowie dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster der einzelnen Mutterionen und rechts, unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des postulierten Mutterions mit den möglichen zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

3.8.4 Ergothionein- und Hercyninprodukte in Abhängigkeit von $^1\text{O}_2$

Nachdem die Fragmentmuster möglichen ET- und HER-Produkten zugeordnet werden konnten, wurden die Fragmente mit der höchsten Intensität in eine SRM-Methode übertragen und mittels LC-MS/MS genauer analysiert (siehe 2.11.6). Bei einer SRM-Methode gelangt das Mutterion in das MS, wird fragmentiert und anschließend nur das spezifische Fragment des Mutterions detektiert. Dadurch ist eine eindeutige Zugehörigkeit zum Mutterion gewährleistet. Mit dieser Methode wurde nun der Beweis für die ET- bzw. HER-Produktzugehörigkeit der einzelnen Moleküle erbracht. Durch die Verwendung von unterschiedlichen DHPNO₂-Konzentrationen war es möglich, eine $^1\text{O}_2$ -Konzentrationsabhängigkeit der identifizierten Produkte zu zeigen. Können beim Einsatz von höheren DHPNO₂-Konzentrationen größere Produktintensitäten via SRM nachgewiesen werden, handelt es sich um ein spezifisches ET- oder HER-Produkt aus der Reaktion mit $^1\text{O}_2$.

Für das Experiment mit unterschiedlichen DHPNO₂-Konzentrationen wurden Ansätze mit 1 bzw. 10 mM DHPNO₂ in 100 μM ET und 5 mM TRIS über die Zeit inkubiert. Um den physiologischen pH von 7,4 stabil zu halten, wurden 5 mM TRIS verwendet. Die Ergebnisse zeigten eine DHPNO₂-Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen ET- oder HER-Produkte und können auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER zurückgeführt werden (Abbildung 47). Eine im Vergleich zu 1 mM DHPNO₂ geringere ET-Intensität wurde im Reaktionsansatz mit 10 mM DHPNO₂ gemessen. Dies wies auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET hin. Die HER-Produkte aus der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET wurden meist nach 9 Minuten gebildet, welches eine vorherige HER-Bildung voraussetzte. Aus diesem Grund kam es wahrscheinlich zu einer verspäteten HER-Produktbildung (Abbildung 47; unterstrichene Molekülbezeichnung).

Im Differenzabtönungsbild erschien das Signal des ET-Disulfids türkis (Abbildung 42). Der Zeitverlauf des ET-Disulfid war bei einem Reaktionsansatz mit 10 mM DHPNO₂ biphasisch (Abbildung 47). Hierbei war die Initialintensität höher als beim Reaktionsende, weshalb das Signal im Differenzabtönungsbild türkis war.

Eine weitere Besonderheit zeigte sich im Kurvenverlauf von m/z 246:143 (Abbildung 47). Hierbei war eine deutliche DHPNO₂-Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Die Initialintensität beim Einsatz von 10 mM DHPNO₂ war jedoch höher als bei 81 Minuten. Möglicherweise wurde m/z 246:143 schnell gebildet und reagierte daraufhin weiter, sodass es zu einem Intensitätsverlust über die Zeit kam.

Ergebnisse

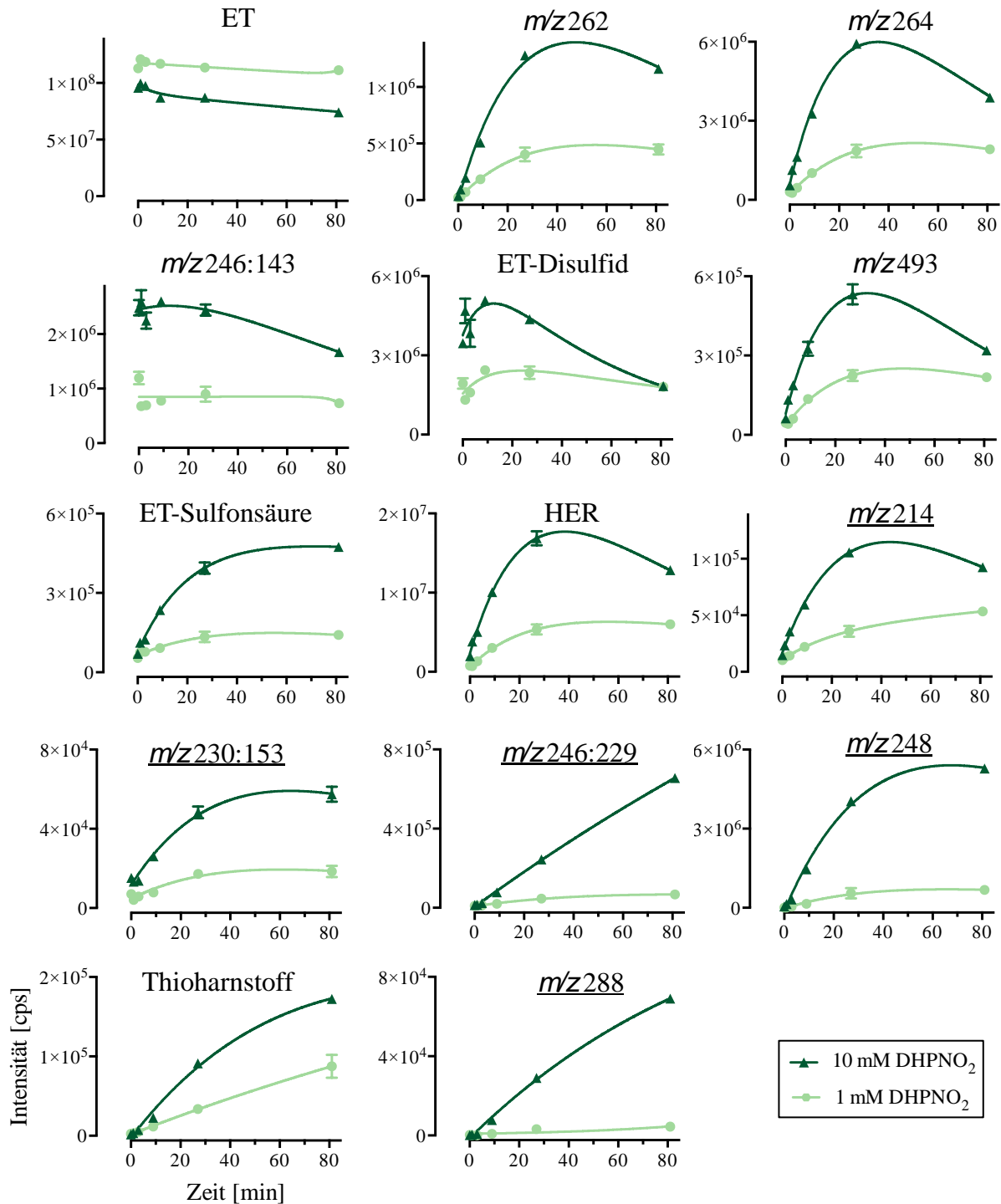
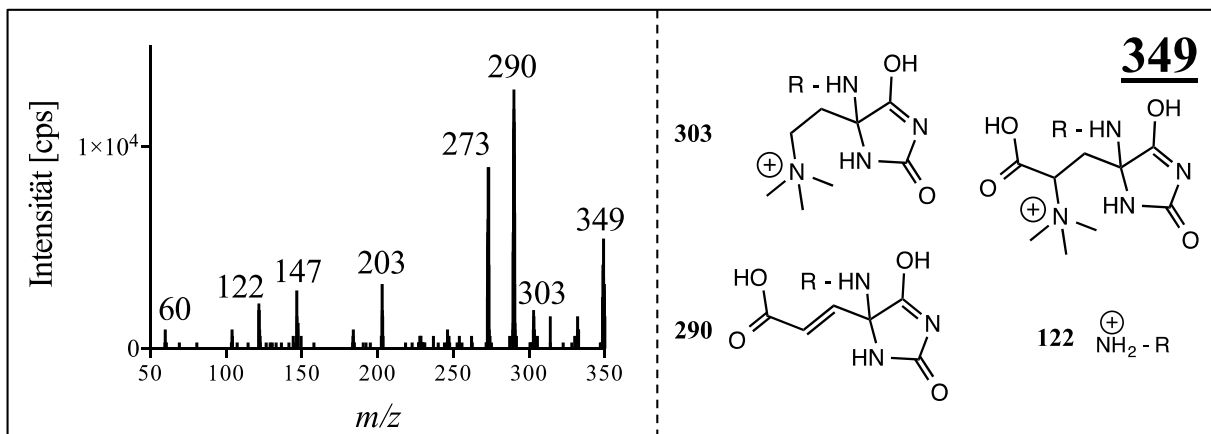
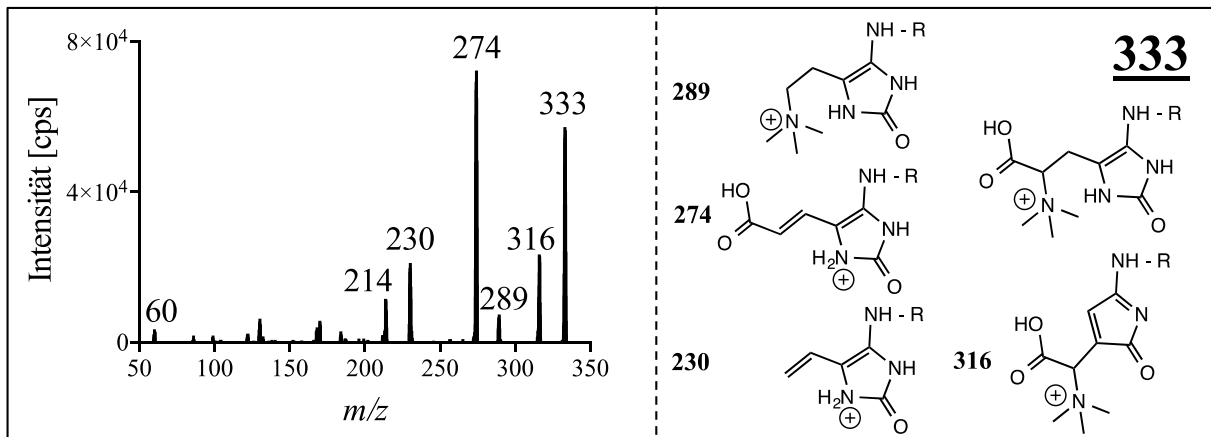
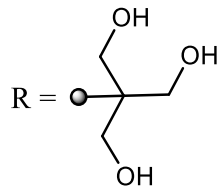


Abbildung 47: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit ET und unterschiedlichen DHPNO₂-Konzentrationen in 5 mM TRIS. Die Intensitäten der ET, ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, Thioharnstoff, *m/z* 246:143, 262, 264, HER, *m/z* 214, 230:153, 246:229, 248 und 288 wurde mittels SRM-Analyse mit dem spezifischen Fragmentübergang des Mutterions aus Tabelle 23 bestimmt. Eingesetzt wurden 100 µM ET und für die Freisetzung von ¹O₂ wurden 1 oder 10 mM DHPNO₂ in 5 mM TRIS verwendet. Die Ansätze wurden für 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gelagert. Anschließend wurden diese mittels LC-MS/MS gemessen. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n=3, Mittelwert ± SEM).

3.8.5 Charakterisierung der Ergothionein- und Hercyninprodukte in TRIS

In den Differenzabtönungsbildern von Fullscananalysen in Reaktionsansätzen mit ET oder HER (100 μ M), DHPNO₂ (10 mM) und TRIS (25 mM, pH 7,4) wurden zusätzliche Produkte identifiziert (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Hierbei wurde nun 25 mM TRIS eingesetzt, um die schwächeren Signale in Differenzabtönungsbildern von Fullscananalysen in Reaktionsansätzen mit 5 mM TRIS zu verstärken, und somit bessere Fragmentierungen gewährleisten zu können. Die in den Bildern zusätzlich detektierten roten Signale wurden wie zuvor fragmentiert, um anhand des Fragmentmusters die zugehörigen Strukturen zu postulieren. Dabei handelte es sich um Folgereaktionen von einigen zuvor beschriebenen Produkten oder Reaktionen von Intermediaten mit der Aminogruppe des Nucleophils TRIS (Abbildung 48).

Bei den folgenden Fragmentierungen der TRIS-Reaktionsprodukte bedeutet R:



Ergebnisse

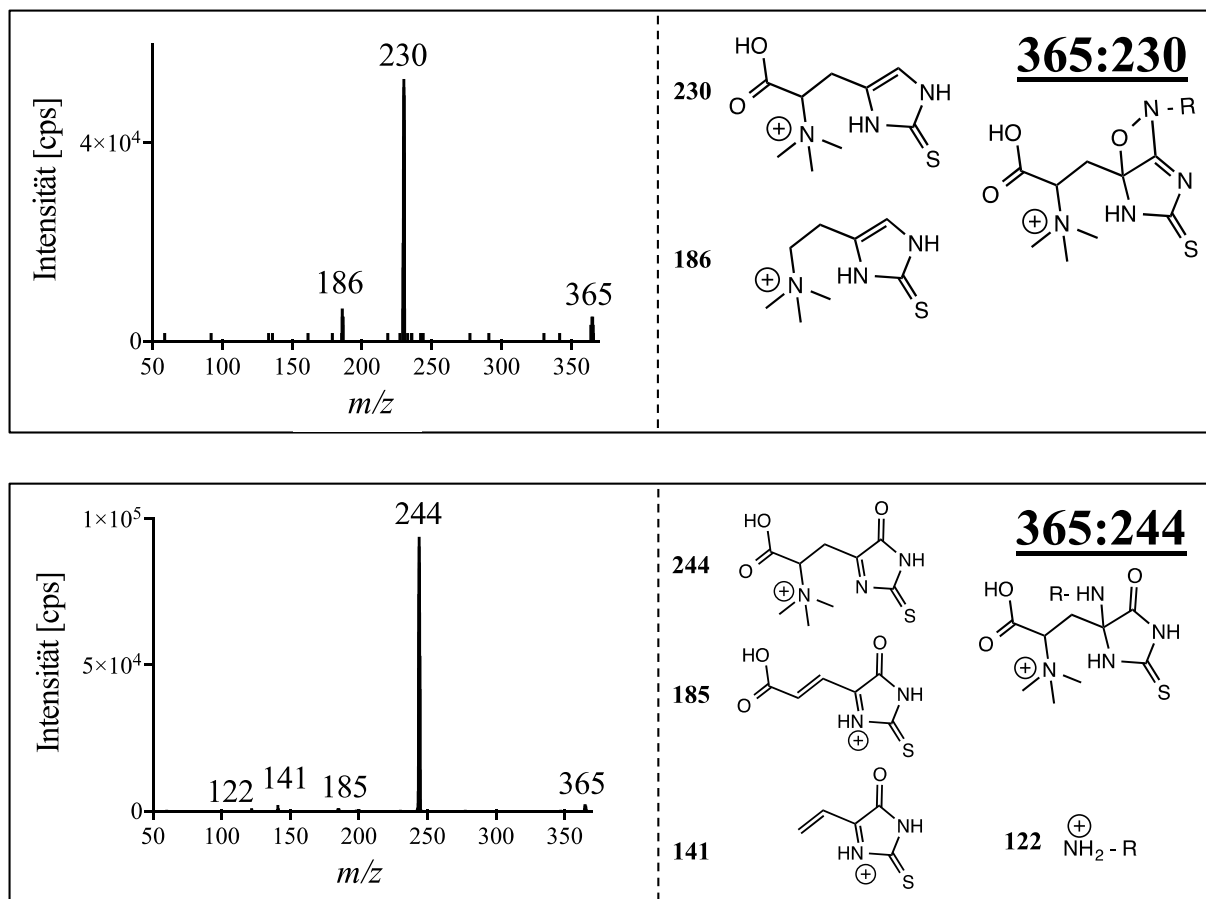


Abbildung 48: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von m/z 333, 349, 365:230 und 365:244 sowie dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster der einzelnen Mutterion und rechts, unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des postulierten Mutterions mit den möglichen zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

m/z 333 wurde als Hauptsignal im Differenzabtönungsbild in Reaktionsansätzen mit DHPNO₂ und HER in 25 mM TRIS identifiziert (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Die m/z 333-Fragmentierung ließ auf die Grundstruktur von m/z 214 (HER + Carbonylgruppe an Position 2 des Imidazolrings; Abbildung 45) mit TRIS an Position 5 des Imidazolrings schließen (Abbildung 48). Viele Fragmente konnten dem Mutterion zugeordnet werden und die akkurate Masse stimmte mit der exakten Masse überein (Tabelle 23).

m/z 349 stellte sich als untergeordnetes Signal in dem Reaktionsansatz von HER und DHPNO₂ in 25 mM TRIS heraus. Die rote Signalstärke im Differenzabtönungsbild sowie die Fullscanintensität war gering (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Die m/z 349-Fragmentierung ließ auf die m/z 230:153-Grundstruktur (HER + Carbonylgruppe an Position 2 und Hydroxygruppe an Position 5 des Imidazolrings; Abbildung 45) mit TRIS an Position 4 des Imidazolrings schließen (Abbildung 48).

Ergebnisse

Bei dem Reaktionsansatz mit ET und DHPNO₂ in 25 mM TRIS wurde per Differenzabtönung das stärkste rote Signal bei m/z 365 gefunden. Bei der Chromatographie konnte ein Doppelpeak beobachtet werden, dessen Grenzen nicht eindeutig trennbar waren (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnten die Peakmaxima anhand der Retentionszeit differenziert werden. Diese lagen bei 6,9 und 7,2 Minuten. Bei genauer Analyse dieser Peaks zeigten sich zwei verschiedene Fragmentierungsmuster (Abbildung 48). m/z 365 (Retentionszeit: 6,9 min) konnte die mögliche Struktur von ET mit Sauerstoff an Position 4 und dem TRIS-Stickstoff an Position 5 des Imidazolrings mit zusätzlicher Bindung des Sauerstoffes an dem Stickstoff zugeordnet werden. Das Fragmentmuster zeigten m/z 230 als intensivitätsstärkstes-Fragment, weswegen dieses Molekül im Folgenden als m/z 365:230 geführt wird. Bestätigt wurde die ET-Struktur des Fragments m/z 230 durch Analysen mit Hilfe einer Ionenfalle (siehe 2.11.7). Diese Ionenfalle ist in der Lage, ein spezifisches Fragment eines Mutterions zu sammeln und zu fragmentieren, wobei in diesem Falle die Tochterionenfragmente m/z 186 und 127 entstanden (Daten nicht gezeigt), welche beim Fragmentieren von ET ebenfalls detektiert wurden (Abbildung 43).

Anhand des m/z 365-Fragmentmusters (Retentionszeit: 7,2 min) wurde die chemische Struktur von ET mit einer Carbonylgruppe an Position 5 und dem Stickstoff von TRIS an Position 4 des Imidazolrings postuliert (m/z 365:244). Hierbei zeigte das Fragment m/z 244 die höchste Intensität, weswegen dieses Molekül als m/z 365:244 bezeichnet wurde. Die Bestimmung der akkuraten Masse ergab für beide Moleküle die gleichen m/z und stimmte mit der exakten Masse überein. Deswegen lag nahe, dass es sich um Konstitutionsisomere handelte.

3.8.5.1 Bildung der Hercyninprodukte in TRIS über die Zeit

Die identifizierten HER-Produkte wurden in Reaktionsansätzen mit HER (100 μM), DHPNO₂ (10 mM) und TRIS (0 und 25 mM) über die Zeit mittels SRM gemessen. Da bei der Reaktion von ¹O₂ mit ET auch HER entstand, wurden zuerst die HER-Produkte in den HER-Reaktionsansätzen über die Zeit vorgestellt, um zu zeigen, dass es sich um spezifische HER-Produkte handelte (Abbildung 49).

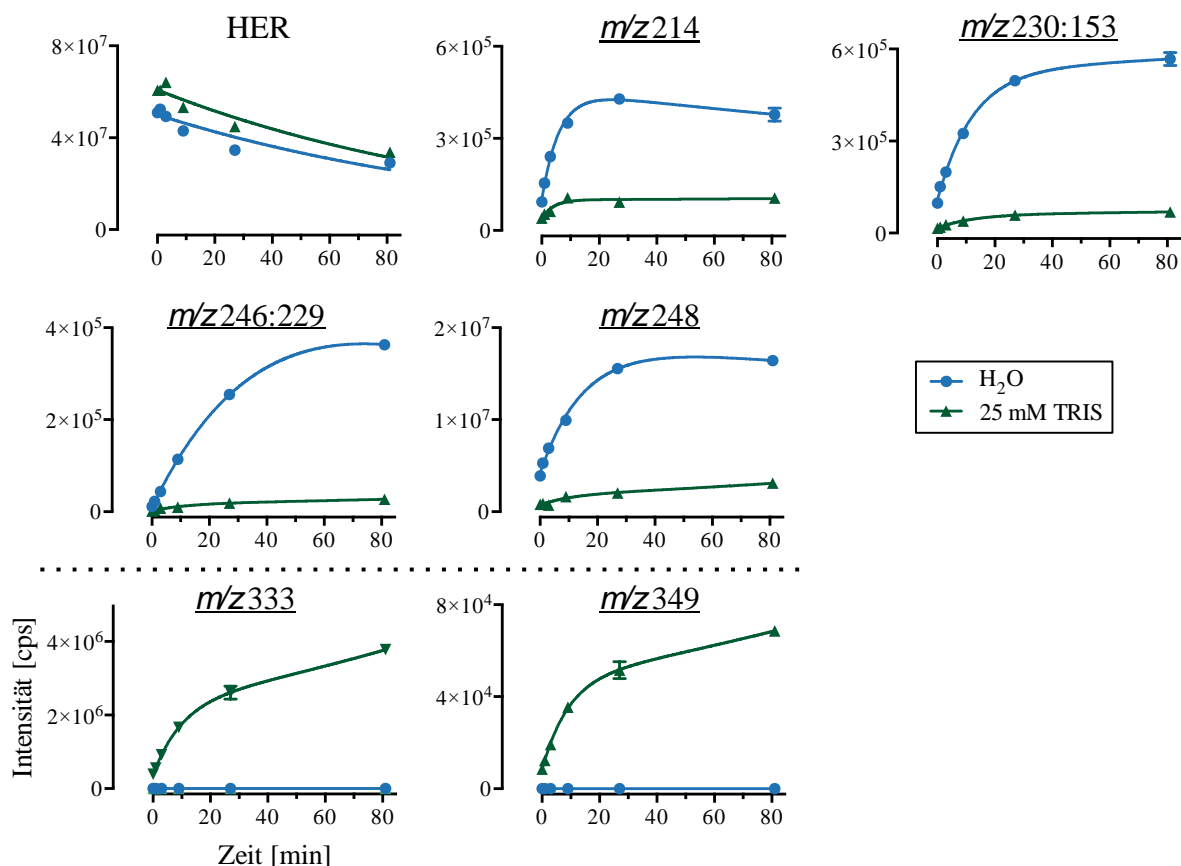


Abbildung 49: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von HER-Produkten in Ansätzen mit ¹O₂ und HER in Abhängigkeit von TRIS. Die Intensitäten von HER, *m/z* 214, 230:153, 246:229, 248, 333 und 349 wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 10 mM DHPNO₂, 100 μM HER und 0 oder 25 mM TRIS eingesetzt. Die Proben wurden für 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C inkubiert bis die Reaktion mit der Lagerung auf Eis abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Ansätze mittels LC-MS/MS gemessen. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Die Ergebnisse zeigten einen Intensitätsverlust von HER über die Zeit, sowohl in H₂O als auch in 25 mM TRIS, welches auf eine Reaktion von ¹O₂ mit HER schließen ließ. In der H₂O-Kontrolle konnte bei allen HER-Produkte *m/z* 214, 230:153, 246:229 und 248 ein Intensitätsanstieg über die Zeit beobachtet werden (Abbildung 49). Dabei kam es zu keiner

verzögerten Bildung der HER-Produkte, wie es im Zeitverlauf von ET mit unterschiedlichen DHPNO₂-Konzentrationen zu beobachten war (Abbildung 47). Daher waren die entstandenen Produkte auf eine Reaktion von ¹O₂ mit HER zurückzuführen. In 25 mM TRIS wurden die HER-Produkte nicht gebildet (Abbildung 49). Wahrscheinlich reagierten Intermediate oder *m/z* 214 und 230:153 mit TRIS zu *m/z* 333 und 349. Daher wurden die möglichen Folgeprodukte von *m/z* 214 und 230:153, welche wahrscheinlich *m/z* 246:229 und 248 waren, ebenfalls nicht mehr gebildet.

Die HER-Produkte *m/z* 333 und 349 konnten in den Reaktionsansätzen ohne TRIS nicht detektiert werden. Es kam zu einem deutlichen Intensitätsanstieg in den Ansätzen mit TRIS. Dies legte nahe, dass es sich bei den beiden Produkten um HER-Produkte mit TRIS-Bindung handelte.

3.8.5.2 Bildung der Ergothioneinprodukte in TRIS über die Zeit

Um zu untersuchen, wie die ET-Produkte in Gegenwart von TRIS reagieren, wurden Zeitverläufe mit ET (100 µM) und DHPNO₂ (10 mM) in TRIS (0, 5 und 25 mM) erstellt (Abbildung 52). HER-Produkte, welche bei den Reaktionsansätzen mit ET entstehen, sind zur deutlicheren Unterscheidung mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. Die Kurvenverläufe in TRIS werden im Folgenden, wenn nicht anders beschrieben, mit den H₂O-Kontrollverläufen verglichen.

Die Analyse des ET-Zeitverlaufs zeigte eine Abnahme der Intensität über die Zeit, welches auf eine Reaktion von ¹O₂ mit ET zurückzuführen war. Bei der Messung des 25 mM TRIS-Reaktionsansatzes war die initiale ET-Intensität geringer als bei den Ansätzen in 5 mM TRIS und H₂O. Dies lag wahrscheinlich an der erhöhten TRIS-Konzentration, welche zu Ionensuppression bei der LC-MS/MS-Messung führte. Ionensuppression bezeichnet die Überlagerung der zu messenden Substanz von anderen Substanzen. Dadurch kann die komplette Intensität der zu messenden Substanz nicht mehr vollständig detektiert werden.

In Gegenwart von TRIS zeigte sich im Reaktionsansatz oft keine konzentrationsabhängige *m/z* 262-Inhibition. Die *m/z* 262-Intensität war in H₂O, 5 mM und 25 mM TRIS über die Zeit ähnlich.

Ergebnisse

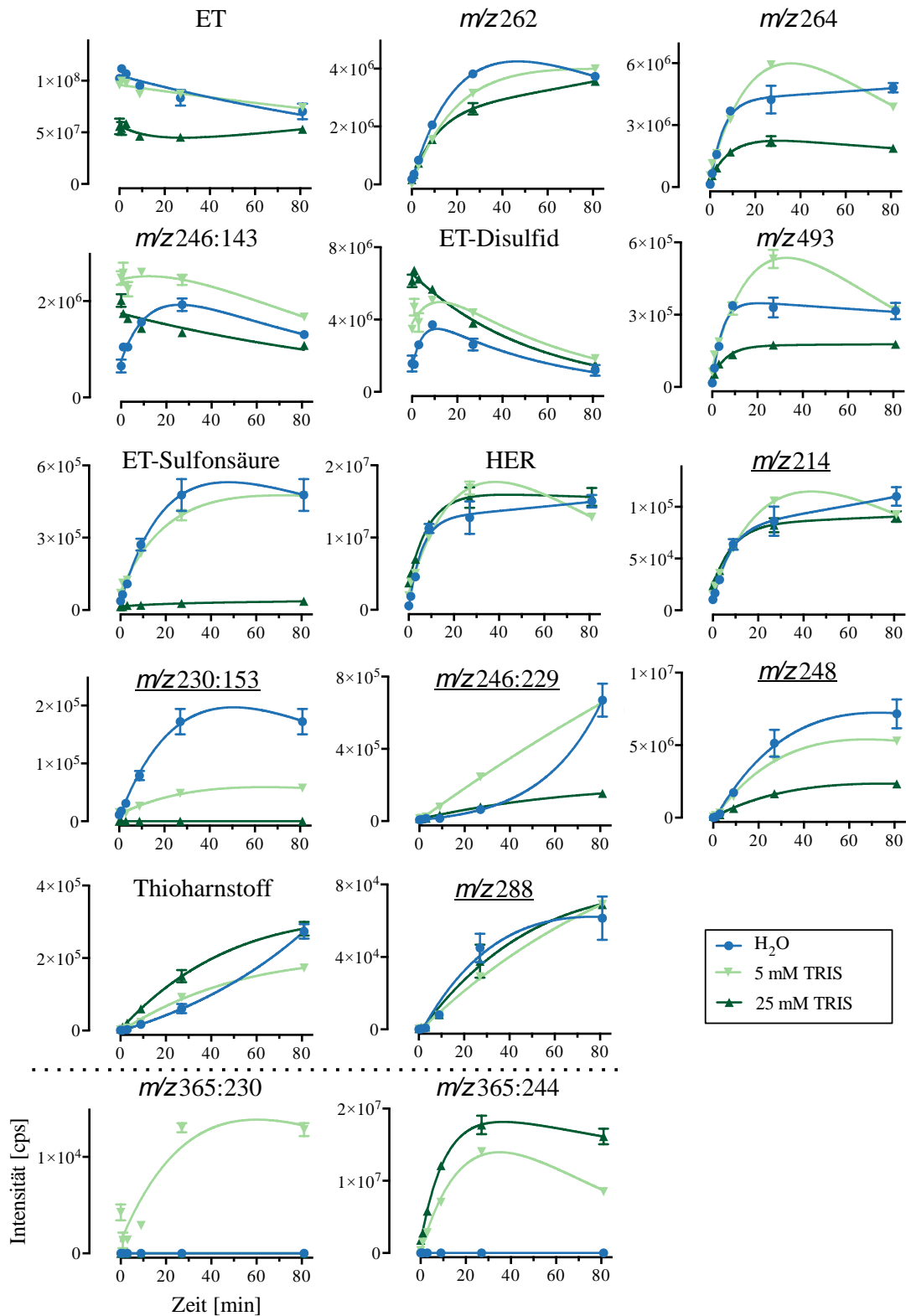


Abbildung 50: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit $^1\text{O}_2$ und ET in Abhängigkeit von TRIS. Die Intensität von ET, ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, Thioharnstoff, m/z 246:143, 262, 264, 365:230, 365:244, 493, HER, m/z 214, 230:153, 246:229, 248 und 288, wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 10 mM DHPNO₂, 100 μM ET und 0, 5 oder 25 mM TRIS eingesetzt. Die Proben inkubierten 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C bis die Reaktion durch die Lagerung auf Eis gestoppt wurde. Anschließend wurden die Ansätze mittels LC-MS/MS gemessen. Mit unterstrichener Molekülbezeichnung sind die HER-Produkte gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Ergebnisse

25 mM TRIS in den Reaktionsansätzen verminderten die m/z 264-Produktion über die Zeit. Mit Ausnahme von Minute 27 war beim Einsatz von 5 mM TRIS im Vergleich zur H_2O -Kontrolle kaum ein Intensitätsunterschied zu beobachten. Die Intensität in 5 mM TRIS war bei 27 Minuten höher als in H_2O .

Das m/z 246:143-Reaktionsprodukt zeigte zum Teil biphasische Kurvenverläufe, wobei die Kurve zunächst anstieg und dann mit fortschreitender Reaktionsdauer abfiel, wie in der H_2O -Kontrolle zu sehen war. Zum Teil zeigten die Kurvenverläufe erhöhte 246:143-Initialintensitäten, welche über die Zeit abfielen, wie bei 5 und 25 mM TRIS. Möglicherweise war m/z 246:143 ein ET-Produkt, welches schnell gebildet wurde und dann weiterreagierte. Dies würde den Kurvenverlauf der H_2O -Kontrolle erklären. Die erhöhte Initialintensität bei 5 und 25 mM TRIS beruhte wahrscheinlich auf der schnellen Anfangsreaktion, wobei durch den Zeitverzug während der Messung aller Proben die Kurve nach Erreichen des Maximums abgebildet war und dann die Folgereaktion zeigte. Beispielsweise zeigte die H_2O -Kurve ein Maximum nach 27 Minuten. Es ist möglich, dass der Reaktionsansatz der 5 mM TRIS-Proben erst nach 6 Stunden gemessen wurde und der Kurvenverlauf nach dem Intensitätsmaximum bei 27 Minuten gezeigt ist.

Die Ergebnisse des Reaktionsansatzes mit TRIS zeigten, dass auch TRIS einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die ET-Disulfidbildung und dessen Zerfall hat, ähnlich wie bei m/z 246:143. Bei höheren TRIS-Konzentrationen kam es zur gesteigerten initialen Produktion des ET-Disulfid, welches möglicherweise auf die Messdurchführung zurückzuführen war.

In Anwesenheit von 25 mM TRIS stieg die m/z 493-Intensität bis zur 27. Minuten an und erreichte ein Plateau. Mit 5 mM TRIS zeigte m/z 493 einen zweiphasigen Verlauf mit einem Intensitätsanstieg bis zur 27. Minute und darauffolgend einem Abfall bis zur 81. Minute, mit der gleichen Endintensität wie in H_2O .

Konzentrationen von 25 mM TRIS inhibierten die Produktion der ET-Sulfonsäure vollständig, wohingegen 5 mM TRIS keinen Einfluss hatte.

Die Zeitverläufe von HER und dem HER-Produkt m/z 214 in einem Reaktionsansatz mit ET und $DHPNO_2$ in verschiedenen TRIS-Konzentrationen zeigten keine Beeinflussung von TRIS bezüglich der Produktbildung.

Ergebnisse

Mit 25 mM TRIS im Reaktionsansatz wurde m/z 230:153 nicht detektiert. Eine Hemmung in Anwesenheit von 5 mM TRIS konnte gezeigt werden.

In TRIS kam es zu einer verzögerten m/z 246:229-Generierung nach 3 Minuten. Der Anstieg in 25 mM TRIS war minimal, wobei in 5 mM TRIS ein linearer Intensitätsanstieg zu beobachten war. Die m/z 246:229-Intensität in H₂O stieg bis zur 27. Minute leicht an und nach der 81. Minute war die Endintensität von H₂O mit der von 5 mM TRIS vergleichbar.

Mit 25 mM TRIS im Reaktionsansatz wurde m/z 248 nicht detektiert, wobei eine Hemmung in Anwesenheit von 5 mM TRIS gezeigt werden konnte.

Die unterschiedlichen TRIS-Konzentrationen beeinflussten die m/z 288-Produktion im Vergleich zur H₂O-Kontrolle nicht.

Thioharnstoff wurde erst nach 9 Minuten detektiert, danach kam es zu einem stetigen Intensitätsanstieg bei allen TRIS-Konzentrationen. Dabei stieg im Reaktionsansatz mit 25 mM TRIS die Intensität von Thioharnstoff am stärksten an.

Bei den m/z 365-Konstitutionsisomeren handelte es sich um ET-TRIS-Produkte, da diese in H₂O nicht nachgewiesen werden konnten. Das ET-Produkt m/z 365:244 zeigte eine Intensitätssteigerung in 25 mM TRIS über die Zeit verglichen zu dem Ansatz mit 5 mM TRIS. m/z 365:230 wurde in Gegenwart von 25 mM TRIS nicht detektiert. Bei dem gleichen zeitlichen Reaktionsverlauf in 5 mM TRIS, konnte m/z 365:230 jedoch nachgewiesen werden.

Der Grund für den m/z 365:230-Intensitätsverlust bei 25 mM TRIS wurde daraufhin genauer analysiert. Da bei einigen Reaktionsansätzen beobachtet wurde, dass GSH einen Einfluss auf die m/z 365:230-Bildung hatte (Daten nicht gezeigt), wurde dies zusätzlich mit 5 mM oder 25 mM TRIS und 0,1, 1 oder 5 mM GSH untersucht (Abbildung 51, A). Zum Vergleich wurde m/z 365:244 in den gleichen Reaktionsansätzen gemessen. Durch GSH-Addition zu den Reaktionsansätzen mit ET, DHPNO₂ in 25 mM TRIS konnte keine m/z 365:230-Intensität nachgewiesen werden. In 5 mM TRIS wurde m/z 365:230 detektiert. Dabei spielte die GSH-Konzentration keine Rolle, da die Intensität über alle GSH-Konzentrationen gleich blieb.

Für m/z 365:244 war der Kurvenverlauf mit steigender GSH-Konzentration differenzierter (Abbildung 51, B). Hierbei wurde eine geringere m/z 365:244-Intensität mit steigender GSH-Konzentration gemessen. Dabei waren die Intensitäten in 25 mM TRIS gegenüber dem Ansatz mit 5 mM TRIS erhöht. Möglicherweise wurde die Reaktion von ¹O₂ mit ET in TRIS

durch erhöhte TRIS-Konzentration in Richtung des Konstitutionsisomers m/z 365:244 verschoben.

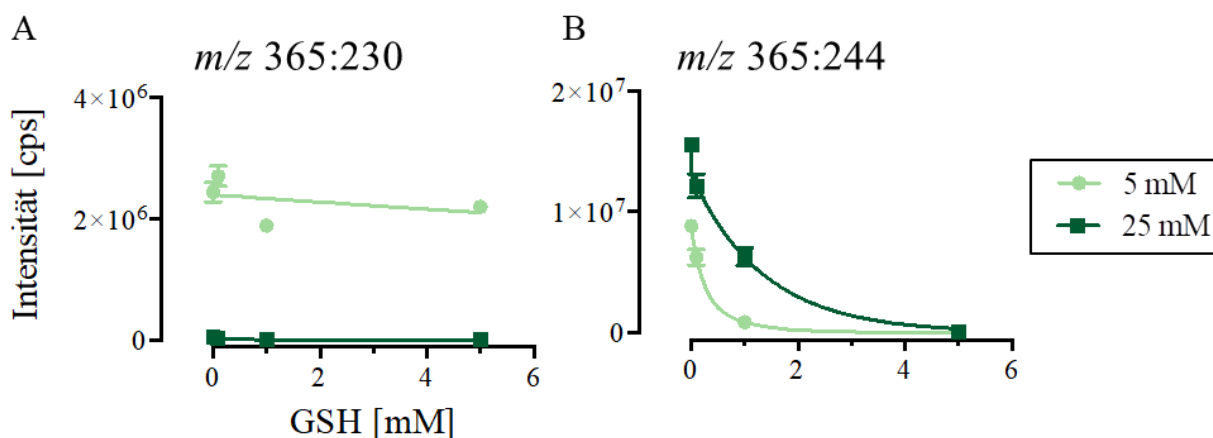


Abbildung 51: Relative m/z 365:244- und 365:230-Intensitäten in Ansätzen mit ET und $^1\text{O}_2$ in Abhängigkeit unterschiedlicher TRIS- oder GSH-Konzentrationen. Die Intensität wurde mittels SRM-Methode mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 100 μM ET und 10mM DHPNO₂ sowie 5 oder 25 mM TRIS mit 0, 0,1, 1 oder 5 mM GSH eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei 37°C. Die Ansätze wurden mittels LC-MS/MS gemessen (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

3.8.6 Charakterisierung der Ergothioneinprodukte in Ascorbinsäure

Aufgrund der Tatsache, dass das Nukleophil TRIS keine physiologische Bedeutung aufweist, wurden die ET-Produkte und deren Generierung in Ansätzen mit ET (100 μM), DHPNO₂ (10 mM) und ASC (0, 0,1, 1 oder 5 mM; pH 7,4) untersucht. ASC dient als wichtiges Reduktionsmittel für Zellen, weshalb es für die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET physiologisch relevant sein könnte. Im Folgenden werden nun die zuvor identifizierten ET- und HER-Produkte unter reduktiven Bedingungen analysiert. Dabei ist zu beachten, dass ASC mit $^1\text{O}_2$ zu H₂O₂ reagiert, welches eine weitere ROS darstellt und bei der ET-Produktbildung über die Zeit Einfluss nehmen kann [54]. Die Kurvenverläufe in ASC werden, wenn nicht anders beschrieben, mit den H₂O-Kontrollverläufen verglichen.

Bei den Reaktionsansätzen mit 0, 0,1 und 1 mM ASC war eine Abnahme von ET zu beobachten (Abbildung 52). Eine Auffälligkeit war bei 5 mM ASC zu erkennen, dort war die ET-Intensität konstant über die Zeit.

Ergebnisse

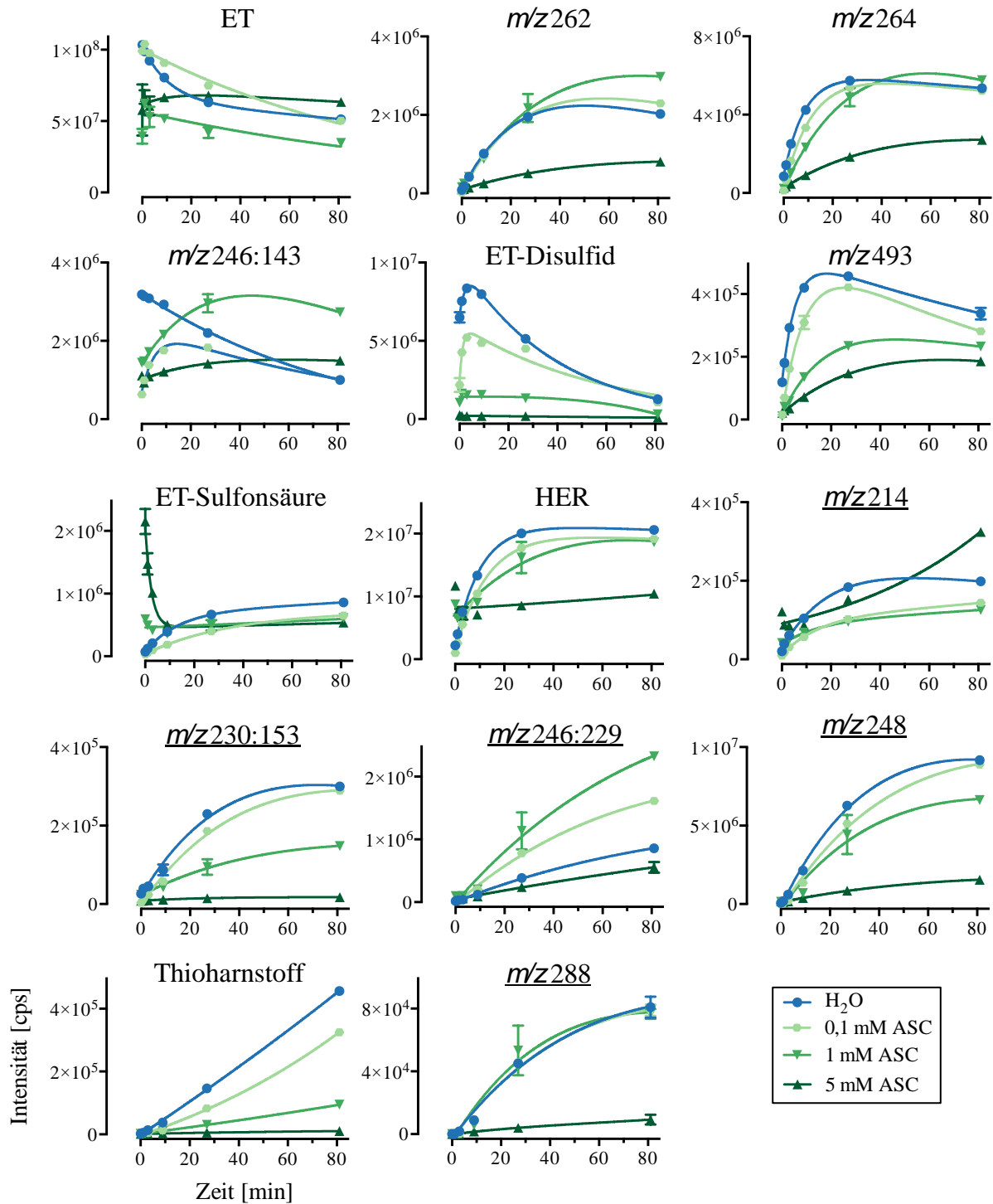


Abbildung 52: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von ET- und HER-Produkten in Ansätzen mit ET und $^1\text{O}_2$ in Abhängigkeit von ASC. Die Intensität von ET, ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, Thioharnstoff, m/z 246:143, 262, 264, 493, HER, m/z 214, 230:153, 246:229, 248 und 288 wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 10 mM DHPNO₂, 100 μM ET und 0, 0,1, 1 oder 5 mM ASC eingesetzt. Die Proben inkubierten 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C bis die Reaktion durch die Lagerung auf Eis gestoppt wurde. Anschließend wurden die Ansätze mittels LC-MS/MS gemessen. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Ergebnisse

Außer beim Einsatz von 5 mM ASC zeigte sich durch dessen Hinzugabe keine verminderte Bildung der ET-Produkte m/z 262 und 264. Insgesamt kam es bei 0,1 und 1 mM ASC zu einem Intensitätsanstieg über die Zeit, ähnlich dem H₂O-Kontrollansatz.

Das m/z 246:143-Reaktionsprodukt zeigte in ASC zum Teil biphasische Kurvenverläufe, wie es auch bei 0,1 und 1 mM ASC zu beobachten war. Die Kurvenverläufe zeigten zum Teil erhöhte m/z 246:143-Initialintensitäten, welche über die Zeit nur abfielen, wie in den Reaktionsansätzen mit H₂O. Dies war bereits bei den TRIS-Zeitverlaufexperimenten zu beobachten, jedoch stieg hier die Intensität in H₂O erst an und fiel daraufhin wieder ab (Abbildung 50). Durch diese unterschiedlichen m/z 246:143-Intensitätsverläufe in H₂O erhärtet sich der Verdacht, dass m/z 246:143 ein ET-Produkt war, welches schnell gebildet wurde und dann weiterreagierte. Der Zeitverzug bei der LC-MS/MS-Messung aller Proben führte zu unterschiedlichen Intensitäten bei den m/z 246:143 Zeitverläufen.

ASC hatte einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Bildung des ET-Disulfids. Mit steigender Konzentration sank die gemessene Intensitäten bei den einzelnen Zeitpunkten. Die Intensität war bei 5 mM ASC komplett inhibiert.

Auch die m/z 493-Kurvenverläufe der Reaktionsansätze mit ASC waren konzentrationsabhängig. Alle Kurven stiegen initial an. Bei den Reaktionsansätzen in H₂O und 0,1 mM ASC kam es zu einem Abfall der Intensität nach 27 Minuten, wohingegen bei erhöhten ASC-Konzentrationen leichte Intensitätssteigerungen bis zur 81. Minute nachgewiesen werden konnten. In den H₂O-Proben wurde am meisten m/z 493 gebildet und mit steigender ASC-Konzentration wurde die Intensität stufenweise weniger.

Die Bildung der ET-Sulfonsäure in 0,1 mM ASC zeigte keinen ASC-Einfluss. Bei 1 mM ASC wurde eine erhöhte Initialintensität gemessen, die während der Reaktion stagnierte. Die Initialintensität bei 5 mM ASC war noch größer als die im Reaktionsansatz mit 1 mM ASC und sank danach bis zur 9. Minute sehr schnell auf das Intensitätslevel der anderen Reaktionsansätze ab. Die Endintensitäten sind bei allen Bedingungen gleich.

Bei der HER-Intensitätsmessung in Reaktionsansätzen mit 1 und 5 mM ASC wurden initial höhere Intensitäten gemessen als in denen mit H₂O und 0,1 mM ASC, wobei der Verlauf in 1 mM ASC dem in H₂O und 0,1 mM ASC entsprach. In 5 mM ASC nahm die HER-Intensität zunächst ab und stagnierte dann über die Zeit bei einem niedrigeren Intensitätslevel als die H₂O-Kontrolle sowie die anderen zwei ASC-Konzentrationen. Die Molekülbezeichnung der

Ergebnisse

HER-Produkte sind in Abbildung 52 unterstrichen, um eine eindeutige Abgrenzung der ET- und HER-Produkte zu gewährleisten.

Das HER-Produkt m/z 214 zeigte bei der Reaktion von ET mit DHPNO₂ in 0, 0,1 und 1 mM ASC zuerst einen initialen Intensitätsanstieg bis zum Erreichen des Plateaus nach 27 Minuten. Eine Auffälligkeit wurde beim Einsatz von 5 mM ASC beobachtet. Initial waren hier erhöhte Intensitäten messbar, welche über die komplette Versuchsdauer weiterhin anstiegen.

Beim Reaktionsansatz mit 5 mM ASC war die m/z 230:153-Generierung unterdrückt. Im Vergleich zur H₂O-Kontrolle und 0,1 mM ASC kam es mit 1 mM ASC zu einem m/z 230:153-Intensitätsabfall.

Bei dem HER-Produkt m/z 246:229 lag eine konzentrationsabhängige Produktion vor, die folgende Reihenfolge aufweist: 1 mM ASC > 0,1 mM ASC > H₂O > 5 mM ASC. In allen Ansätzen kam es zu einer verzögerten Produktion nach 9 Minuten.

Bei der Verwendung von 5 mM ASC war die m/z 248-Generierung unterdrückt. Nach der Hinzugabe von 1 mM ASC kam es im Gegensatz zur H₂O-Kontrolle und 0,1 mM ASC zu einem m/z 248-Intensitätsabfall über die Zeit.

Je höher die ASC-Konzentration, desto weniger Thioharnstoff wurde gebildet bis beim Einsatz von 5 mM ASC kein Thioharnstoff mehr detektiert werden konnte.

Die m/z 288-Bildung war in 5 mM ASC nahezu vollständig inhibiert, jedoch zeigte sich keine Intensitätsinhibition beim Einsatz von 0,1 und 1 mM ASC. Hierbei kommt es nach 9 Minuten zu einem kontinuierlichen Intensitätsanstieg über die Reaktionsdauer.

3.8.7 Charakterisierung der Ergothionein- und Hercyninprodukte in Glutathion

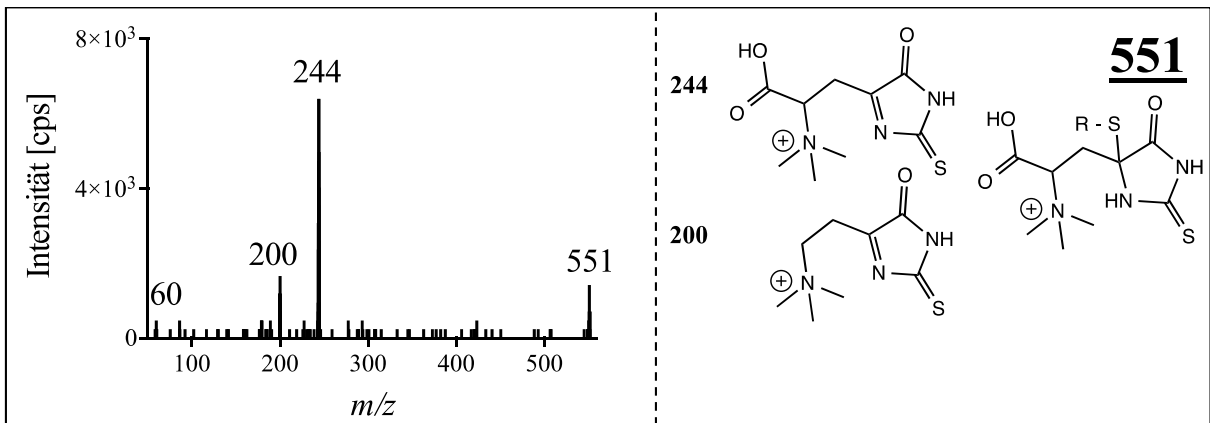
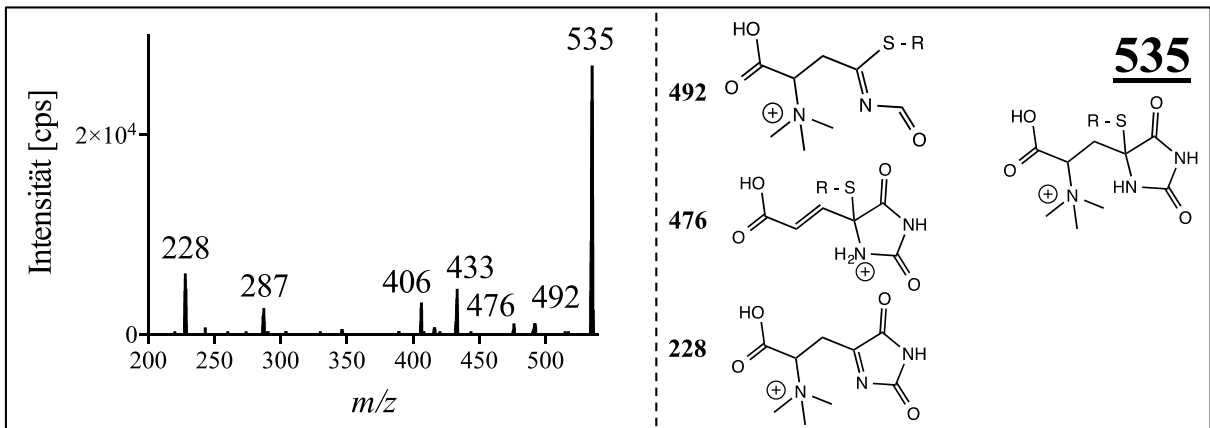
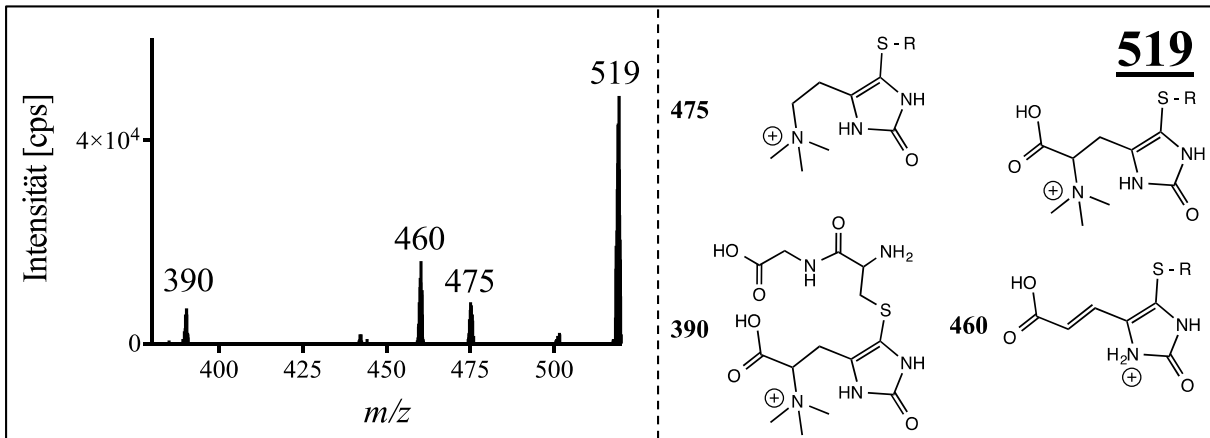
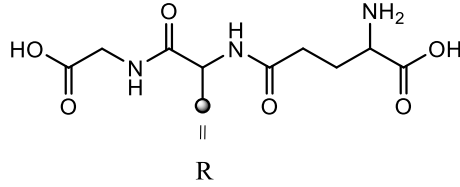
Nachdem nun die Reaktionsprodukte von ¹O₂ mit ET und HER mit dem Nukleophil TRIS oder dem Reduktionsmittel ASC untersucht wurden, folgte eine Analyse in Gegenwart von GSH. GSH ist ein bedeutendes physiologisches Antioxidans mit nukleophilen und reduzierenden Eigenschaften [114].

Die folgenden Moleküle wurden in Differenzabtönungsbildern als rote Signale in Reaktionsansätzen mit ET oder HER (100 µM), DHPNO₂ (10 mM) und GSH (0,1 oder 1 mM) gefunden (Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Anschließend wurden die Signale fragmentiert, um anhand des Fragmentmusters eine mögliche Struktur zuzuordnen

Ergebnisse

(Abbildung 53). Alle Produkte wurden durch die Messung der akkuraten Masse in Bezug zur exakten Masse bestätigt (Tabelle 23).

Bei den folgenden GSH-bezogenen Reaktionen bedeutet R für alle Fragmentierungen:



Ergebnisse

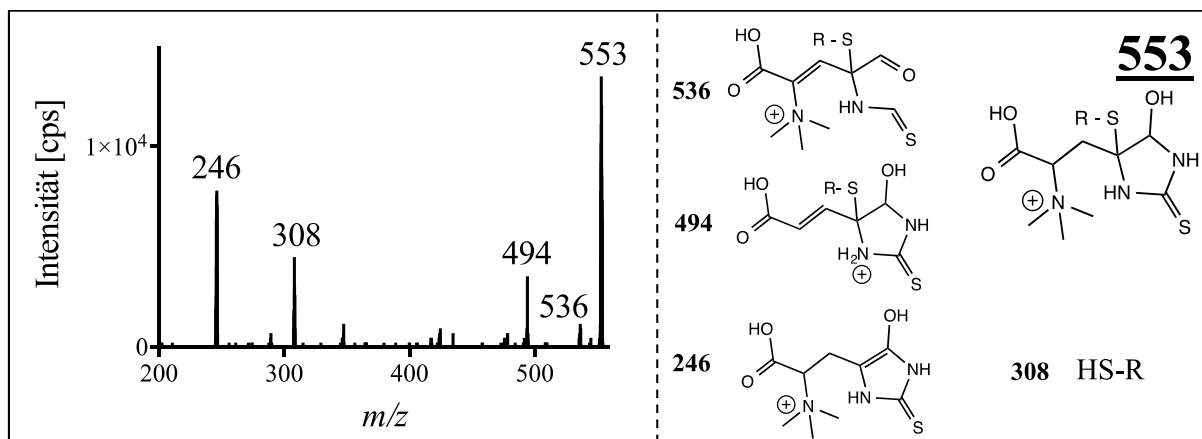


Abbildung 53: Fragmentmuster mit Struktur Erläuterungen von m/z 519, 535, 551 und 553 sowie dessen Fragmenten. Dargestellt ist links das entstandene Fragmentmuster der einzelnen Mutterionen und rechts unter der Molekülbezeichnung die chemische Struktur des postulierten Mutterions mit den möglichen zugehörigen Strukturen der einzelnen Fragmente. Ionisierung: positiv ($M+H^+$), Kollisionsenergie (CE): 25 Volt.

Im Differenzabtönungsbild des Reaktionsansatzes mit DHPNO₂ und HER in 1 mM GSH wurde m/z 519 als Hauptsignal identifiziert. Die anschließende m/z 519-Fragmentierung ließ möglicherweise auf die m/z 214-Grundstruktur (HER + Carbonylgruppe an Position 2 des Imidazolrings; Abbildung 45) mit dem gebundenen Schwefel von GSH an Position 5 schließen (Abbildung 53). Dabei konnten alle Fragmente dem m/z 519-Mutterion zugeordnet werden.

Neben dem Hauptsignal m/z 519 wurde ein weiteres schwächeres rotes Signal bei m/z 535 gefunden (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Die m/z 535-Fragmentierung legte ein Molekül basierend auf der reduzierten m/z 230:153-Grundstruktur (HER + Carbonylgruppe an Position 2 und 5 des Imidazolrings, Abbildung 45) mit dem gebundenen Schwefel von GSH an Position 4 nahe (Abbildung 53).

Bei dem Reaktionsansatz mit ET und DHPNO₂ in 0,1 mM GSH wurde per Differenzabtönung ein rotes Signal bei m/z 551 detektiert (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Bei der Fragmentierung konnten alle entstandenen Fragmente einer Struktur zugeordnet werden (Abbildung 53). Dabei handelte es sich möglicherweise um ET mit einer Carbonylgruppe an Position 5 und mit einfach gebundenem Schwefel des GSH an Position 4 des Imidazolrings.

Bei dem Reaktionsansatz mit ET und DHPNO₂ in 1 mM GSH wurde mittels Differenzabtönungsbild ein rotes Signal bei m/z 553 nachgewiesen (Tabelle 23, Differenzabtönungsbild nicht gezeigt). Aufgrund des m/z 553-Fragmentmusters wurde die

Ergebnisse

Molekülstruktur als ET mit einer Hydroxygruppe an Position 5 und mit einfach gebundenem Schwefel des GSH an Position 4 des Imidazolrings postuliert (Abbildung 53).

3.8.7.1 Bildung der Hercyninprodukte in GSH über die Zeit

Die identifizierten HER-Produkte wurden in Reaktionsansätzen mit HER (100 μM), DHPNO₂ (10 mM) und GSH (0,1, oder 1 mM GSH) über die Zeit mittels SRM gemessen (Abbildung 54). Die Kurvenverläufe in GSH werden im Folgenden, wenn nicht anders beschrieben, mit den H₂O-Kontrollverläufen verglichen.

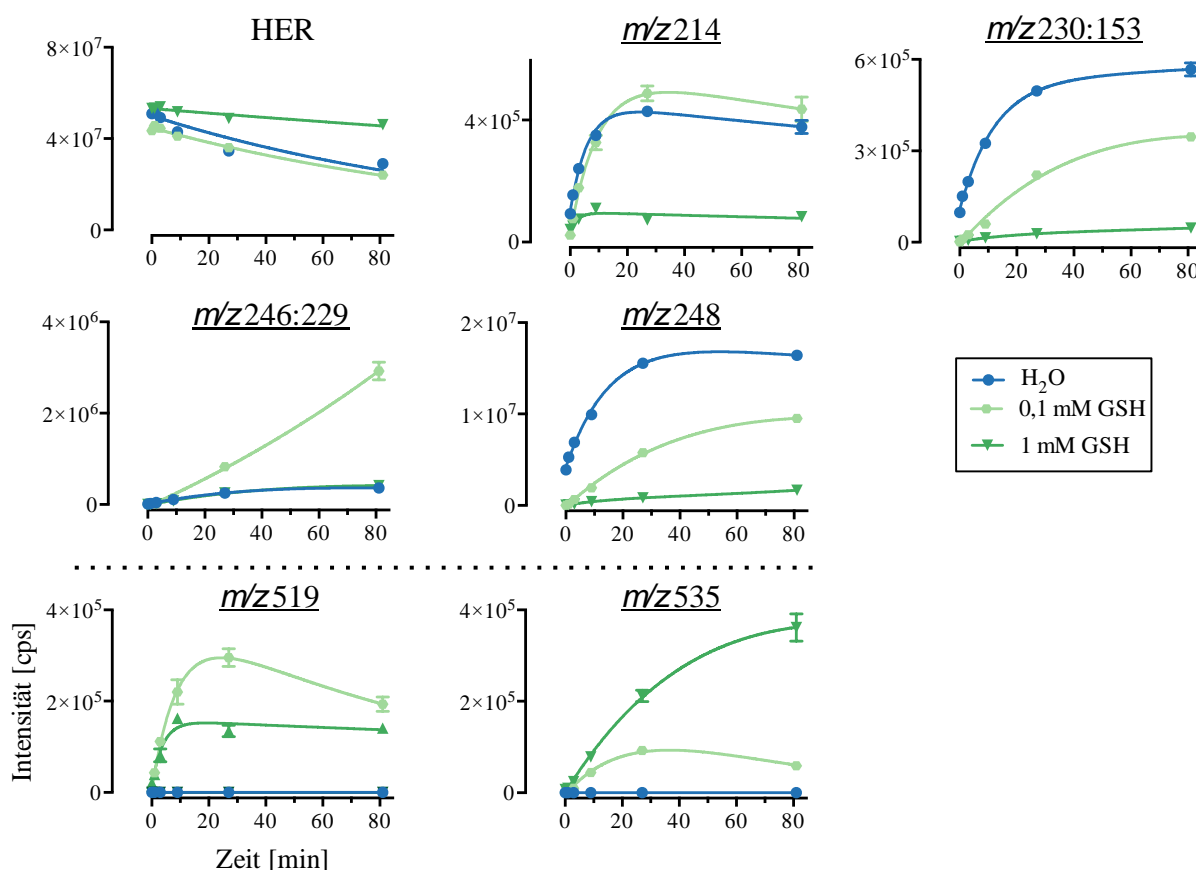


Abbildung 54: Zeitverlauf der relativen Intensitäten von HER-Produkten in Ansätzen mit ¹O₂ und HER in Abhängigkeit von GSH. Die Intensitäten von HER, m/z 214, 230:153, 246:229, 248, 519 und 535 wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 10 mM DHPNO₂, 100 μM HER und 0, 0,1 oder 1 mM GSH eingesetzt. Die Proben inkubierten 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C bis die Reaktion durch die Lagerung auf Eis gestoppt wurde. Anschließend wurden die Ansätze mittels LC-MS/MS gemessen. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

Ergebnisse

In dem Reaktionsansatz mit 0,1 mM GSH wurde ein HER-Verbrauch beobachtet, ähnlich dem in der H₂O-Kontrolle. Bei 1 mM GSH war die Intensitätsabnahme schwächer. Mit 1 mM GSH im Reaktionsansatz war die Bildung aller HER-Produkte (*m/z* 214, 230:153, 246:229 und 248) inhibiert. In Proben mit 0,1 mM GSH zeigte sich für die *m/z* 214-Produktion im Vergleich zur H₂O-Kontrolle kein unterschiedlicher Intensitätsanstieg. Jedoch hatte 0,1 mM GSH inhibierenden Einfluss auf die *m/z* 230:153- und 248-Bildung.

Bei *m/z* 246:229 verhielt es sich anders. Dort konnte der größte Intensitätsanstieg in Proben mit 0,1 mM GSH beobachtet werden und die *m/z* 246:229 Produktion in H₂O war unterdrückt. Wahrscheinlich reagierte GSH ab einer Konzentration von 1 mM mit den Intermediaten oder HER-Produkten *m/z* 214 und *m/z* 230:153 zur *m/z* 519 und *m/z* 535. Dies war vergleichbar mit der ¹O₂-Reaktion mit HER in Gegenwart von 25 mM TRIS (siehe 3.8.5.1). Durch das Ausbleiben der *m/z* 214- und 230:153-Produkte wurden die Folgeprodukte *m/z* 246:229 und 248 möglicherweise nicht mehr gebildet.

Bei *m/z* 519 handelte es sich um ein Reaktionsprodukt aus HER, ¹O₂ und GSH, da *m/z* 519 nicht in Reaktionsansätzen mit H₂O detektiert werden konnte. In 0,1 mM GSH stieg die *m/z* 519-Intensität bis zur 27. Minute an und fiel danach ab. Beim Einsatz von 1 mM GSH war ein Intensitätsanstieg bis zur 9. Minute mit anschließender Plateauphase zu beobachten. Im Reaktionsansatz mit 0,1 mM GSH waren höhere Intensitäten messbar als mit 1 mM GSH.

m/z 535 war ein HER-Reaktionsprodukt mit GSH, da dieses Molekül in der H₂O-Kontrolle nicht nachgewiesen wurde. Die *m/z* 535-Intensität stieg in den GSH-Reaktionsansätzen nach 3 Minuten an. Bei 1 mM GSH konnten höhere Intensitäten als bei 0,1 mM GSH beobachtet werden.

3.8.7.2 Bildung der Ergothioneinprodukte in GSH über die Zeit

Im Folgenden wird nun die Reaktivität und Stabilität der identifizierten ET-Produkte in den Reaktionsansätzen von ET (100 µM), DHPNO₂ (10 mM) mit GSH (0, 0,1, 1 oder 5 mM) über die Zeit analysiert (Abbildung 55). Da bei der Reaktion auch HER entsteht, welches wiederum neue HER-Produkte mit ¹O₂ bildet, sind die Molekülbezeichnungen der HER-Produkte zur Vereinfachung unterstrichen. Die Kurvenverläufe in GSH werden im Folgenden, wenn nicht anders beschrieben, mit den H₂O-Kontrollverläufen verglichen.

Ergebnisse

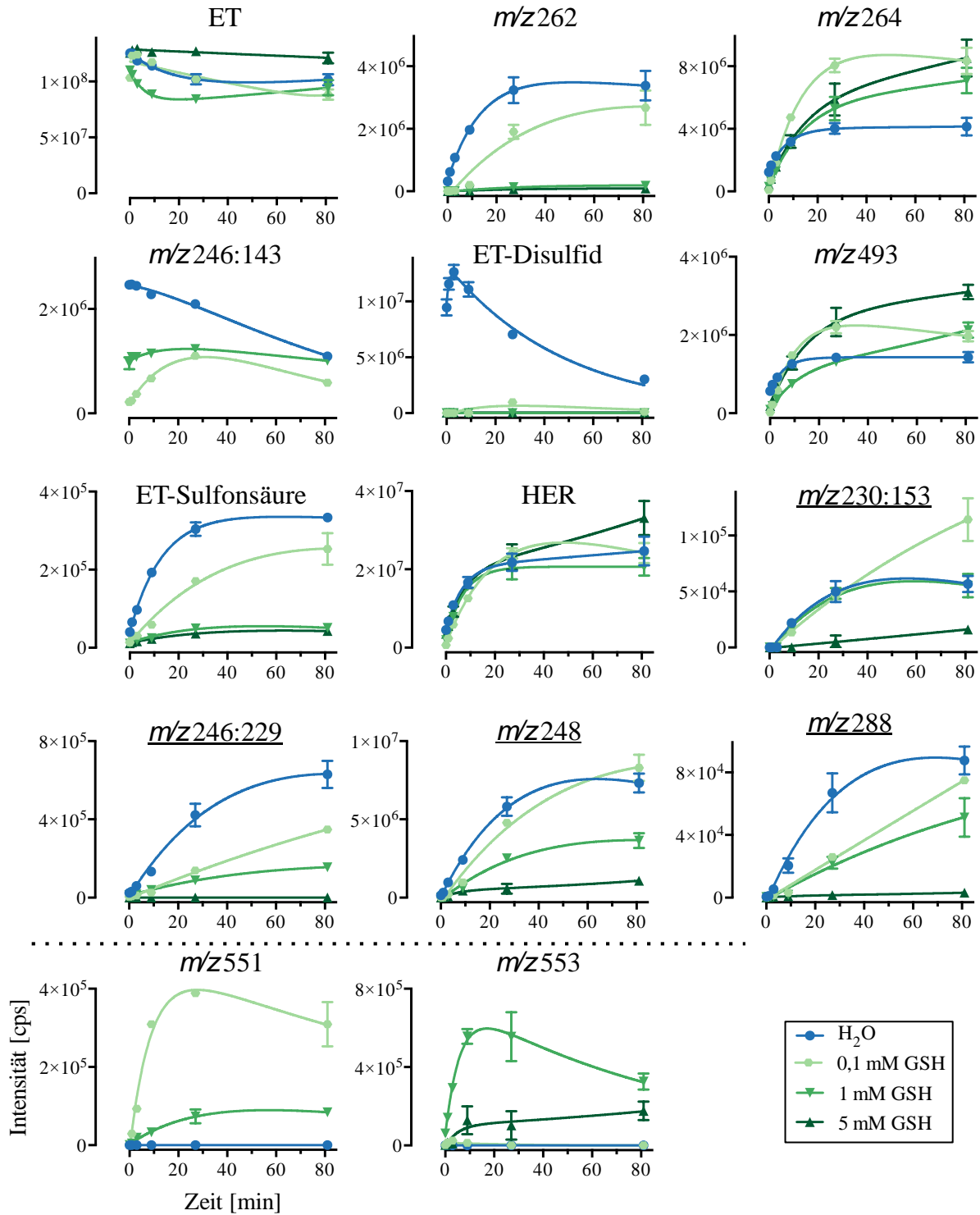


Abbildung 55: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in Ansätzen mit ¹O₂ und ET in Abhängigkeit von GSH. Die Intensität von ET, ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, m/z 246:143, 262, 264, 493, 551, 553, HER, m/z 230:153, 246:229, 248 und 288 wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. In den Ansätzen wurden 10 mM DHPNO₂, 100 µM ET und 0, 0,1, 1 oder 5 mM GSH eingesetzt. Die Proben inkubierten 0, 1, 3, 9, 27 und 81 Minuten bei 37°C bis die Reaktion mit der Lagerung auf Eis gestoppt wurde. Anschließend wurden die Ansätze mittels LC-MS/MS gemessen. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert ± SEM).

Ergebnisse

Die Reaktionsansätze mit 0, 0,1 mM GSH zeigten eine ET-Abnahme über die Zeit. Eine Auffälligkeit konnte bei 5 mM GSH beobachtet werden. Hier bleibt die ET-Intensität über die Reaktionsdauer gleich. Bei dem Ansatz mit 1 mM GSH wurde der ET-Gehalt bis zur 27. Minute geringer. Nach Minute 27 stieg die ET-Intensität wieder an.

Bei der Reaktion in 1 und 5 mM GSH konnte keine m/z 262-Intensität gemessen werden. 0,1 mM GSH hatte einen inhibierenden Einfluss auf die gemessene Intensität.

m/z 264 war das einzige ET-Produkt, welches in Gegenwart von 5 mM GSH eine erhöhte Intensität auswies. Auch bei den anderen GSH-Konzentrationen von 0,1 und 1 mM konnte eine Intensitätszunahme gemessen werden.

Bei dem m/z 246:143-Zeitverlauf zeigten sich erneut unterschiedliche Kurvenverläufe, wie es bereits in Gegenwart von TRIS (Abbildung 50) und ASC (Abbildung 52) zu beobachten war. Hierbei kam es zu einigen Diskrepanzen, da im Reaktionsansatz mit 0,1 mM GSH ein biphasische Kurvenverlauf zu beobachten war, die Kurven in H_2O und 1 mM GSH jedoch nach hoher Initialintensität mit fortschreitender Reaktionsdauer abfielen. Dies war wahrscheinlich auf die Messdurchführung zurückzuführen. Ein Experiment mit 5 mM GSH wurde nicht angefertigt.

Auffällig war der GSH-Einfluss auf die Generierung des ET-Disulfids. Eine vollständige Unterdrückung fand ab einer GSH-Konzentrationen von 0,1 mM statt, wohingegen die H_2O -Kontrolle den bereits zuvor beobachteten biphasischen Intensitätsverlauf über die Zeit aufwies.

GSH hatte keinen inhibierenden Einfluss auf die m/z 493-Bildung. Die m/z 493-Intensitätsverläufe stiegen initial an, bis bei der H_2O -Kontrolle und 0,1 mM GSH ein Plateau erreicht wurde. Bei 1 mM und 5 mM GSH wurde bis zur 81. Minute m/z 493 gebildet.

Ab 1 mM GSH war die Bildung der ET-Sulfonsäure fast vollständig unterdrückt. In dem Ansatz mit 0,1 mM GSH war die Intensität erniedrigt.

Die Zeitverläufe der HER-Bildung zeigten keine Beeinflussung durch die verschiedenen GSH-Konzentrationen.

In Gegenwart von 5 mM GSH wurde bei der Reaktion von ET und $DHPNO_2$ die m/z 230:153-Produktion nahezu vollständig inhibiert. Im Reaktionsansatz mit 0,1 und 1 mM GSH war bis zur 27. Minute kein Einfluss von GSH auf die m/z 230:153-Generierung zu

Ergebnisse

beobachten. Ab der 27. Minute wurde eine erhöhte Intensität in 0,1 mM GSH im Vergleich zu H₂O und 1 mM GSH gemessen.

Bei der *m/z* 246:229-Produktion aus DHPNO₂ und ET lag ein konzentrationsabhängiger GSH-Einfluss vor. Je größer die GSH-Konzentration war, desto niedrigere Intensitäten wurden gemessen. Bei allen Reaktionsansätzen war eine *m/z* 246:229-Produktion erst nach 3 Minuten zu beobachten.

In Gegenwart von 5 mM GSH wurde die Bildung des HER-Produkt *m/z* 248 nahezu vollständig unterdrückt. 1 mM GSH hatte einen inhibierenden Einfluss auf die Intensität, wobei 0,1 mM GSH im Reaktionsansatz keinen Einfluss auf den *m/z* 248-Intensitätsverlauf hatte.

Die *m/z* 288-Bildung war in Gegenwart von 5 mM GSH nahezu vollständig inhibiert. 0,1 und 1 mM GSH hatten einen hemmenden Einfluss auf die *m/z* 288-Produktion.

In den Reaktionsansätzen wurde weder Thioharnstoff noch *m/z* 214 gemessen, da die Fragmente für die SRM-Analyse erst nach Durchführung der GSH-Zeitverläufe identifiziert wurden. Aufgrund von DHPNO₂-Knappheit wurde kein erneuter Versuch durchgeführt.

Der *m/z* 551-Intensitätsverlauf in H₂O, 0,1 oder 1 mM GSH zeigte eine GSH-Konzentrationsabhängigkeit. *m/z* 551 ist ein ET-basierendes Reaktionsprodukt aus der Reaktion von ET und ¹O₂ mit GSH, weshalb *m/z* 551 nicht bei der Verwendung von H₂O nachgewiesen wurde. Bei 0,1 mM GSH stieg das Reaktionsprodukt bis zur 27. Minute sehr stark an, dann fiel es bis 81 Minuten leicht ab. In Gegenwart von 1 mM GSH im Reaktionsansatz kam es zu einem flacheren Intensitätsanstieg verglichen mit den Intensitäten in 0,1 mM GSH. Bei dem Einsatz von 5 mM GSH konnte *m/z* 551 nicht detektiert werden.

Auch *m/z* 553 ist ein ET-Reaktionsprodukt mit ¹O₂ und GSH und konnte in der H₂O-Kontrolle nicht gemessen werden. In 0,1 mM GSH konnte keine *m/z* 553-Intensität detektiert werden, anders als bei dem ET-¹O₂-GSH-Produkt *m/z* 551. Bei 1 mM GSH stieg die *m/z* 553-Intensität bis zur 9. Minute stark an und fiel daraufhin bis zur 81. Minute leicht ab. In 5 mM GSH kam es zu einem flacheren Intensitätsanstieg über die gesamte Reaktionsdauer verglichen mit dem 1 mM GSH-Zeitverlauf.

3.8.8 Identifizierung der Ergothioneinprodukte in 293 Zellen

Nachdem die *in vitro* gefundenen ET- und HER-Produkte identifiziert und die Reaktivität und Stabilität in H₂O, ASC, GSH und TRIS getestet wurden, fand eine Analyse in 293 Zellen statt. Hierfür wurden die Zellbedingungen ETT(+/-)/GSH(+/-) erzeugt, wie bereits für den intrazellulären ¹O₂-Quenchvergleich von ET und GSH beschrieben (siehe 3.7). Als ¹O₂ generierendes System wurde TMPyP belichtet. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Belichtung oder ohne TMPyP-Inkubation angefertigt. Gemessen wurden die erzeugten Zelllysate mittels LC-MS/MS (siehe 2.11.6).

Das Zellexperiment mit TMPyP-Belichtung in ETT(+/-)/GSH(+/-) Effektzellen zeigte in den ETT(+) Zelllysaten keine Abnahme von ET über die Zeit, jedoch konnte in Zelllysaten von Effektzellen die ET-Produkte ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, Thioharnstoff, *m/z* 246:143, 262, 264, 493, 551 und 553, sowie HER, *m/z* 246:229, 248 und 288 in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 56). Die Reihenfolge ist zur eindeutigeren Unterscheidung der ET- und HER-Produkte gewählt worden. In Gegenwart von GSH konnte eine Minimierung der Intensität der Produkte ET-Disulfid, Thioharnstoff, *m/z* 262, 246:143, 246:229 und 288 gemessen werden, ähnlich der *in vitro* Ergebnisse (Abbildung 55). Die ET-¹O₂-GSH-Produkte *m/z* 551 und 553 konnten nur in Zellen mit GSH gemessen werden (Abbildung 56). In den ETT(-) Effektzelllysaten waren die ET-Produkte nicht nachweisbar. Die Kontrollzellen, welche ohne Licht oder ohne TMPyP behandelt wurden, wiesen kaum bis keine ET-Produktintensitäten auf (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

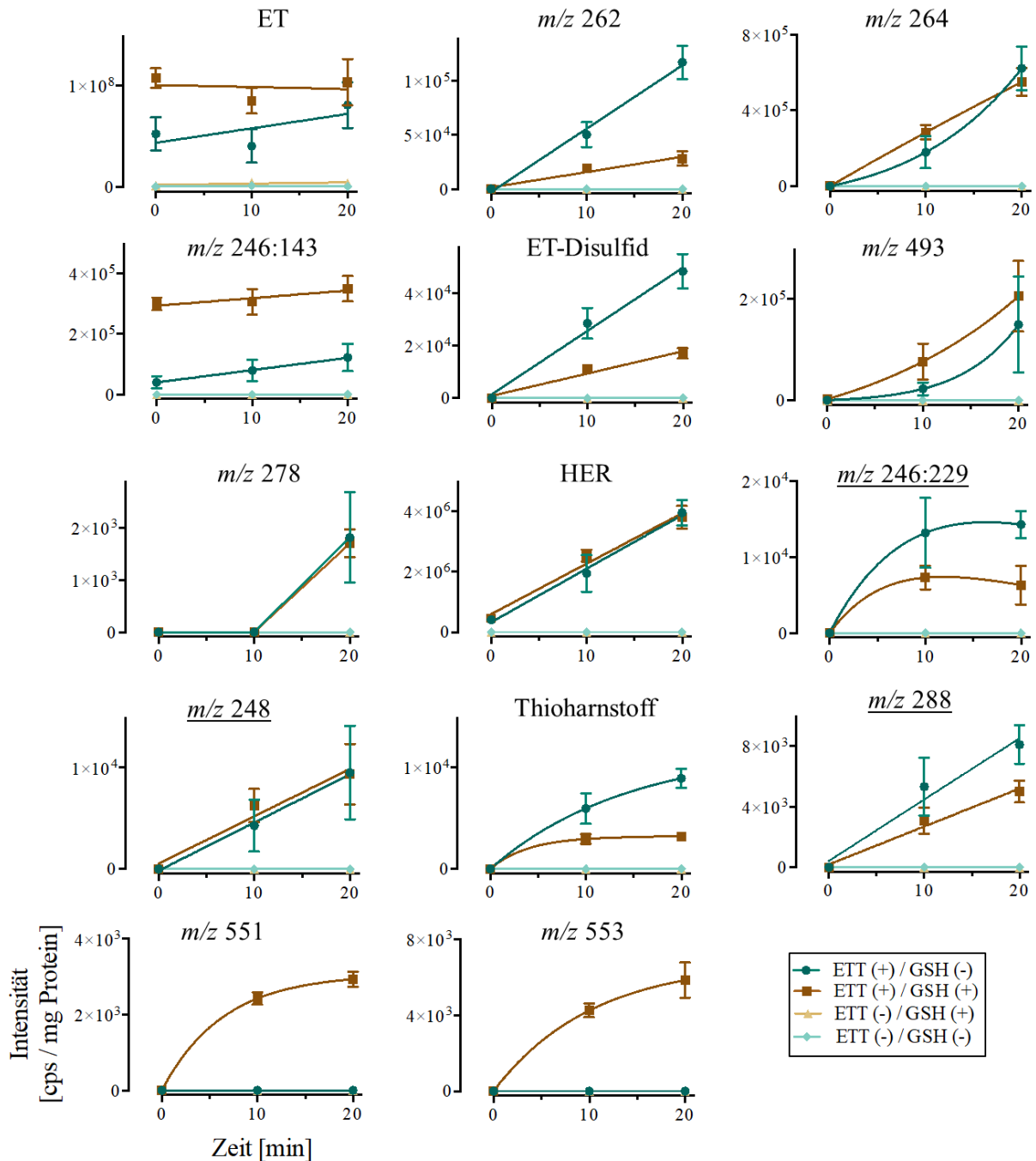


Abbildung 56: Zeitverlauf der relativen Intensitäten der ET- und HER-Produkte in 293 Zellen mit und ohne ET bzw. GSH. Die Intensität von ET, ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, Thioharnstoff, *m/z* 246:143, 262, 264, 493, 551, 553, HER, *m/z* 246:229, 248 und 288 wurde mittels SRM-Analyse mit dem Fragmentübergang aus Tabelle 23 gemessen. Bei den Zellexperimenten wurde das GSH in den Zellen mit Hilfe von BSO/DEM minimiert (GSH(-)) oder die Zellen wurden nicht vorbehandelt (GSH(+)). Durch induzierte ETT-Expression konnten die ETT(+)-Bedingungen der Zellen generiert werden (ETT(-) ohne ETT-Expression). Anschließend wurden die 293 Zellen mit einer 100 μ M TMPyP/ET-Lösung inkubiert, für 0, 10 und 20 Minuten belichtet und dann lysiert. Die Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die HER-Produkte sind mit unterstrichener Molekülbezeichnung gekennzeichnet. (n = 3, Mittelwert \pm SEM).

3.8.9 Zusammenfassung der Ergothionein- und Hercyninprodukte

Aufgrund des großen Umfangs der Ergebnisse werden die für die Interpretation der Daten relevantesten Beobachtungen im Folgenden noch einmal zusammengefasst.

Alle identifizierten Moleküle konnten per akkurater Masse (außer: m/z 77 und 349), Fragmentmuster und durch $^1\text{O}_2$ -Konzentrationsabhängigkeit als ET- oder HER-Produkte bestätigt werden. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch die $^1\text{O}_2$ -Generierung mit TMPyP anstatt DHPNO₂ bestätigt. Die entstandenen Produkte ET-Disulfid, ET-Sulfonsäure, HER, m/z 246:143, 262, 264 und 493 waren auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET und die Produkte m/z 214, 230:153, 246:229, 248 auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit HER zurückzuführen. Thioharnstoff entstand in geringer Menge bei der ET-Reaktion und reagierte mit Intermediaten oder dem HER-Produkt m/z 214 zu dem stabilen m/z 288.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist durch den Intensitätsanstieg der SRM-Messung in H₂O über die Zeit gezeigt. Dabei wurde am schnellsten m/z 246:143 > 264 > 262 gebildet. Bei m/z 246:143 war ein biphasischer Kurvenverlauf zu beobachten, wie auch beim ET-Disulfid. Diese Moleküle wurden wahrscheinlich schnell gebildet und reagierten dann wieder schnell weiter.

Die Bildung von m/z 214, 230:153, 246:229, 248 und 288 bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET trat nach der HER-Bildung erst verzögert auf, weshalb diese als HER-Produkte identifiziert wurden. Bestätigt wurden die HER-Produkte zudem durch Bildung in dem Reaktionsansatz mit HER anstelle von ET als $^1\text{O}_2$ Reaktionspartner und den hierbei beobachteten direkten Intensitätsanstieg.

In Gegenwart von 25 mM TRIS wurde die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET beeinflusst. Die Generierung von m/z 246:143, 248 und 264 war inhibiert und die von ET-Disulfid, HER und m/z 262 war im Vergleich zur H₂O-Kontrolle in der Intensität kaum verändert. Bei der $^1\text{O}_2$ -Reaktion mit ET in 25 mM TRIS wurde eine große Menge m/z 365 generiert. Die m/z 365-Fragmentierung zeigte bei einem der beiden Konstitutionsisomeren ein Fragment bei m/z 230, wobei es sich um ET handelte. Dies war durch eine Ionenfalle-Analyse (MS³) bestätigt worden. Dabei konnten die ET charakteristischen Fragmente m/z 186 und 127 identifiziert werden.

Bei der HER-Reaktion wurde überwiegend m/z 333 und in geringer Menge m/z 349 produziert. Alle HER-Produkte m/z 214, 230:153, 246:229 und 248 sind in 25 mM TRIS inhibiert.

Ergebnisse

Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET in 5 mM ASC wurden sehr hohe initiale Intensitäten für HER, m/z 214 und 278 gemessen. Dahingegen waren alle anderen Produkte in 5 mM ASC nahezu vollständig oder stark inhibiert. Im ET-Reaktionsansatz mit bis zu 1 mM ASC wurden die ET-Produkte m/z 262 und 264 nicht beeinflusst.

Die HER-Produkte m/z 230:153 und 248 waren bei der HER-Reaktion in 1 mM GSH inhibiert und m/z 246:229 stark reduziert. Dafür tritt in großen Mengen das m/z 214-GSH-Produkt m/z 519 auf, welches schneller gebildet wurde als das m/z 230-GSH-Produkt m/z 535.

Der ET Gehalt nahm bei der Reaktion in 5 mM GSH nicht ab und in 1 mM GSH kam es erst zu einer ET-Abnahme mit einer späteren Intensitätszunahme über die Zeit. Bei der ET-Reaktion in GSH-Gegenwart wurde kein ET-Disulfid gebildet. HER blieb stabil und die m/z 248-Menge wurde mit steigender GSH-Konzentration geringer. Auffällig war, dass m/z 262 in 1 mM GSH komplett verschwand. m/z 264 zeigte sogar in 0,1 mM GSH erhöhte Intensitäten, selbst bei 5 mM GSH war die m/z 264-Intensität höher als ohne GSH. Die m/z 246:143-Intensität ist bei 0,1 mM GSH reduziert, aber bleibt bei Zugabe von 1 mM GSH konstant.

Zwei GSH-konzentrationsabhängige ET-GSH- $^1\text{O}_2$ -Produkte wurden identifiziert. m/z 551 war das dominierende ET- $^1\text{O}_2$ -GSH-Produkt im Reaktionsansatz mit 0,1 mM GSH und m/z 553 mit 1 mM GSH. Beide Produkte waren in Gegenwart von 5 mM GSH reduziert.

4 Diskussion

Obwohl ET bereits 1909 zum ersten Mal beschrieben wurde, ist die genaue Funktion von ET bis heute noch nicht geklärt [1]. Deiana und Kollegen konnten die schützende Wirkung von ET gegenüber Lipidperoxidation nachweisen [19]. Andere vermuten, dass ET an der Reaktion von Ferrylmyoglobin [20] oder an der Formation von Kupferkomplexen beteiligt ist [21]. Am häufigsten wurde ET jedoch als Antioxidans und Zytoprotektant beschrieben [23, 26, 115]. *In vitro* Experimente zeigten einen ET-schützenden Effekt gegenüber Hydroxyl-Radikalen, Hypochlorit, Peroxynitrit, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen [24, 25, 28, 116].

Bei einem Vergleich von ET mit den Hauptantioxidantien der Zelle, GSH und Ascorbinsäure, zeigte ET keine erhöhte schützende Wirkung bezüglich Hydroxyl-Radikalen [24]. Außerdem wird GSH im Vergleich zu ET ein höherer Schutz gegenüber H_2O_2 zugesprochen [117]. Unveröffentlichte *in vitro* Daten der Arbeitsgruppe Gründemann demonstrieren einen 20-fach höheren ET-Schutzeffekt gegenüber Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) im Vergleich zu GSH [29].

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse bezüglich der Funktion von ET sind folglich sehr kontrovers. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Eigenschaften von ET, insbesondere den vermeintlich gegebenen ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und zu validieren.

4.1 Intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung in Gegenwart von Ergothionein

Um die Eigenschaften von ET genauer charakterisieren zu können, musste zunächst die Eignung der verwendeten Photosensibilisatoren (PST) getestet werden. Zur intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Generierung wurden die PST ReAsH, Bengal Rosa (BR) und TMPyP verwendet. PST setzen zu geringen Teilen andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei [118], sodass Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen als Nebenprodukte entstehen können (siehe 1.2.2) [119]. Wenn in dieser Arbeit von hauptsächlich $^1\text{O}_2$ -Generierung gesprochen wird, sind hiermit auch die geringen Teile anderer durch PST freigesetzten ROS gemeint. Zusätzlich zu den PST wurde das thermolytisch $^1\text{O}_2$ -freisetzende DHPNO₂ verwendet, um die Spezifität des $^1\text{O}_2$ -generierenden Systems zu gewährleisten. Die intrazelluläre Methionin-Sulfoxid (MSO)-Konzentration diene als $^1\text{O}_2$ -Indikator, um die Bedingungen mit und ohne Ergothionein-Transporter (ETT)-Expression zu vergleichen. Dabei steht im folgenden ETT(+) für die ETT-Expression und damit einhergehend die

ET-Aufnahme in die Zellen. Demensprechend exprimieren ETT(-) Zellen den ETT nicht und somit gelangt nahezu kein ET in die Zellen (Abbildung 21, B).

MSO entsteht bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ und anderen ROS mit Methionin. MSO ist in der Arbeitsgruppe Gründemann als $^1\text{O}_2$ -Indikator etabliert [29]. Durch die Reaktion von $^1\text{O}_2$ und anderen ROS mit Methionin steht der Zelle weniger Methionin zur Verfügung und dies führt zu Schädigung der Zelle. Eine geringere intrazelluläre MSO-Konzentration steht daher für weniger oxidativen Stress.

4.1.1 ReAsH

Die verwendeten PST haben unterschiedliche chemische Eigenschaften. Dabei erschien ReAsH gegenüber den anderen oben genannten PST aufgrund seiner kontrollierbaren intrazellulären Lokalisation als am besten geeignet. Laut Literatur bindet ReAsH ein spezifisches Tetracysteinmotiv (TC), mit welchem ein beliebiges Protein modifiziert werden kann [120]. Nach Diffusion des Farbstoffs in die Zelle bindet dieser an das Motiv und kann durch Belichtung hauptsächlich $^1\text{O}_2$ bilden. Das modifizierte Protein wird inaktiviert [70] und durch die erhöhte Diffusionsstrecke von $^1\text{O}_2$ im Vergleich zu anderen ROS können auch andere intrazelluläre Moleküle mit $^1\text{O}_2$ reagieren (siehe 1.2).

In dieser Arbeit wurde der Tetracyclin-Repressor (TetR) mit dem TC modifiziert. Der TetR wurde ausgewählt, da nach der 293-Zell-Transfektion durch den Vektor pEBTetD TetR kontinuierlich exprimiert wird [84]. Bei der Verwendung des Vektors pEBTetD/ETT kann simultan neben TetR-TC auch durch Doxycyclinhinzugabe ETT induziert werden. Es wurde ein System generiert, in dem ET in die Zellen aufgenommen und TetR-TC ständig exprimiert werden kann. Nach ReAsH-Inkubation sollte dieses an das TC binden und durch Belichtung gezielt hauptsächlich $^1\text{O}_2$ im Zytosol produziert werden.

Bei den ReAsH-Versuchen in ETT(+) Effektzellen wurden im Vergleich zu ETT(-) Effektzellen 45% weniger MSO generiert (Tabelle 24). Die MSO-Konzentration in den Kontrollzellen ist minimal geringer als in den ETT(+) Zellen (Tabelle 8). Es konnte ein ET-Schutzeffekt hauptsächlich gegenüber $^1\text{O}_2$ aber auch anderen ROS gezeigt werden.

Anschließend wurde die Bindung und die Spezifität des ReAsH-TC-Systems kontrolliert. Die TC(-) und TC(+) Zellen wurden mit ReAsH gefärbt und unspezifische ReAsH-Bindungen sollten mit Dimercaprol herausgewaschen werden. Eine fluoreszenzmikroskopische

Aufnahme der beiden ReAsH inkubierten Zelllinien wurde angefertigt. Laut Literatur sollte nur an TC-gebundenes ReAsH fluoreszieren [120]. Wie der Vergleich zwischen TC(+) zu TC(-) Zellen zeigte, war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abbildung 22). ReAsH band unspezifisch an zelluläre Moleküle und das Herauswaschen von unspezifisch gebundenen ReAsH mit Dimercaprol funktionierte nicht. Die ReAsH-Vorteile der gezielten $^1\text{O}_2$ -Lokalisation waren daher hinfällig.

Darüber hinaus konnte zwar ein ET-Schutzeffekt hauptsächlich gegenüber $^1\text{O}_2$ mit Hilfe des ReAsH-TC-Systems gezeigt werden, die Überlegenheit dieses Systems gegenüber den herkömmlichen in der Literatur verwendeten PST war jedoch nicht gegeben.

4.1.2 Bengal Rosa

Ein weiterer in dieser Arbeit verwendeter PST war Bengal Rosa (BR). Publikationen zu BR beschrieben diesen Farbstoff als effizienten $^1\text{O}_2$ -Generator nach Anregung mit sichtbarem Licht [71]. Durch die lipophile Struktur (Abbildung 10) akkumuliert dieser PST hauptsächlich in den Lipidmembranen der Zelle [121], wobei ET im Zytosol lokalisiert ist [13].

Die BR-Zeitverlaufexperimente zeigten eine Verringerung auf 51% (Tabelle 9), die BR-Kontrollexperimente eine Verringerung auf 58% der MSO-Konzentration in ETT(+) Effektzellen im Vergleich zu ETT(-) Effektzellen (Tabelle 24).

Im Zeitverlaufexperiment war die MSO-Ausgangskonzentration für ETT(+/-) Effektzellen gleich. Bis zur 3. Minute stieg die MSO-Konzentration in ETT(-) Effektzellen schneller an, als in ETT(+) Effektzellen. Dadurch zeigte sich der durch BR-Belichtung generierte ET-Schutzeffekt insbesondere gegenüber $^1\text{O}_2$.

Die gemessene ET-Konzentration bei $^1\text{O}_2$ -Generierung durch BR nahm über die Zeit negativ exponentiell ab (Abbildung 23). Nach 3 Minuten war ET in den ETT(+)-Effektzellen verbraucht. Interessanterweise kam es in ETT(+) Effektzellen mit verbrauchtem ET nach 4 Minuten zu einem sprunghaften MSO-Konzentrationsanstieg. Daraus kann geschlossen werden, dass der ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ verwirkt, sobald kein intrazelluläres ET mehr vorhanden ist, wodurch es zu einer erhöhten MSO-Produktion kommt.

4.1.3 TMPyP

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit die PST-Spezies TMPyP getestet. Innerhalb der Zelle liegt TMPyP im Zytosol vor und ist dort aufgrund der positiven Ladung vorwiegend an der negativ geladenen DNA im Zellkern lokalisiert [122]. Dieser PST zählt zu den Porphyrin-Derivaten. Treten Porphyrine und ihrer Derivate mit UV-Licht in Kontakt, so setzen diese hauptsächlich $^1\text{O}_2$ frei [37]. Die Untersuchung der $^1\text{O}_2$ -Generierung von Porphyrine ist insofern von wesentlichem Interesse, als dass Häm ebenfalls zu der Gruppe der Porphyrine gehört. Bei Häm handelt es sich um eine postethische Gruppe des Hämoglobins, wobei Hämoglobin 96% der Trockenmasse von Erythrozyten ausmacht, wodurch auch eine enorme Menge an Häm in Erythrozyten vorhanden ist [123]. Nur eisenfreies Häm ist in der Lage, durch UV-Lichtanregung $^1\text{O}_2$ freizusetzen [124]. Des Weiteren weisen Hämoglobin und dessen Derivate Peroxidaseaktivität auf und dadurch wird $^1\text{O}_2$ zusätzlich freigesetzt [125, 126]. Die höhere $^1\text{O}_2$ -Aussetzung der Erythrozyten ist insofern interessant, da in Erythrozyten eine erhöhte ET-Konzentration von 1 mM nachgewiesen wurde [117].

Die Ergebnisse der TMPyP-Kontrollexperimente in ETT(+) Effektzellen zeigten eine auf 58% verringerte MSO-Konzentration gegenüber ETT(-) Effektzellen (Tabelle 24). Dies unterstützte die Beobachtungen, welche bei der Untersuchung von ReAsH und BR gemacht wurden. Die ET-Konzentration in TMPyP-Zeitverlaufsexperimenten stagnierte auf dem Niveau des Ausgangswerts (Tabelle 11) oder fiel lediglich um maximal 25% ab (Tabelle 12). Die Ursachen hierfür werden im Folgenden in Bezug auf die verschiedenen PST Spezies vergleichend diskutiert (siehe 4.1.4).

4.1.4 Vergleich der PST ReAsH, Bengal Rosa und TMPyP

Tabelle 24 fasst die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale hinsichtlich Behandlung, Ergebnisse der Zellexperimente und die aus den Ergebnissen berechneten Faktoren zusammen. Dabei stellte sich ReAsH in allen getesteten Parametern als defizitär gegenüber den PST BR und TMPyP heraus. Sogar der in der Literatur beschriebene und zuvor angenommene Vorteil der gesteuerten Lokalisation von ReAsH ließ sich durch die floureszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht bestätigen. Des Weiteren ist die Handhabung eines Arsenfarbstoffs aufwendiger als die von BR und TMPyP. Aus diesen Gründen wurde ReAsH für weitere Experimente nicht in Betracht gezogen.

Diskussion

Die maximale BR-Belichtungszeit (3 Minuten) war verglichen mit jener von ReAsH und TMPyP (jeweils 20 Minuten, Tabelle 24) stark verkürzt. Dies lag zum einen vermutlich an der BR-Lokalisation in der Zellmembran und zum anderen an der Anregungseffizienz bezogen auf die $^1\text{O}_2$ -Freisetzung, die durch den Strahler induziert wurde. Als Folge der erhöhte $^1\text{O}_2$ -Freisetzung durch die BR-Belichtung wurde die Zellmembran geschädigt. Damit einhergehend kam es zu einer Schädigung der Adhäsionsproteine, wie beispielsweise Laminin, Fibronectin und Cadherin, die für die Anheftung der Zellen am Schalenuntergrund verantwortlich sind [127]. Diese Schädigung führte zu einem erhöhten Zellsterben, welches durch eigene mikroskopische Beobachtungen und zusätzlich durch eine geringere Proteinmenge in Effektzellen im Vergleich zu Kontrollzellen bestätigt wurde. Da die ET- und MSO-Konzentrationen auf die Proteinmenge normiert wurden, sind die resultierenden Ergebnisse auch in Effektzellen mit geringerer Zellzahl vergleichbar.

Tabelle 24: PST-Vergleich bezüglich Behandlung, Ergebnisse aus den Zellexperimenten und hieraus berechnete Effizienz- und Schutz-Faktoren. Dargestellt ist die eingesetzte Photosensibilisatorkonzentration (PST), PST/ET-Inkubationszeit, Belichtungsart, optimale Anregungswellenlänge zur Induzierung der ¹O₂-Freisetzung und maximale durchgeführte Belichtungsdauer. Außerdem sind die Ergebnisse der ET-Konzentrationen in den ETT(+) Kontrollzellen mit Belichtung ohne PST-Inkubation und die MSO-Konzentrationen in ETT(-) Effektzellen aufgegriffen. Weiterhin wurden ¹O₂-Effizienzfaktoren aus dem Quotient der MSO-Konzentration in PST inkubierten ETT(+) oder ETT(-) Zellen mit Licht durch ohne Licht gebildet, sowie der ET-Schutzeffekt aus vorherigen Versuchsergebnissen übertragen (siehe Tabellenerklärung; Berechnungen mit Werten aus Tabelle 8, 10, 12).

	ReAsH	Bengal Rosa	TMPyP
PST [μM]	10	100	100
PST/ET-Inkubationsdauer [h]	1	1	4
Belichtungsart	Halogenstrahler	Halogenstrahler	UV-Leuchttisch
Anregungswellenlänge [nm]	568	549	420
Maximale Belichtungszeit [min]	20	3	20
ET [mM] in ETT(+) Licht (+)	3	2	13
MSO [μM] in ETT(-), PST(+) Licht(+)	2	31	10
¹O₂-Effizienzfaktor in ETT(-) Zellen	3	12	8
¹O₂-Effizienzfaktor in ETT(+) Zellen	2	7	5
ET-Schutzeffekt (%)	44	58	58

c [ET] = ET [pmol/mg Protein] und c [MSO] = MSO [pmol/mg Protein], 1 mg Protein = 6,7 μL (siehe 2.11.6)

$${}^1\text{O}_2\text{-Effizienzfaktor} = \frac{c[\text{MSO}]_{\text{PST inkubierte ETT Effektzellen mit Licht}}}{c[\text{MSO}]_{\text{PST inkubierte ETT Effektzellen ohne Licht}}}$$

$$\text{ET-Schutzeffekt (\%)} = -\frac{c[\text{MSO}]_{\text{von ETT(+)Effektzellen}} \cdot 100}{c[\text{MSO}]_{\text{von ETT(-)Effektzellen}}} + 100$$

BR ist ein effektiverer PST als ReAsH und TMPyP. Dies zeigte sich in den generierten MSO-Konzentrationen und dem ¹O₂-Effizienzfaktor von ETT(+) oder ETT(-) Zellen (Tabelle 24, ¹O₂-Effizienzfaktor). Durch den multiplen ¹O₂-Umsatz, sowie die geringere Generierung anderer ROS, von PST können hohe ¹O₂-Ausbeuten die Zelle unterschiedlich stark schädigen. Das beobachtete erhöhte Zellsterben und die maximale Belichtung von 3 Minuten weisen darauf hin, dass die wesentliche ¹O₂-Generierung durch BR zu viel Stress auf die Zellen auswirkt.

Diskussion

Die geringere $^1\text{O}_2$ -Freisetzung durch TMPyP beruht vermutlich auf der Belichtungsart durch den UV-Tisch und der natürlich gegebenen, optimalen Anregungswellenlänge von 420 nm [69]. 420 nm liegt nahe am Spektrum von UV-Licht, weshalb diese Bedingungen im Labor ohne großen Aufwand geschaffen werden konnten. Hierzu wurde ein UV-Leuchttisch mit der Einstellung 365 nm als Lichtquelle genutzt. Aufgrund der durch die UV-Lampe emittierten, aber für TMPyP dennoch nicht vollkommen optimalen Anregungswellenlänge von 365 nm, wurde die Belichtungszeit auf maximal 20 Minuten verlängert. Die milderen Umstände und die hauptsächlichliche $^1\text{O}_2$ -Freisetzung von TMPyP im Zytosol führten zu einem geringeren Zellsterben.

Ein gravierender Unterschied zwischen BR und TMPyP war die während der Zeitverlauf- und Kontrollexperimente gemessenen ET-Konzentrationen in den ETT(+) Effektzelllysaten. Wurde BR als PST genutzt, so war ET in den Zellen bereits nach 3 Minuten nahezu vollständig verbraucht, wohingegen ET beim Einsatz von TMPyP nicht verbraucht wurde. Dies könnte zum einen an der geringeren $^1\text{O}_2$ -Generierung von TMPyP liegen und zum anderen an der höheren ET-Konzentration in den mit TMPyP durchgeführten Versuchen. In den Kontrollzellen ohne PST-Einsatz (TMPyP-Experiment) wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen (BR-Experiment) eine 8,5-fache erhöhte ET-Konzentration gemessen (Tabelle 24). Dieser Unterschied erklärt sich durch die unterschiedliche experimentelle ET-Inkubationszeiten. Die 293 Zellen wurden während des BR-Experiments eine Stunde [71] und während des TMPyP-Experiments vier Stunden [72] mit PST inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde bereits in der Literatur beschrieben und für diese Arbeit übernommen. Um einen weiteren Waschschritt und somit zusätzlichen Stress für die Zellen zu verhindern, wurde BR oder TMPyP zusammen mit ET inkubiert wodurch sich unterschiedlichen ET-Inkubationszeiten ergaben.

Die niedrigeren MSO-Konzentrationen der ETT(+) Effektzellen verglichen mit denen der ETT(-) Effektzellen treten sowohl beim Einsatz von TMPyP (58%) als auch bei der Verwendung von BR (58%) auf (Tabelle 24, ET-Schutzeffekt). ET bietet bei der BR-Verwendung mit einhergehender effizienteren Freisetzung von $^1\text{O}_2$, sowie geringer Mengen anderer ROS, und niedrigerer ET-Konzentration der Zellen den gleichen Schutz, wie beim TMPyP-Einsatz, mit daraus resultierender geringerer $^1\text{O}_2$ -Effizienz und mehr intrazellulärem ET. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bereits eine geringere ET-Konzentration ausreicht als die, die beim TMPyP-Experiment eingesetzt wurde, um die Zelle vor einer effizienteren hauptsächlichlichen $^1\text{O}_2$ -Belastung zu schützen.

Trotz dieser für die durchgeführten Experimente vermeintlich besser geeigneten Eigenschaften von BR, wurde aufgrund der zellschonenderen $^1\text{O}_2$ -Generierung, der Lokalisation und der einfacheren Handhabung bezüglich Belichtung und Zeitverlaufserstellung TMPyP als PST für die folgenden Zellexperimente verwendet.

4.1.5 DHPNO₂

Neben der durch PST induzierten ROS und $^1\text{O}_2$ -Generierung kann letzteres auch spezifisch thermal durch Endoperoxide erzeugt werden. In der Literatur werden verschiedene funktionelle Endoperoxide beschrieben [76]. DHPNO₂ hat, aufgrund seiner Kombination aus polaren und unpolaren Seitenketten, die besten chemischen Eigenschaften für Zellexperimente (Abbildung 5). Endoperoxide generieren spezifisch nur $^1\text{O}_2$ und keine anderen ROS. Dies stellt auch den Unterschied zu den PST Spezies dar. Der $^1\text{O}_2$ -Umsatz ist durch die Anzahl der $^1\text{O}_2$ -beladenen Moleküle begrenzt. Bei Temperaturen unter 4 °C ist DHPNO₂ stabil [128] und durch Erhitzen entsteht DHPN, 59% $^1\text{O}_2$ und 41% unreaktiver Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) [77].

Die Funktionsfähigkeit des in der Arbeitsgruppe Schmalz synthetisierten DHPNO₂ wurde *in vitro* überprüft. Dabei konnte anhand der *in vitro* Reaktion von Methionin mit DHPNO₂ und ET 50% weniger MSO gemessen werden als in einem Ansatz ohne ET (Abbildung 27). Zusätzlich konnte in DHPNO₂-Zeitverläufen die Halbwertszeit bei 37°C mit 26 Minuten bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), welche nahe an der Literatur beschriebenen Zeit von 23 Minuten lag [77].

Die DHPNO₂-Zellexperimente zeigten bei vier durchgeführten Experimenten jeweils unterschiedliche Ergebnisse. In zwei Experimenten konnte ein ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ in ETT(+) Effektzellen im Vergleich zu ETT(-) Effektzellen gezeigt werden. In den beiden weiteren Experimenten konnte jedoch kein ET-Schutzeffekt beobachtet werden (siehe 3.2.2). Zur Quantifizierung wurde hierbei MSO als $^1\text{O}_2$ -Indikator gemessen. ET-Messungen in den gleichen Zelllysaten, in welchen auch MSO gemessen wurde, zeigten eine ET-Aufnahme in allen vier Experimenten. Das ETT-Aufnahmesystem war daher immer funktionsfähig und kann nicht als Grund für die Nichtreproduzierbarkeit gelten.

Ein weiterer Unterschied in der Behandlung der Zellen war die Inkubation mit Doxycyclin. In der Literatur wird Doxycyclin als PST geführt [91]. Dieser einflussnehmende Faktor konnte auch ausgeschlossen werden (siehe 3.2.2). Die Belichtung von mit Doxycyclin behandelten

Zelllinien ohne ET zeigte in den Zellysaten keine erhöhte MSO-Konzentration verglichen mit Zellysaten unbelichteter Zelllinien (Abbildung 29). Diese Erkenntnis war insofern von Bedeutung, als das die unbeabsichtigte Belichtung Einfluss auf die Ergebnisse von Experimenten hätte nehmen können, die nicht im Dunkelraum durchgeführt wurden.

Eine andere mögliche Ursachen für die Nichtreproduzierbarkeit des Experiments könnte die im Vergleich zu PST schwächere $^1\text{O}_2$ -Generierung durch DHPNO₂ sein. Die generierten MSO-Konzentrationen waren möglicherweise zu gering als diese belastbar gemessen werden konnten. DHPNO₂ setzt nur einmal $^1\text{O}_2$ frei und dabei ist die Biomolekülkonkurrenz als Reaktionspartner, wie zum Beispiel Histidin, Tryptophan, Tyrosin, Cystein, Guanin, Ascorbinsäure uvm. groß [43]. Dadurch kann es sein, dass die intrazelluläre Methioninkonzentration als $^1\text{O}_2$ -angegriffenes Molekül bei manchen Experimenten zu gering ist. Zu der geringeren Ausbeute an MSO kommt hinzu, dass MSO durch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase wieder in Methionin überführt werden kann [93]. Dies erschwert zusätzlich die MSO-Messbarkeit. Außerdem ist die Methioninkonzentration nicht in jedem Experiment identisch. Die 293 Zellen können zum Teil unterschiedlich konfluent gewachsen sein. Dies würde zwar durch die Proteinnormierung herausgerechnet werden, aber dadurch kommt es zu schwankenden intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Freisetzung durch DHPNO₂. Andere Erklärungsansätze sind mir zum jetzigen Zeitpunkt nicht ersichtlich.

4.2 Identifikation von $^1\text{O}_2$ -Indikatormolekülen

Aufgrund der schwächeren $^1\text{O}_2$ -Erzeugung durch DHPNO₂ wurde gezielt nach anderen, möglicherweise geeigneteren $^1\text{O}_2$ -Indikatoren geforscht. Dazu sind hinsichtlich der Literatur einige Stoffe und deren *in vitro* Reaktionen mit $^1\text{O}_2$ beschrieben. Die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Methionin [46], Tryptophan [129], Tyrosin [48], Histidin [45], Cystein, Cystin [28], Ascorbinsäure [54], Harnsäure [130] und Desoxyguanosin [35] wurden in dieser Arbeit getestet (siehe 3.3.1). Desoxyguanosin reagiert mit $^1\text{O}_2$ zu 8-Oxo-Desoxyguanosin. Dieses wurde erhöht im ETT^{-/-}-Zebrafisch gefunden und war letztendlich ausschlaggebend für die Untersuchung von $^1\text{O}_2$ in Bezug zu ET [17]. Jedoch wurde 8-Oxo-Desoxyguanosin bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als kein geeigneter $^1\text{O}_2$ -Indikator beschrieben [29].

In dieser Arbeit wurden alle oben genannten Verbindungen *in vitro* $^1\text{O}_2$ (aus DHPNO₂) ausgesetzt und die Reaktionsprodukte analysiert. Beispielhaft ist das Vorgehen und das Ergebnis von $^1\text{O}_2$ mit Histidin beschrieben (siehe 3.3.1). Dabei wurde im

Differenzabtönungsbild ein rotes Signal bei m/z 188 gefunden, welches fragmentiert und anschließend als Histidin mit 2 Hydroxygruppen an Position 2 und 4 des Imidazolrings postuliert wurde (Abbildung 31). Hierbei konnte die Fragmentmusteranalyse über die mögliche Struktur Auskunft geben. Das Fragment mit der höchsten m/z -Intensität, in diesem Fall m/z 61, wurde dann in eine SRM-Methode zur spezifischeren Analyse übertragen. Da dies ein *in vitro*-Experiment war, wurden im folgenden Zellysate nach $^1\text{O}_2$ -Stress auf m/z 188:61 analysiert (Abbildung 32). Ein m/z 188-Anstieg konnte nicht nachgewiesen werden. Die MSO-Positivkontrolle zeigte eine stetige intrazelluläre MSO-Erhöhung nach TMPyP-Belichtung über die Zeit in ETT(+/-) Effektzellen mit ET-Schutzeffekt. Dass m/z 188 kein geeigneter $^1\text{O}_2$ -Indikator ist, kann verschiedene Gründe haben. Wahrscheinlich wird m/z 188 innerhalb der Zelle metabolisiert. In der Literatur sind fünf *in vitro* Weiterreaktion von m/z 188 beschrieben [45]. Darunter ist zum Beispiel auch Harnstoff, der vielleicht aus der Zelle transportiert oder metabolisiert wird. Jedes $^1\text{O}_2$ -Produkt mit beispielsweise einer Aminosäure macht die betroffene Aminosäure für die Zelle unbrauchbar. Anschließend wird dieses Oxidationsprodukt entweder heraustransportiert oder die Zelle hat seinen Regenerationsmechanismus, um den Verlust zu kompensieren; zum Beispiel bildet die Methionin-Sulfoxid-Reduktase MSO zu Methionin zurück [93]. Dadurch wurde die Suche nach einem geeigneten, in ausreichender Menge vorkommenden, $^1\text{O}_2$ -Indikator erschwert.

Zusammenfassend konnte beim etablierten MSO intrazellulär Konzentrationen gemessen werden. Für die anderen getesteten Aminosäuren sowie Ascorbinsäure, Desoxyguanosin und Harnsäure wurden keine $^1\text{O}_2$ -Indikatorprodukte für Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurde versucht einen exogenen Stoff (TEMP), der ein spezifisches $^1\text{O}_2$ -Produkt (TEMPO) bildet, als intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Indikator zu etablieren (siehe 1.4). Der Versuch, TEMP als $^1\text{O}_2$ -Indikator zu entwickeln, stellte sich als schwierig heraus. In der Literatur wurde TEMPO meist nur mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie gemessen [131] und nicht via LC-MS. Daher musste zuerst eine LC-MS-Methode entwickelt werden. Diese wurde erfolgreich mit den käuflich erwerbbaaren Reinsubstanzen TEMP und TEMPO etabliert. TEMPOH konnte nicht kommerziell erworben werden. Es ist aufgrund der schnellen Reaktion von TEMPO zu TEMPOH in ASC-Gegenwart intrazellulär der wichtigere Indikator. Deshalb musste eine *in vitro* Reaktion von TEMPO mit ASC angesetzt werden, um TEMPOH zu generieren und anschließend zu tunen (siehe 2.11.4). Ein Optimierungsverfahren per

Massenspektroskopie war aufgrund der verschiedenen störenden Substanzen ungenauer, konnte aber durchgeführt werden.

Damit waren die Methoden zur TEMP-, TEMPO- und TEMPOH-Messung etabliert. Anschließend konnten Zellexperimente mit TMPyP-Belichtung in Gegenwart von TEMP durchgeführt werden. Dabei zeigte TEMPO und TEMPOH nach Lyse in $\text{HClO}_4 + 3 \text{ mM ASC}$ (um das Gleichgewicht zur TEMPOH-Seite zu verschieben), keinen Unterschied in ETT(+) Effektzellen und ETT(-) Effektzellen (Abbildung 33). Mit TEMP war der ET-Schutzeffekt in Zelllysaten von ETT(+) Effektzellen bezogen auf die MSO-Konzentration gegenläufig. Es entstand mehr MSO in ETT(+) Effektzellen als in ETT(-) Effektzellen. Die Positivkontrollzellen ohne TEMP-Inkubation dokumentierten den ET-Schutzeffekt mit MSO, wobei weniger MSO in ETT(+) Effektzellen gebildet wurde als in ETT(-) Effektzellen. ET konnte in Gegenwart von TEMP nicht detektiert werden. Dies könnte daran liegen, dass TEMP oder die Reaktionsprodukte mit ET reagieren und ET nicht mehr messbar ist oder die erhöhte TEMP-Konzentration (20 mM Inkubation) unterdrückt möglicherweise die ET-Messung an dem Massenspektrometer durch Ionensuppression. Die Kontrollzellen ohne TEMP-Inkubation wiesen in den Zelllysaten eindeutige intrazelluläre ET-Konzentrationen auf. Da TEMP spezifisch mit $^1\text{O}_2$ zu TEMPO reagiert, es aufgrund der niedrigen Elektronendichte aber wahrscheinlich nicht zu den ausgewählten $^1\text{O}_2$ -Reaktionspartnern gehört [37], wurden die Zellen mit möglichst viel TEMP inkubiert. Um die optimale TEMP-Konzentration zu bestimmen, wurde zuvor ein Zellexperiment mit verschiedenen TEMP-Konzentrationen angefertigt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich ab 20 mM TEMP keine intrazelluläre Konzentrationssteigerung.

Aufgrund der Tatsache, dass TEMPO bzw. TEMPOH den bereits etablierten $^1\text{O}_2$ -Indikator MSO und die ET-Messung verhinderten, konnten TEMPO und TEMPOH nicht als Indikatormolekül für $^1\text{O}_2$ -Schaden in der Zelle etabliert werden.

4.3 Minimierung von intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Quenchern

Die Konkurrenz an Biomolekülen in 293 Zellen ist wahrscheinlich zu groß für die $^1\text{O}_2$ -Generierung durch DHPNO₂. Deshalb wurde zum einen versucht, die MSO-Konzentration durch Methionin-Sulfoxid-Reduktase (MSR)-Inhibition zu erhöhen, zum anderen sollten einzelne $^1\text{O}_2$ -quenchede Komponenten wie Ascorbinsäure (ASC) und

Glutathion (GSH) in der Zelle gezielt minimiert werden, um den ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ messen zu können.

Iodoacetamid ist in der Literatur als Inhibitor der MSR beschrieben [95]. Die Iodoacetamid-Inhibition beruht auf einer Alkylierung von Cysteinresten, wie es im aktiven Zentrum der MSR der Fall ist [96]. Da es sich um eine unspezifische Modifikation aller zellulären Cysteine handelt, wurden keine Publikationen gefunden, die Iodoacetamid für die intrazelluläre Inhibition verwendete.

Ein Experiment wurde dennoch in dieser Arbeit mit 293 Zellen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte deutlich, dass in Iodoacetamid-Gegenwart keine ET-Konzentration innerhalb der Zelle messbar war (Abbildung 34). Dies kann einerseits auf eine Reaktion des ET inhärenten Schwefels mit Iodoacetamid hindeuten. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Zellen die Vorbehandlung mit Iodoacetamid und die anschließende vier stündige TMPyP-Inkubation nicht überleben. Da die ET-Intensität ohne Proteinnormierung, aufgrund von Materialersparnis, analysiert wurde, kann kein eindeutiger Grund für den ET-Verlust definiert werden. Iodoacetamid kann nicht für weitere Experimente zur MSR-Inhibition genutzt werden. Ohne ET kann kein Vergleich des $^1\text{O}_2$ -generierten Zellschadens in ETT(+/-) Zellen durchgeführt werden, wobei es unerheblich ist, weshalb die Zellen nahezu kein intrazelluläres ET aufwiesen.

Ein weiterer Versuch, die MSO-Konzentration zu erhöhen, wurde durch Minimierung der zellulären $^1\text{O}_2$ -Quencher ASC und GSH getestet. In der Literatur wird ASC als effizienter $^1\text{O}_2$ -Quencher geführt [132]. Dabei reagiert ASC mit $^1\text{O}_2$ zu Dehydroascorbinsäure (DHS) und in stöchiometrischer Menge H_2O_2 . H_2O_2 stellt eine weitere reaktive Sauerstoffspezies dar und führt zu zellulärem Schaden [54].

In der Literatur ist eine Methode zur ASC-Minimierung in 1HAEo-Zellen beschrieben [99]. Dafür wurden die Metalle Kobalt(II) und Nickel(II) verwendet. Der Mechanismus beruht nicht auf der direkten ASC-Oxidation zu DHS. Die Kobalt- und Nickel-Metallbindung und der damit einhergehende metallinduzierte Stress, sowie Oxidationen und hydrolytische Reaktionen führen dazu, das ASC als Antioxidans indirekt zu DHS umgesetzt wird. Außerdem sind die Transporter GLUT3 und SVCT₂, welche ASC in die Zelle transportieren, durch den Kobalt(II)- und Nickel(II)-Einsatz gehemmt. Dadurch wird ASC nicht aus dem Medium aufgenommen. TEMPO wurde als weitere ASC-Minimierungsbedingung getestet. TEMPO ist ein stabiles Radikal, das mit ASC sehr schnell zu TEMPOH reagieren, wodurch

Diskussion

ASC zu DHS wird [82]. Jedoch konnte ASC im Vergleich zur Kontrolle durch keine der genannten Bedingungen signifikant minimiert werden (Abbildung 35). Es konnte folglich keine Methode zur ASC-Minimierung etabliert und weiterverwendet werden.

Auffällig war die niedrige intrazelluläre ASC-Konzentration. Diese betrug 350 pmol/mg Protein, welches durch Umrechnung mit dem Zellfaktor 52 μM betrug ($6,7 \mu\text{L} = \text{mg Protein}$ [16]). Die Literaturwerte von 293 Zellen, welche 30 Minuten in einer 50 μM ASC-Aufnahmelösung inkubierten, liegen bei 502 pmol/ 10^6 -Zellen [133]. Als Negativkontrolle wurde eine natriumfreie Aufnahmelösung verwendet, wobei nach 30 Minuten nur 82 pmol/ 10^6 -Zellen ASC messbar waren. Das genaue Basislevel wurde zwar nicht beschrieben, aber eine Vergleichbarkeit kann trotzdem gelten. 10^7 -Zellen entsprechen annähernd 1 mg Protein [16]. Dies wurde in der Arbeitsgruppe Gründemann durch Zellzählungen im Vergleich zur gemessenen Proteinmengen bestimmt. Demnach sind 35 pmol/ 10^6 -Zellen mit 82 pmol/ 10^6 -Zellen aus der Literatur zu vergleichen. Beide Werte sind dabei sehr gering. Der ASC-Gehalt kann zwar nicht komplett ignoriert werden, jedoch ist die geringe Konzentration auf den in dieser Arbeit bezogenen Versuchsaufbau nicht von großer Bedeutung.

Im Vergleich zu ASC ($16 \cdot 10^7/\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) wird GSH ($0,3 \cdot 10^7/\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) als schwächerer $^1\text{O}_2$ -Quencher beschrieben [134]. Die hohe intrazellulären GSH-Konzentrationen von 5 bis 10 mM macht GSH zu einem nicht zu vernachlässigenden $^1\text{O}_2$ -Quencher [101]. Die intrazelluläre Minimierung von GSH wurde erfolgreich durchgeführt. Dazu wurden Buthioninsulfoximin (BSO) als Schlüsselenzyminhibitor der GSH-Synthese [104] und Diethylmaleat als Reaktant [105] mit GSH in verschiedenen Konzentrationen getestet. Die effizienteste GSH-Minimierung konnte mit der Kombination aus 50 μM BSO (24 Stunden Vorinkubation) und 5 mM DEM (30 Minuten Vorinkubation) erreicht werden. Hierbei ging nahezu 98% des intrazellulären GSH verloren oder wurden nicht gebildet (siehe 3.5.2). Dies ist eine sehr potente Methode, GSH intrazellulär zu reduzieren. Mit dieser Methode können Experimente zum Vergleich des intrazellulären Quenchverhaltens von ET und GSH durchgeführt werden.

Die erfolgreich etablierte GSH-Minimierungsmethode wurde verwendet, um erneut Versuche in 293 Zellen mit DHPNO₂ in ETT(+/-) Zellen zu untersuchen. Die Versuchsaufbauten waren, abgesehen von der GSH Minimierung, gleich den zuvor geschilderten DHPNO₂-Experimenten. Die Reproduzierbarkeit der Experimente war nicht gegeben.

Es konnte keine intrazelluläre MSR-Inhibition gezeigt oder die ASC-Konzentration minimiert werden. Die intrazelluläre GSH-Konzentration wurde sehr deutlich um 98% verringert. Diese Methode steht für weitere Experimente, die dem intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Vergleich von ET und GSH dienen, zur Verfügung. Die DHPNO₂-Experimente zeigten trotz dieser Methode keinen reproduzierbaren ET-Schutzeffekt in Bezug auf die MSO-Produktion.

4.4 Vergleich Ergothionein und Glutathion als intrazelluläre $^1\text{O}_2$ -Quencher

GSH zählt zu den wichtigsten Antioxidantien in der Zelle. Dabei ist GSH ubiquitär in den verschiedenen Zelltypen verbreitet und erreicht Konzentrationen von bis zu 10 mM [101]. In Erythrozyten kann die ET-Konzentration 0,1 bis 1 mM betragen [117]. Die ET-Konzentration unterliegt den herkömmlichen Antioxidantien um mindestens den Faktor 10. Es stellt sich also die Frage, welchen Vorteil ET gegenüber anderen Antioxidantien aufweist, dass es trotz der hohen Konzentration von GSH benötigt wird?

Die ersten Experimente mit den PST ReAsH, BR und TMPyP zeigten, dass ET hauptsächlich vor $^1\text{O}_2$ schützt. Nach Etablierung der Methode zur nahezu vollständigen GSH-Minimierung war es möglich, die ET und GSH quenchende Wirkung hauptsächlich gegenüber $^1\text{O}_2$ in Zellen getrennt voneinander zu untersuchen. Dafür wurde ein Zeitverlaufexperiment mit TMPyP-Belichtung als insbesondere $^1\text{O}_2$ -generierendes System angefertigt. Die 293 Zellen hatten durch unterschiedliche Vorbehandlungen verschiedene ETT(+/-) und GSH(+/-)-Konditionen.

Beeindruckenderweise zeigten ETT(+) Effektzellen geringere MSO-Konzentrationen als ETT(-) Effektzellen über die Zeit, unabhängig der intrazellulären GSH-Konzentration (Abbildung 38). In ETT(-)/GSH(+) Effektzellen kam es zu einem GSH-Schutzeffekt, wobei im Vergleich zu ETT(-)/GSH(-) Effektzellen weniger MSO gebildet wurde. Die ET-Anfangskonzentrationen in ETT(+)/GSH(+/-) Zellen waren gleich (Abbildung 40) und ET wurde über die Zeit nicht verbraucht (Abbildung 39). In ETT(+)/GSH(+) Zellen war die GSH-Konzentration geringer als in ETT(-)/GSH(+) Zellen (Abbildung 40). Dies lässt möglicherweise auf einen Effekt von ET auf GSH schließen. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Die geringere GSH-Konzentration in ETT(+) Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf den Ausgang des Experiments, weil dort ET für den maximalen Schutz sorgte.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass ETT(+) Effektzellen weder mit noch ohne GSH eine höhere MSO-Konzentration generierten. In dem vorliegenden experimentellen Aufbau war ausschließlich ET maßgebend für den größtmöglichen Schutz hauptsächlich vor $^1\text{O}_2$ in 293 Zellen und dabei wurde ET über die Zeit nicht verbraucht.

Rougee *et al.* beschrieben durch *in vitro* Versuche eine effektivere $^1\text{O}_2$ -Inaktivierung von ET gegenüber GSH [28]. Außerdem zeigten die Ergebnisse von Johanna Krüger, dass ET *in vitro* 20-fach stärker $^1\text{O}_2$ -quenched als GSH [29]. Die *in vitro* Beobachtungen unterstützen die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse, wobei ET in 293 Zellen besser vor $^1\text{O}_2$ (aber auch andere ROS) schützte als GSH. Solch ein physiologischer Vergleich von GSH und ET als $^1\text{O}_2$ -Quencher, wie er in dieser Arbeit stattgefunden hatte, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Eine Einschränkung dieses Systems ist zu beachten, denn die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse bezogen sich hauptsächlich auf $^1\text{O}_2$, aber bei der Verwendung von PST kann die Generierung von weiteren ROS nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte unter physiologischen Bedingungen ET als eindeutig effektiverer $^1\text{O}_2$ -Quencher im Vergleich zu GSH beschrieben werden. Dabei spielte die intrazelluläre GSH-Konzentration nur in ET-Abwesenheit eine Rolle.

4.5 Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Ergothionein und Hercynin *in vitro* und in 293 Zellen

Für die Interpretation und Begutachtung der Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen von $^1\text{O}_2$ mit ET und Hercynin (HER) sollten einige Grundlagen und Limitierungen vorab erwähnt werden:

1) DHPNO₂ zerfällt exponentiell über die Zeit in reaktiven $^1\text{O}_2$, unreaktiven $^3\text{O}_2$ und DHPN (siehe 1.3.2) [77]. Dabei beträgt die Halbwertszeit bei 37 °C 23 Minuten. Nach 76 Minuten ist die $^1\text{O}_2$ -Freisetzung auf 10% herabgesetzt, bezogen auf die initiale Freisetzung.

2) Die $^1\text{O}_2$ -Freisetzung aus DHPNO₂ geschieht thermolytisch, sodass Reaktionen nach dem Abstoppen bei Temperaturen über 4 °C noch stattfinden können. Dies ist der Fall, wenn bei einigen gefunden Molekülen Initialintensitäten beim 0 Minuten Zeitpunkt nachweisbar waren. Ein Beispiel hierfür war *m/z* 246:143 (siehe Abbildung 47). Ungekühlt durchläuft eine Probe die HPLC 15 Minuten lang. Bei einer Messung wurde der komplette Zeitverlauf einer Bedingung gemessen, d.h. von der 0 Minuten Probe bis zur letzten 81 Minuten Probe vergangen 6,5 Stunden im Autosampler bei 4°C bis die nächste Bedingung gemessen wurde.

Während der Messung beträgt die Säulentemperatur 35 °C. Auch wenn die Proben direkt nach dem Experiment im Autosampler bis zur Messung lagerten, konnten weitere Reaktionen oder Neubildungen der gefundenen Reaktionsprodukte beeinflusst worden sein.

3) Es konnten keine sehr reaktiven, instabilen Intermediate bestimmt werden. Die postulierten Strukturen der ET- und HER-Produkte basieren auf den Fragmentierungen, SRM- und akkurate Massemessungen. Für eindeutig definierte Strukturen der ET- und HER-Produkte wären NMR-Analysen notwendig. Eine NMR-Messung ist nicht realisierbar, weil für die Messung einige Milligramm des jeweiligen aufgereinigten Produkts nötig sind. Außerdem sind viele Produkte selbst bei einer Lagerung bei -20 °C instabil (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Reaktionsansätze direkt nach der Versuchsdurchführung per LC-MS/MS gemessen.

4) Ein Vergleich der Produktmenge zwischen den einzelnen Produkten auf der Basis der gemessenen SRM-Intensitäten ist nicht möglich, da die Effektivität der Fragmentierungen bei den verschiedenen Molekülen unterschiedlich ist. Die gefundenen ET- und HER-Produkte sind zum Teil noch nicht beschrieben und daher nicht käuflich erwerbbar, wodurch eine genaue Quantifizierung mittels Eichgeraden nicht durchgeführt werden konnte. Zum Vergleich der Produkte untereinander wurde die Fullscanintensitäten herangezogen. In dem Fullscanmodus sollte die Ionisierungseffizienz der gefundenen Moleküle am besten vergleichbar sein (Tabelle 23). Aber auch hier kann es zu Ungenauigkeiten kommen, da das Mutterion ohne spezifisches Fragment gemessen wird. Moleküle mit gleicher Masse und Retentionszeit, aber unterschiedlicher Struktur könnten eventuell nicht von dem gefundenen ET- oder HER-Produkt unterschieden werden. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da aufgrund der HPLC-Trennung selbst Konstitutionsisomere ein unterschiedliches Laufverhalten haben. Ein Fullscanpeak kann relativ genau einem Molekül zugeordnet werden, jedoch kann eine Molekülüberlagerung nicht komplett ausgeschlossen werden.

5) Die einzelnen Kurven aus den SRM-Analysen eines Diagramms (Bsp. Abbildung 50; m/z 262; H₂O, 5 und 25 mM TRIS) sind miteinander vergleichbar. Die Diagramme von verschiedenen Konditionen wie ASC (Bsp. m/z 262; Abbildung 52), GSH (Bsp. m/z 262; Abbildung 55) und TRIS (Bsp. m/z 262; Abbildung 50) sind nicht zwangsläufig vergleichbar. Dabei handelt es sich um unterschiedliche Messungen an unterschiedlichen Tagen mit jeweils neu angesetzten Chemikalien. Die Vergleichbarkeit kann anhand der H₂O-Proben in einem Diagramm begutachtet werden. Je mehr sich die Intensitäten der H₂O-Kurvenverläufe bei den

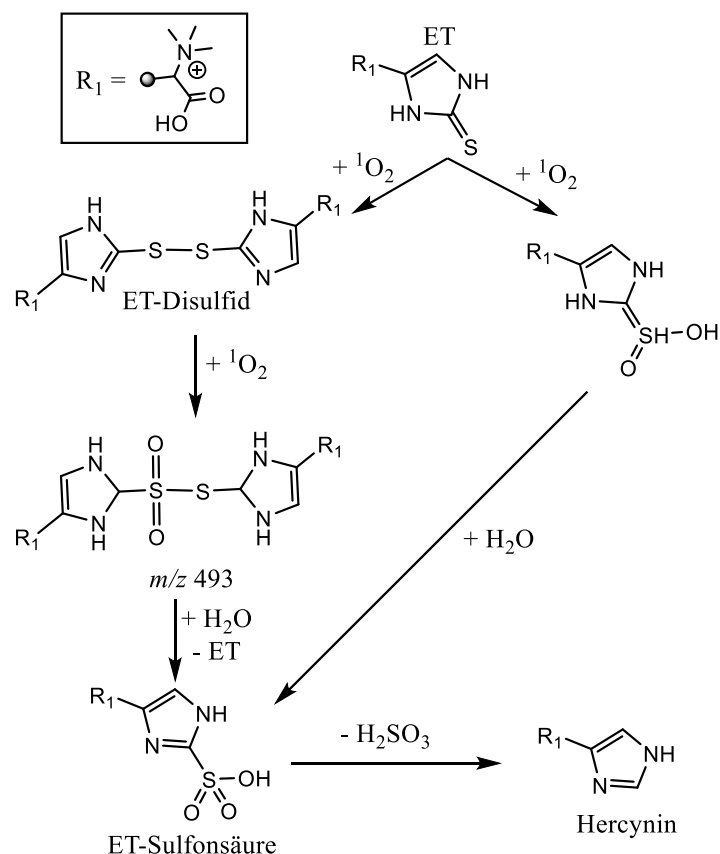
unterschiedlichen Diagrammen ähneln, desto vergleichbarer sind die gemessenen Intensitäten eines Produkts.

6) Alle identifizierten Moleküle sind auf die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER zurückzuführen. Dies wurde für jedes Molekül durch die DHPNO₂-Konzentrationsabhängigkeit mit 1 und 10 mM in den Reaktionsansätzen gezeigt. Zusätzlich wurden die Summenformeln der Moleküle (außer m/z 77 und 349) durch die akkurate Masse in Bezug zur exakten Masse bestätigt.

4.5.1 $^1\text{O}_2$ -Reaktion am Schwefel von Ergothionein

Einige in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse und gefundenen Moleküle waren bereits in der Literatur beschrieben. So zeigten Servillo *et al.* einen *in vitro* Reaktionsweg von ET oder dem ET-Disulfid mit verschiedenen reaktiven Spezies, wie Peroxynitrit, Hypochlorit, H₂O₂ mit und ohne Myoglobin [33]. Keine der untersuchten reaktiven Spezies beschrieb die Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET. Ihre Arbeit postulierte einen ET-Reaktionsweg von ET über das ET-Disulfid bis hin zum oxidierten ET-Disulfid, oder eine direkte Oxidation des ETs am Schwefel mit der Addition von bis zu 3 Sauerstoffen. Durch Zerfall einiger Intermediate konnten drei Teile ET wiedergewonnen werden und ein Teil Endprodukte, welche HER und Schweflige Säure waren (siehe 1.1.3). Dabei konnte ET, HER, ET-Disulfid und ET-Sulfonsäure massenspektrometrisch nachweisen werden. Die postulierten Zwischenprodukte konnten sie aufgrund der Instabilität nicht zeigen. Bemerkenswerterweise konnten die beschriebenen ET-Produkte HER (Abbildung 45), ET-Disulfid (Abbildung 44) und ET-Sulfonsäure (Abbildung 44) auch in dieser Arbeit mit $^1\text{O}_2$ und ET gefunden werden (Abbildung 42). Zusätzlich konnte mit der m/z 493 ein von Servillo *et al.* postuliertes, aber nicht nachgewiesenes ET-Produkt detektiert werden (Abbildung 44). Es handelt sich um das doppelt oxidierte ET-Disulfid. Alle diese Produkte waren $^1\text{O}_2$ -konzentrationsabhängig, wodurch die Entstehung aus der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET bewiesen war. Die Fullscanintensitäten zeigten relativ geringe Intensitäten im Vergleich zu anderen gefundenen Molekülen wie m/z 262. Daher kann dem beschriebenen Reaktionsweg über die Oxidation am Schwefel eine mindere Rolle zugesprochen werden (Reaktionsmechanismus 1). Unterstützt wird die Behauptung, dass es sich um eine Nebenreaktion handelt, durch das Experiment mit $^1\text{O}_2$ und ET in Gegenwart von ASC. ASC ist ein potenter $^1\text{O}_2$ -Quencher [134]. Dabei reagiert ASC mit $^1\text{O}_2$ zu DHS und H₂O₂ [54]. H₂O₂ kann dann, wie oben bereits beschrieben, mit ET über die Oxidation des Schwefels weiterreagieren. Das Zeitverlaufexperiment zeigte mit

1 und 5 mM ASC die höchste Intensität der ET-Sulfonsäure bei 0 Minuten und fiel dann über die Zeit ab (Abbildung 52). Dies spräche für eine schnelle Bildung der ET-Sulfonsäure mit anschließendem Zerfall. Beim Zerfall entstand wahrscheinlich HER, da auch erhöhte HER-Intensitäten initial in diesen Reaktionsansätzen nachgewiesen wurde (Abbildung 52). Das entstandene HER reagierte wahrscheinlich dann mit H_2O_2 zur m/z 214, da m/z 214 auch in den 5 mM ASC-Ansätzen Initialintensitäten zeigte (Abbildung 52). Aufgrund der bis zu 50-fach höheren ASC-Konzentration im Vergleich zu ET reagierte $^1\text{O}_2$ möglicherweise zuerst mit ASC, wodurch die sortenreine Analyse von $^1\text{O}_2$ nicht mehr gewährleistet war. Es kam wahrscheinlich zu einer Reaktion von ET mit H_2O_2 , welche von Servillo *et al.* beschrieben wurde [33]. Die Zeitverläufe des ET-Disulfids und oxidierte ET-Disulfids zeigten keine ASC-Abhängigkeit (Abbildung 52). Hier konnte nicht auf eine H_2O_2 -abhängige Reaktion geschlossen werden.



Reaktionsmechanismus 1: $^1\text{O}_2$ -Reaktion am Schwefel von ET. Dargestellt ist der postulierte Reaktionsmechanismus von $^1\text{O}_2$ am Schwefel von ET. Dabei reagiert ET zuerst zum ET-Disulfid und durch eine weitere Reaktion des ET-Disulfids mit $^1\text{O}_2$ zur m/z 493. Durch Addition von Wasser zerfällt die m/z 493 zu ET und ET-Sulfonsäure. ET-Sulfonsäure kann unter Abspaltung von Schwefliger Säure zu HER werden. Oder $^1\text{O}_2$ reagiert mit ET am Schwefel zur ET-Sulfinsäure (nicht detektiert). H_2O addiert sich an den Schwefel der ET-Sulfinsäure und wird zur ET-Sulfonsäure, welche daraufhin in Schweflige Säure und HER zerfällt.

4.5.2 Unterschiede in der $^1\text{O}_2$ -Reaktion mit Ergothionein und Hercynin

Zur Untersuchung von HER wurde dieses zuerst synthetisiert. Bei der HER-Synthese wurde eine Ausbeute von 21 mg HER bei Einsatz von 60 mg α -N,N-Dimethyl-L-Histidin erreicht. Die Reinheit wurde mit Hilfe der Massenspektroskopie überprüft. Neben HER, welches den Hauptbestandteil des Syntheseansatzes ausmachte, konnte ein Molekül m/z 212, das als 1-Methylhercynin postuliert wurde und m/z 196 nachgewiesen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um oxidiertes HER mit einer zusätzlichen Doppelbindung (Daten nicht gezeigt). 1-Methylhercynin-Produkte aus der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit 1-Methylhercynin wurden analog zu den HER-Produkten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dabei handelte es sich um m/z 262 (HER analog: m/z 248), m/z 260 (HER analog: m/z 246:229) und m/z 244 (HER analog: m/z 230:153). Diese Moleküle dienten einer zusätzlichen Bestätigung der gefunden HER-Reaktionsprodukte.

Die Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ (aus DHPNO₂) mit dem synthetisierten HER waren vergleichbar mit Reaktionsprodukten von $^1\text{O}_2$ (aus PST) mit Histidin, welche in der Literatur bereits beschrieben waren [135, 136]. HER und Histidin unterscheiden sich strukturell nur an der Trimethylammingruppe und die daraus resultierende Betain-Struktur (Abbildung 57). Der Imidazolring als $^1\text{O}_2$ -Angriffspunkt ist bei beiden Molekülen identisch. Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Histidin kommt es zu einer intramolekularen Umlagerung zu einem Lacton [45]. Dies ist durch die Trimethylammingruppe am HER nicht möglich, wodurch wahrscheinlich auch die Funktion dieser Gruppe bei ET erklärt werden kann.

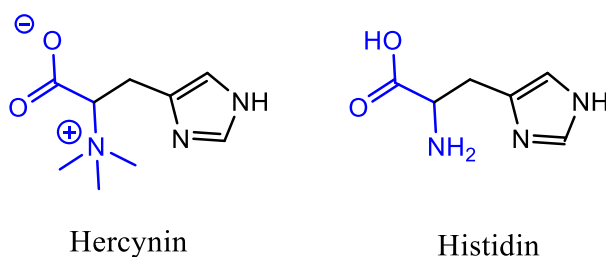


Abbildung 57: Strukturformel von Hercynin (links) und Histidin (rechts). In Blau ist der strukturelle Unterschied hervorgehoben. Beim Hercynin ist dies das Betainrückgrad.

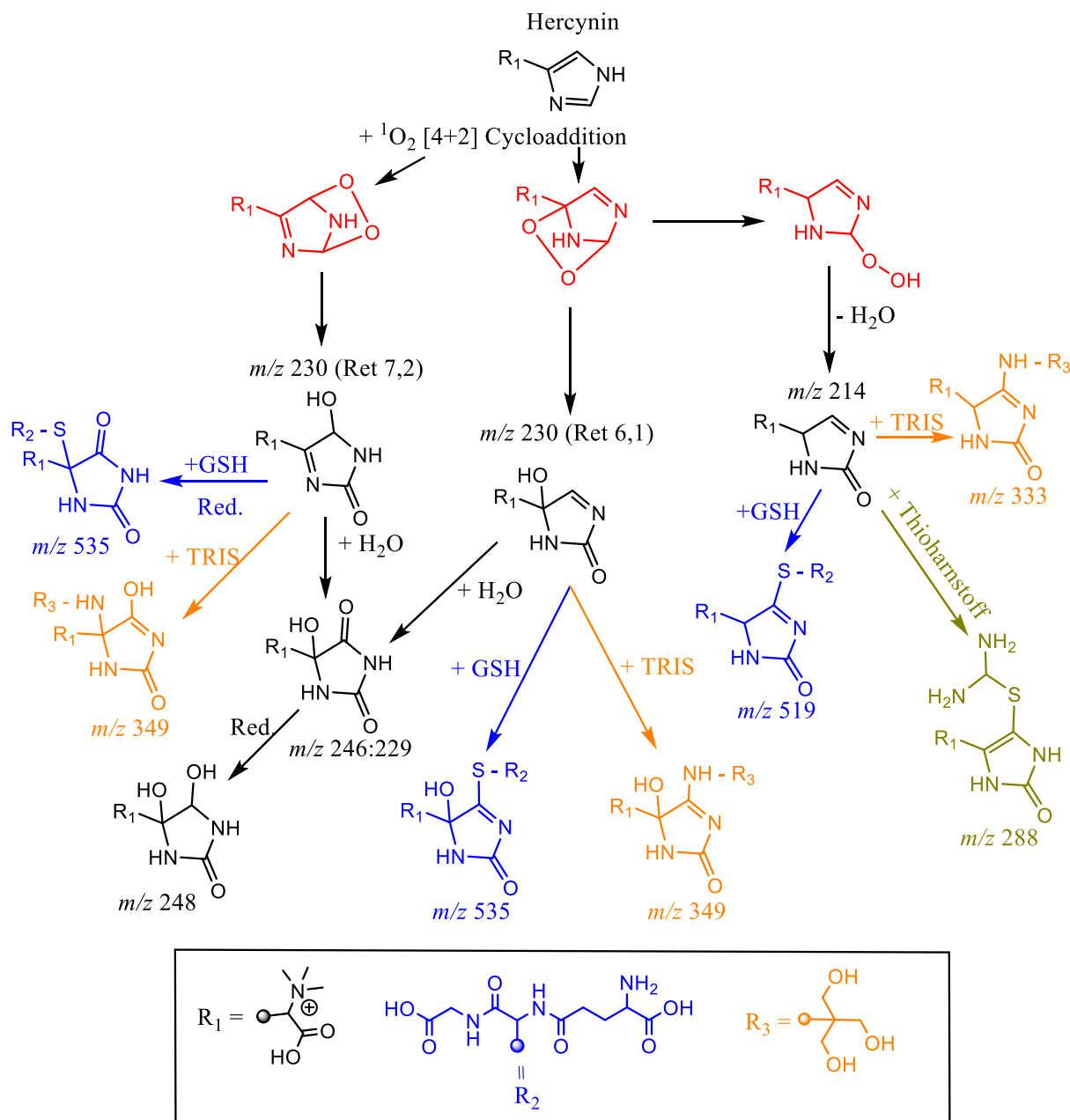
Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Histidin wurde ein Reaktionsweg über Hydroperoxide vorgeschlagen [135], der in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnten. Die verwendete Analysemethode zur Detektion der Hydroperoxide wurde mittels FOX-Assay [137] und nicht mit Hilfe massenspektrometrischer Fragmentierung durchgeführt.

Diskussion

Berechnungen wiesen die Instabilität des Imidazol-Hydroperoxids nach [138] und dieses ist wahrscheinlich nur dann nachweisbar, wenn es gezielt stabilisiert oder als Intermediat abgefangen wird. Die per LC-MS² generierten Fragmentmuster der einzelnen HER-Produkte konnten logisch erklärt und ohne Identifizierung eines Hydroperoxid-Mutterions in Zusammenhang gebracht werden.

Vermutlich reagierte ¹O₂ mit HER zunächst über eine [4+2] Cycloaddition an Position 2 und 4 oder 5 des Imidazolrings zu einem Endoperoxid-Intermediat (Reaktionsmechanismus 2) [74]. Durch Umlagerung könnte dieses Endoperoxid zu einem Hydroperoxid-Intermediat an Position 2 des Imidazolrings sowie durch H₂O Abspaltung zur *m/z* 214 reagieren, wie es für Histidin bereits beschrieben wurde [138]. Parallel könnte sich das Endoperoxid-Intermediat zu einer Carbonylgruppe an Position 2 und einer Hydroxygruppe an Position 4 oder 5 des Imidazolrings umlagern, welches dann wiederum die *m/z* 230 (Retentionszeit: 6,1 oder 7,2 Minuten) bilden könnte [45]. Durch einen nukleophilen Angriff von H₂O entsteht daraufhin *m/z* 246:229 (Abbildung 45), welches unter reduzierenden Bedingungen zu *m/z* 248 reagiert (Abbildung 45). Diese Reaktionswege wurden analog für Histidin beschrieben [45]. Die HER-Reaktionsprodukte *m/z* 214 und 230 könnten, statt durch einen nukleophilen Angriff von H₂O, auch mit den Nukleophilen GSH (Blau), TRIS (Orange) oder Thioharnstoff (Braun) weiterreagieren, wie es in dieser Arbeit postuliert wurde (Reaktionsmechanismus 2). Dies wird im Folgenden bei der Beschreibung der Reaktion von ¹O₂ mit ET vergleichend diskutiert.

Diskussion



Reaktionsmechanismus 2: HER-Reaktionsweg mit $^1\text{O}_2$ in H_2O , TRIS oder GSH. $^1\text{O}_2$ reagiert mit über eine [4+2] Cycloaddition an Position 2 und 4 oder 5 des Imidazolrings. Nach Umlagerung des Endoperoxids könnte ein Hydroperoxid an Position 2 des Imidazolrings entstehen, welches durch H_2O Abspaltung zur m/z 214 reagieren könnte. Daraufhin könnte ein nukleophiler Angriff von TRIS zur m/z 333, von GSH zur m/z 519 oder von Thiourea zur m/z 288 erfolgen. Bei der Parallelreaktion der [4+2] Cycloaddition könnte sich das Endoperoxid zu einer Carbonylgruppe an Position 2 und einer Hydroxygruppe an Position 4 oder 5 umlagern und wird dann zur m/z 230 (Retentionszeit: 6,1 oder 7,2 min). Die m/z 230 kann infolgedessen durch einen nukleophilen Angriff von H_2O zu m/z 246:229, von TRIS zu m/z 349 oder von GSH zu m/z 535 weiterreagieren. Durch Reduktion der m/z 246:229 wird aus dieser m/z 248.

Diskussion

Bei der *in vitro* Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET im Vergleich zu HER zeigten sich deutliche Unterschiede. Bei $^1\text{O}_2$ mit ET ergaben sich 3 Hauptprodukte: ET-Produkt m/z 264, m/z 262 und m/z 246:143 (Abbildung 44; Reaktionsmechanismus 3). Bei einem Vergleich der initialen Steigung war diese bei m/z 264 größer als bei m/z 262 (Abbildung 47). Die Fullscanintensität von m/z 262 bei 60 Minuten war 8-fach höher im Vergleich zu m/z 264 (Tabelle 23). Warum m/z 246:143 initial anstieg und dann wieder abfiel oder direkt mit einer erhöhten Intensität begann und dann konstant abfiel, konnte nicht eindeutig erklärt werden (Abbildung 50). Es könnte sich ähnlich wie bei ET-Disulfid verhalten (Abbildung 50), indem m/z 246:143 schnell mit $^1\text{O}_2$ gebildet wird und daraufhin schnell weiterreagiert. Eine m/z 246:143-Weiterreaktion könnte zum Beispiel mit einem Nukleophil wie H_2O erfolgen [135]. Dies würde den initialen Anstieg und danach das Absinken der Kurve beispielsweise in den H_2O -Zeitverläufen erklären (Abbildung 50). Zeitverläufe, bei denen eine erhöhte m/z -Initialintensität und anschließender Intensitätsreduktion über die Zeit gemessen wurden (Abbildung 52), können möglicherweise durch die Messdurchführung erklärt werden. Vermutlich würden die Zeitverläufe ähnlich dem biphasische Zeitverlauf aussehen, doch manche Proben wurden erst nach beispielsweise 6,5, 13, 19,5 oder 26 Stunden im Autosampler gemessen. Deswegen konnte der Intensitätsanstieg vermutlich nicht mehr beobachtet werden. Die dargestellte Kurve stellte nur noch den Reaktionsverlauf über die Zeit nach dem Erreichen des Maximums dar. Jener deutete auf eine schnelle m/z 246:143-Bildung hin, wobei das Molekül schnell weiterreagierte.

Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Histidin und H_2O kann auch TRIS statt H_2O als Nukleophil fungieren [135]. TRIS reagiert als einfaches Amin-Nukleophil durch Addition am Imidazolring zu einem Imin-Intermediat [136]. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 und 37°C liegen 25 mM TRIS als 8,1 mM freies ungeladenes TRIS vor (pK_s $37^\circ\text{C} = 7,71$ [139]). Dieses kann mit Intermediaten reagieren. In den Ansätzen mit $^1\text{O}_2$ und ET in TRIS traten zwei TRIS-Produkte in den Vordergrund: m/z 365:230 und m/z 365:244 (Abbildung 48). Die m/z 365:244-Produktion wurde in Reaktionsansätzen mit $^1\text{O}_2$, ET und TRIS durch eine steigende GSH-Konzentrationen inhibiert (Abbildung 51, A), die GSH-Konzentration nahm hingegen keinen Einfluss auf m/z 365:230 (Abbildung 51, B). Dieser auffällige Unterschied ließe sich vermutlich auf zwei Hydroperoxid-Isomere zurückführen, die bei der Reaktion als Hydroperoxid-Intermediate an Position 4 oder 5 des Imidazolrings auftreten könnten. Das Reaktionsprodukt mit Hydroperoxid an Position 5 des Imidazolrings besäße ein geminales Proton (Abbildung 48). Dabei bedeutet geminal, dass sich zwei gleichartige Substituenten, in diesem Fall Protonen an einem Kohlenstoff-Atom

Diskussion

befinden. Diese Protonen erlauben eine intramolekulare H₂O-Elimination [140]. Möglicherweise entstand dadurch das Intermediat m/z 244, welches daraufhin mit TRIS oder GSH zum Imin am Imidazolring weiterregierte. Das Molekül mit dem Hydroperoxid an Position 4 hat kein geminales Proton, weshalb dort keine H₂O-Elimination stattfindet.

Bei der m/z 365:230-Fragmentierung entstand ET als Fragment mit der höchsten Intensität (Abbildung 48), welches bei m/z 365:244 nicht zu finden war. Dies wurde durch Messungen mit Hilfe der MS-Ionenfalle bestätigt (siehe 2.11.7). Möglicherweise verlässt eine C-Nitrosogruppe während der Fragmentierung m/z 365:230, wodurch es zur ET-Regeneration kommt. Die Erhöhung der TRIS-Konzentration von 5 auf 25 mM führte zu einer höheren m/z 365:244-Intensität, wobei unklar ist, warum m/z 365:230 bei 25 mM TRIS nicht detektiert wurde. Wahrscheinlich begünstigt TRIS in erhöhten Konzentrationen die Bildung des Konstitutionsisomers m/z 365:244. Diese Behauptung wurde durch die SRM-Messung unterstützt (Abbildung 50). Ein Vergleich von m/z 365:230 mit m/z 365:244 bei verschiedenen TRIS- und GSH-Konzentrationen zeigte mehr m/z 365:244-Intensität bei 25 mM TRIS unter jeglichen GSH-Konzentrationen (Abbildung 50, B). Allerdings konnte der zugrundeliegende molekulare Mechanismus nicht aufgeklärt und keine Literaturhinweise gefunden werden.

Der Einfluss von 25 mM TRIS auf die m/z 246:143 und 264-Generierung im ET-Ansatz war erheblich (Abbildung 50). Beide ET-Produkte wurden inhibiert. Dabei folgten wahrscheinlich beide Moleküle dem Reaktionsweg über das postulierte Intermediat m/z 244. Dieses Intermediat reagierte infolgedessen mit TRIS zu m/z 365:244. Ohne TRIS könnte m/z 244 durch eine Reduktion von ET oder GSH direkt in m/z 246:143 überführt werden. Bei der Reduktion durch ET oder GSH würden diese entweder zu ET-Disulfid oder GSH-Disulfid oxidiert. Indirekt könnte eine zusätzliche H₂O-Addition an m/z 246:143 zum Reaktionsprodukt m/z 264 führen. Dieses war jedoch vermutlich nicht der Hauptreaktionsweg der m/z 264-Bildung, sondern die Reduktion der m/z 262 zu m/z 264 (Reaktionsmechanismus 3).

Beindruckenderweise hatte TRIS meist keinen inhibierenden Effekt auf die m/z 262-Produktion (Abbildung 50). Diese Generierung verlief daher vermutlich nicht über das m/z 244-Intermediat und involvierte keinen zusätzlichen nukleophilen Angriff, wie eine Addition von H₂O oder TRIS zum Imin. Möglicherweise reagierten beide Sauerstoffe aus ¹O₂ initial mit dem Imidazolring an Position 4 und 5 des ETs. Dabei entstand wahrscheinlich zunächst ein Dioxetan-Intermediat durch eine [2+2] Cycloaddition, das dann durch

Diskussion

intramolekulare Umlagerung zum Produkt m/z 262 wurde. Anders verhielt es sich bei den HER-Ansätze mit $^1\text{O}_2$ in 25 mM TRIS. Hier kam es zu einer stark verminderten Produktion aller Produkte durch 25 mM TRIS (Abbildung 49). Es gab keinen TRIS resistenten Reaktionsweg, wie es beim ET der Fall war.

TRIS und GSH sind beides gute Nukleophile, aber im Vergleich zum TRIS ist GSH zusätzlich noch ein effektives Reduktionsmittel. 25 mM TRIS hatten keinen Effekt auf die Bildung von ET-Disulfid (Abbildung 50), aber wie in der Literatur beschrieben, inhibierte eine geringe Menge GSH (0,1 mM) die Generierung von ET-Disulfid vollständig (Abbildung 55) [141]. In Zellexperimenten ist der Reaktionsweg über das ET-Disulfid zu vernachlässigen, da Zellen eine GSH Konzentration von 5 - 10 mM GSH aufweisen [101].

Da GSH sowohl ein Nukleophil als auch ein Reduktionsmittel ist, sind die ET-Produkte von $^1\text{O}_2$ mit ET in Gegenwart von GSH komplexer, verglichen mit den Reaktionen in TRIS.

Besonders auffällig war, dass das ET-Produkt m/z 262 ab 1 mM GSH vollständig verschwunden war (Abbildung 55). Dahingegen wurde die m/z 264-Intensität im Vergleich zu H_2O bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM GSH erhöht und behielt die erhöhte Intensität auch noch bei 5 mM GSH bei (Abbildung 55). Da m/z 262 bei 25 mM TRIS in den meist Ansätzen stabil war (Abbildung 50), jedoch in Anwesenheit von GSH sank (Abbildung 55), schien m/z 262 oder das ET-Dioxetan durch GSH reduziert zu werden und das ET-Produkt m/z 264 zu bilden. Dies ist wahrscheinlich der Hauptreaktionsweg zur m/z 264. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Dioxetan von GSH reduziert wurde und dieser Reaktionsweg dann nicht über m/z 262 verlief, sondern dass m/z 264 über ein Vorläufer-Intermediat gebildet wurde. Diese Unterscheidung konnte jedoch nicht sicher validiert werden, da die verwendeten Methoden nur in der Lage waren, Endprodukte zu detektieren und keine Intermediate aufzuzeigen.

GSH besitzt nicht nur reduzierende Eigenschaften, sondern reagiert auch als Nukleophil mit ET-Produkten aus der Reaktion von $^1\text{O}_2$ und ET. Durch den nukleophilen Angriff von GSH konnten die Moleküle m/z 551 und 553 erklärt werden (Abbildung 53). Diese entstanden nur in Gegenwart von GSH (Abbildung 55). Der Zeitverlauf zeigte eine schnelle Bildung der Moleküle m/z 551 und 553, welche über die Zeit allerdings wieder an Intensität verloren. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zum TRIS-Produkt m/z 365, welches nach seiner Bildung stabil blieb (Abbildung 50). Das unterschiedliche Verhalten von den GSH-Produkten im Vergleich zu den TRIS-Produkten über die Zeit, lässt auf eine schnelle Weiterreaktion der

Diskussion

GSH-Produkten bei sinkender $^1\text{O}_2$ -Belastung schließen. Die sinkende $^1\text{O}_2$ -Belastung ist durch die Halbwertszeit von DHPNO₂ (23 Minuten) zu erklären, wobei nach 76 Minuten nur noch 10% $^1\text{O}_2$ freigesetzt werden [77].

Bei 0,1 mM GSH war die Produktion von m/z 551 höher und von m/z 246:143 niedriger (Abbildung 55). Dies legte nahe, dass das Intermediate m/z 244 mit GSH über einen nukleophilen Angriff reagierte und nicht über die reduzierende Reaktion von GSH. Eine weitere Steigerung der GSH-Konzentration schwächte die m/z 551-Produktion ab, aber steigerte die m/z 246:143-Produktion, wobei hier vermutlich die reduzierende GSH-Reaktion im Vordergrund stand. Die m/z 553-Intensität war am höchsten bei der Hinzugabe von 1 mM GSH. Beim Einsatz von 5 mM GSH wies der Ansatz einen niedrigeren m/z 553 Gehalt auf als bei 1 mM GSH (Abbildung 55). Die insgesamt niedrigere Akkumulation von GSH-Produkten (m/z 551 und 553) im Vergleich zu den TRIS-Produkten (m/z 365:230 und 365:244) bezogen auf der Fullscanintensität (Tabelle 23) legte einen schnellen Zerfall der ET- $^1\text{O}_2$ -GSH-Produkte nahe. Dabei schien 5 mM GSH überwiegend als Reduktionsmittel des Iminadditionsschritts von $^1\text{O}_2$ zu wirken. Wahrscheinlich reduzierte GSH das gebildete ET-Dioxetan und führte so zur Bildung von m/z 264.

Bemerkenswerterweise blieb das ET-Level in dem 5 mM GSH-Ansatz weitgehend stabil (Abbildung 55), wohingegen es bei 25 mM TRIS über die Zeit abnahm (Abbildung 50). Möglicherweise inhibierte GSH den Hauptprozess, der den ET-Verlust in H₂O verursachte. Es ist jedoch auch möglich, dass GSH einen reduzierenden Reaktionsweg für die Regeneration von ET eröffnete, welcher mit TRIS nicht möglich war. In allen Ansätzen mit ET und $^1\text{O}_2$ unter den verschiedenen TRIS- sowie GSH-Bedingungen war die HER-Produktion unvermindert (Abbildung 50, Abbildung 55).

In den Ansätzen mit $^1\text{O}_2$, in denen HER als Ausgangssubstrat für $^1\text{O}_2$ verwendet und 1 mM GSH hinzugegeben wurde, kam es über die Zeit zu einem abgeschwächten HER-Verbrauch (Abbildung 54). Dies passte zu den entstandenen HER-Produkt-Intensitäten, da die Produktion von m/z 248 und 230:153 nahezu vollständig und die von m/z 246:229 bei einem Einsatz von 1 mM GSH stark inhibiert war (Abbildung 54). Die Entstehung aller HER-Produkte war durch GSH negativ beeinflusst, wohingegen das ET-Produkt m/z 264 in 1 mM GSH über die Zeit stetig zunahm. Dieser beeindruckende Unterschied hebt die Affinität von $^1\text{O}_2$ zu ET hervor. Die Thiolgruppe von GSH ist selbst Angriffspunkt von $^1\text{O}_2$ [142] und dennoch kann ein 50-facher Überschuss von GSH (5 mM) gegenüber ET (0,1 mM) die m/z 264-Produktion nicht inhibieren (Abbildung 55). Zusammenfassend lässt sich also

Diskussion

erkennen, dass $^1\text{O}_2$ eindeutig ET vor GSH bei der initialen Reaktion favorisiert und das um einen Faktor von mindestens 50.

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Molekül im Reaktionsansatz mit $^1\text{O}_2$ und ET war Thioharnstoff (m/z 77; Abbildung 46). Bei der Generierung handelte es sich um eine kleinere Nebenreaktion, wobei nicht viel Thioharnstoff gebildet wurde (Tabelle 23, Fullscanintensität). Jedoch wurden die verschiedenen Eigenschaften von ET und HER bestätigt. So reagierte der Thioharnstoff direkt mit dem HER-Produkt m/z 214 zu einem stabilen, aromatischen m/z 288-Molekül (Abbildung 46). ET-Produkte mit Thioharnstoff wurden nicht gefunden. Wahrscheinlich zeigte dies den geringen Abbau von ET-Intermediaten zu Thioharnstoff, welcher danach als Nukleophil mit HER-Produkten, nicht aber mit ET-Produkten weiterreagieren konnte. Bei der Thioharnstoff-Reaktion war vor allem der Schwefel von entscheidender Bedeutung. Harnstoff generierte keine Reaktionsprodukte mit $^1\text{O}_2$ und HER oder $^1\text{O}_2$ und ET.

Die identifizierten ET-Produkte aus der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET in den verschiedenen H_2O , ASC-, GSH- und TRIS-Konzentrationen führte unter den zuvor beschriebenen Beobachtungen zu dem im Folgenden zusammengefassten Reaktionsmechanismus 3.

Nachdem die *in vitro* identifizierten Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ mit ET und HER möglichen Strukturen und Reaktionswegen zugeordnet wurden, fand ein Einblick in 293 Zellen statt. Dazu wurden die Zellen wie im ET- und GSH-Quenchvergleich behandelt und mittels LC-MS/MS gemessen (siehe 3.7). GSH wurde intrazellulär minimiert um einen möglichen GSH-Einfluss auf die Produktbildung von $^1\text{O}_2$ mit ET in Zellen zu untersuchen. TMPyP wurde zur $^1\text{O}_2$ -Generierung verwendet, wobei PST nicht nur $^1\text{O}_2$, sondern auch andere ROS produzieren können (Abbildung 9). Bei den Experimenten konnte kein ET-Verlust über die Belichtungszeit dokumentiert werden (Abbildung 56). Bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ in ETT(+) Effektzellen konnten die ET-Produkte m/z 264, 278 und 493, sowie HER und m/z 248 mit steigender Intensität über die Zeit ohne GSH-Einfluss nachgewiesen werden. Eine GSH-Abhängigkeit wurde für die Moleküle ET-Disulfid, Thioharnstoff, m/z 246:143, 262 und die HER-Produkte m/z 246:229 und 288 gezeigt. Dabei war die Intensität der Moleküle in GSH(+) Effektzellen niedriger als in GSH(-) Effektzellen. Diese GSH-Abhängigkeit bestätigte die *in vitro* beobachteten Sachverhalte für die gefunden ET-Produkte. Gleichzeitig wurden die ET-Produkte m/z 551 und 553 nur in GSH(+) Effektzellen beobachtet, was deren Verbindung aus ET- $^1\text{O}_2$ -GSH bewies (Abbildung 56). Die anderen *in vitro* detektierten HER-Produkte m/z 519 und 535 konnten nicht in Zellen gezeigt werden und sind deshalb untergeordnete *in vitro* Nebenprodukte der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET. Alle intrazellulär nachgewiesenen ET-Produkte hatten geringe Intensitäten. Aufgrund der verschiedenen Ionisierungseffizienzen, konnten diese Moleküle nicht verglichen werden. ET-Produkte, die in den Kontrollzellen ohne TMPyP-Behandlung detektiert wurden, waren Hintergrundreaktionen von intrazellulär vorkommenden PST, wie zum Beispiel NADH und NADPH [143]. Wenn die Kontrollzellen ohne Belichtung ET-Reaktionsprodukte aufwiesen, lag dies wahrscheinlich an unbeabsichtigter Belichtung des möglichst dunkel gehaltenen Raums. Jedoch wiesen die Kontrollzellen in keinem Fall höhere ET-Produktintensitäten auf als Effektzellen. Dies ließ auf eine spezifische Generierung der ET-Produkte nach TMPyP-Belichtung in Zellen schließen.

Zusammenfassend zeigten die *in vitro* erhobenen Daten von $^1\text{O}_2$ mit ET sehr unterschiedliche Reaktivitäten und Reaktionswege gegenüber $^1\text{O}_2$ mit HER. Der Imidazolring von HER reagiert mit $^1\text{O}_2$, wie schon für den Imidazolring von Histidin beschrieben [45], über eine initiale [4+2] Cycloaddition (siehe 1.2.1). Diesen Reaktionsweg kann ET aufgrund des doppelt gebundenen Schwefels an Position 2 des Imidazolrings nicht beschreiten. Es wird kein Endoperoxid gebildet. Wahrscheinlich kommt es bei der Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit ET durch eine [2+2] Cycloaddition zu einem 4,5-Dioxetan-Intermediat, welches nicht nachgewiesen

Diskussion

werden konnte. Für dieses Intermediat gibt es jedoch Hinweise in der Literatur [53, 144]. Parallel reagiert ET mittels Schenk-En-Reaktion entweder zu einem Hydroperoxid an Position 4 oder 5 des Imidazolrings (Reaktionsmechanismus 3) [51]. Die für Histidin beschriebene intramolekulare Umlagerung der Aminogruppe des Molekülrückgrats zum Lacton ist aufgrund der dreifachen Methylierung von ET nicht möglich [135].

Die strukturellen und chemischen Unterschiede der ET-Produkte im Vergleich zu den HER-Produkten wurden mit TRIS gezeigt werden. Dabei wiesen die HER-Produkt m/z 333 und 349, die mit TRIS reagierten, ein stabiles aromatisches Ringsystem auf, welches bei Fragmentierungen nicht zerfiel (Abbildung 48). Dahingegen zerfielen die ET-TRIS-Produkte m/z 365:230 und 365:244 bei der Fragmentierung leichter auseinander. Bei den dabei entstehenden Fragmenten handelte es sich vermutlich um stabile, aromatische Verbindungen, wie ET (Abbildung 43). Möglicherweise war die Fragmentierung von m/z 365:230 ein Hinweis auf einen ET-Regenerationsmechanismus, nachdem $^1\text{O}_2$ mit ET und einem Nukleophil reagiert hat.

Intrazellulär wurde nach $^1\text{O}_2$ -Stress (durch TMPyP-Belichtung) kein ET-Verlust festgestellt und es konnte nur geringe Intensitäten von ET- oder HER-Produkten nachgewiesen werden (Abbildung 56). Dabei waren einige ET-Produkte GSH-abhängig. Aufgrund der hohen intrazellulären GSH-Konzentrationen (bis zu 10 mM [101]) eignet sich GSH als guter Regenerationspartner, um Intermediate abzufangen und ein Zerfallen der ET- $^1\text{O}_2$ -GSH-Produkte m/z 551 und 553 zu ET voranzutreiben.

4.6 Ausblick

Mit Hilfe der durchgeführten *in vitro* Reaktionen von $^1\text{O}_2$ mit ET und HER konnten einige bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit unbekannte Reaktionsprodukte identifiziert werden. Nach Lagerung der Proben bei -20 °C gefolgt von einer verspäteten Messung nach einer Woche, anstatt der sofortigen Messung, waren einige Signale verschwunden oder die Intensitäten der Moleküle verändert. Dieses Phänomen bietet geeignete Anknüpfungspunkte für weiterführende Forschungsvorhaben zur genaueren Aufklärung der Reaktionsmechanismen von $^1\text{O}_2$ mit ET oder HER. Dabei könnte beispielsweise Stabilität, Reaktivität und Neubildung der Produkte über die Zeit im Fokus stehen.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente konnte die Blockadefunktion an Position 2 des Imidazolrings des ET-Schwefels wahrscheinlich nachgewiesen werden. Diese Funktion ist charakteristisch für jenes Molekül und stellt seine möglicherweise einzigartige Eigenschaft dar. Durch die Blockade reagiert $^1\text{O}_2$ über eine [2+2] Cycloaddition an Position 4 und 5 des ETs. Weiterhin könnte durch die Verwendung von S-Methylergothionein (Methylgruppe am Schwefel von ET) die Funktion des Schwefels in Bezug zu $^1\text{O}_2$ weiter untersucht werden. Um die Rolle der Trimethylaminygruppe des ETs zu charakterisieren wäre auch ein L-2-Thiohistidin-Einsatz (Histidin mit Schwefel an Position 2 des Imidazolrings) in der Reaktion mit $^1\text{O}_2$ möglich. Zum jetzigen Kenntnisstand ist die Trimethylaminygruppe für die Unterdrückung der Lacton-Bildung verantwortlich, welches noch experimentell zu überprüfen ist.

Des Weiteren könnte die Einzigartigkeit der Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ mit ET überprüft werden. Hierzu würden andere ROS, wie Hydroxyl-Radikale, H_2O_2 oder Superoxidation, *in vitro* mit ET inkubiert und anschließend analysiert.

Trotz der umfassenden Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente bezüglich des Reaktionsmechanismus von $^1\text{O}_2$ mit ET, konnte lediglich ein kurzer Einblick in die Zelle bezüglich der gefundenen ET-Produkte geboten werden. Diese gilt es in der Zukunft weiter zu charakterisieren, um herauszufinden, ob noch weitere stabilere Intermediate entstehen. Außerdem wurde beobachtet, dass bei der Verwendung von TMPyP bei gleichzeitiger Belichtung kein ET verbraucht wurde. Dies weist auf eine ET-Regeneration hin, welche auch in dieser Arbeit postuliert wurde. Es bedarf weiterer Untersuchungen mit dem Fokus auf den genauen intrazellulären Vorgängen. Möglicherweise können einige ET-Intermediate bei tiefen Temperaturen festgehalten werden, um einen Regenerationsmechanismus nachzuweisen und dokumentieren zu können.

5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Photosensibilisatoren (PST) ReAsH, Bengal Rosa und TMPyP konnte eindeutig die Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)-schützende Wirkung von Ergothionein (ET) in 293 Zellen gezeigt werden. Dabei entstand bis zu 58% weniger Methionin-Sulfoxid (MSO) in Zellen mit ET, welches mittels Massenspektrometrie gemessen wurde. MSO ist ein Indikatormolekül für reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die gewählten PST generieren hauptsächlich $^1\text{O}_2$, aber auch andere ROS, wie Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid oder Superoxidation. Deswegen kann nicht geschlussfolgert werden, dass ET spezifisch vor $^1\text{O}_2$ schützt. Um dies zu untersuchen wurden Experimente mit dem $^1\text{O}_2$ -generierenden Endoperoxid, DHPNO₂, durchgeführt. Diese waren nicht reproduzierbar. Der Versuch $^1\text{O}_2$ -Spezifität in das PST-System mit TEMPO als selektiven $^1\text{O}_2$ -Indikator zu bringen, konnte nicht erbracht werden. Bemühungen, das DHPNO₂-System durch Hintergrundminimierung reproduzierbarer zu gestalten, schlugen fehl. Hierfür wurde versucht die Antioxidantien Ascorbinsäure und Glutathion (GSH) zu minimieren. Für GSH war dies eindrucksvoll gelungen. Intrazelluläres GSH konnte zu 98% minimiert werden. Durch die Methode der intrazellulären GSH-Minimierung konnte ein Vergleich des $^1\text{O}_2$ -Quenchverhaltens von ET und GSH in 293 Zellen durchgeführt werden. Dabei schützt ET eindeutig besser vor $^1\text{O}_2$ -Stress als GSH. Beeindruckender ist sogar, dass in Zellen mit ET die Anwesenheit von GSH keinen weiteren Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ hervorbrachte. Erst in Abwesenheit von ET zeigt sich ein $^1\text{O}_2$ -Schutzeffekt von GSH.

Nachdem der ET-Schutzeffekt gegenüber $^1\text{O}_2$ intrazellulär gezeigt wurde, schlossen massenspektrometrische *in vitro* Untersuchung zum Reaktionsmechanismus an. Dafür wurde $^1\text{O}_2$ mit ET und Hercynin (HER; ET ohne Schwefel) analysiert. Dabei zeigten sich fundamentale Unterschiede. Während HER und anderen Imidazole über eine [4+2] Cycloaddition reagieren, kann ET, wegen des doppelt gebundenen Schwefels, diesen Weg nicht bestreiten. ET reagiert über [2+2] Cycloaddition zum Intermediat 4,5-Dioxetan und über Schenck-En-Reaktion zu Hydroperoxiden an Position 4 oder 5 des Imidazolrings. Die Generierung der ET spezifischen Produkte war resistent gegenüber einem großen Überschuss an TRIS und GSH, aber nicht die von HER. ET favorisiert $^1\text{O}_2$ mindestens 50-fach mehr als GSH und mindestens 250-fach mehr als TRIS für die initiale Reaktion. Der Verlust von ET war nahe vollständig unterdrückt in 5 mM GSH, aber nicht in 25 mM TRIS. Angerfertigte Fragmentierungsmuster geben Hinweise auf einen Regenerationsmechanismus, da einige ET-Produkte leicht zerfallen und zu stabilen Aromaten werden

6 Abstract

Experiments with the photosensitizers (PST) ReAsH, Bengal Rosa and TMPyP clearly demonstrated that ergothioneine (ET) in 293 cells protect against singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) stress. This resulted in up to 58% less methionine sulfoxide (MSO) in cells with ET measured via mass spectrometry (MS). MSO is an indicator molecule for reactive oxygen species (ROS). The selected PST mainly generate $^1\text{O}_2$, but also other ROS, such as hydroxyl radicals, hydrogen peroxide or superoxide anion. Therefore, it cannot be ruled out that ET is only responsible for the protection against $^1\text{O}_2$. Thus, experiments were carried out with the endoperoxide, DHPNO₂, which specifically generates $^1\text{O}_2$. These results were not reproducible. Furthermore, it could not be achieved to generate $^1\text{O}_2$ -specificity with the $^1\text{O}_2$ indicator TEMPO. TEMP is oxidized merely by $^1\text{O}_2$ to TEMPO. Efforts to make the DHPNO₂ system more reproducible through background minimization of $^1\text{O}_2$ quenchers have failed. An attempt was made to minimize the antioxidants ascorbic acid and glutathione (GSH). For GSH this was impressively successful. Intracellular GSH could be minimized to 98%. The method of intracellular GSH minimization allowed a comparison of the $^1\text{O}_2$ quench behavior of ET and GSH in 293 cells. ET is a more effective $^1\text{O}_2$ quencher than GSH, which is shown by cells with ET and GSH, whereby no further protection against $^1\text{O}_2$ was observed in comparison to cells without GSH. Only in the absence of ET GSH has a $^1\text{O}_2$ protective effect.

After the ET protection effect against $^1\text{O}_2$ was shown intracellular, *in vitro* experiments were performed to analyze the reaction mechanism of ET with $^1\text{O}_2$ via MS. Therefore, $^1\text{O}_2$ was tested with ET and hercynine (HER; ET without sulfur). The results show fundamental differences between ET and HER. While HER and other imidazoles react via a [4 + 2] cycloaddition, ET cannot use this pathway because of its double-bonded sulfur. ET possibly reacts to the intermediate 4,5 dioxetane via [2 + 2] cycloaddition or via Schenck-ene-reaction to a hydroperoxide at position 4 or 5 of the imidazole ring. The generation of ET-specific products is resistant to a large excess of TRIS and GSH, but the hercynine products are not. ET favors $^1\text{O}_2$ at least 50 fold more than GSH and at least 250 fold more than TRIS for the initial reaction. The loss of ET was nearly completely suppressed in 5 mM GSH but not in 25 mM TRIS. Prepared fragmentation patterns indicate a regeneration mechanism, as some ET products readily disintegrate and become stable aromates.

7 Literaturverzeichnis

1. Tanret, C., *Sur une base nouvelle retirée du seigle ergoté, l'ergothioneine*. Compt Rendu, 1909. 149: p. 222 - 224.
2. Paul, B.D. and Snyder, S.H., *The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant*. Cell Death and Differentiation, 2010. 17(7): p. 1134-1140.
3. Grundemann, D., *The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity--a review*. Prev Med, 2012. 54 Suppl: p. S71-4.
4. Cheah, I.K. and Halliwell, B., *Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1822(5): p. 784-93.
5. Hartman, P.E., *Ergothioneine as antioxidant*. Methods in Enzymology, 1990. 186: p. 310-318.
6. Misra, H.P., *Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols*. J Biol Chem, 1974. 249(7): p. 2151-5.
7. Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G.L., Hochstein, P. and Cadenas, E., *Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid*. Arch Biochem Biophys, 1992. 294(2): p. 398-402.
8. Misiti, F., Castagnola, M., Zuppi, C., Giardina, B. and Messana, I., *Role of ergothioneine on S-nitrosoglutathione catabolism*. Biochem J, 2001. 356(Pt 3): p. 799-804.
9. Melville, D.B., *Ergothioneine*. Vitam. Horm., 1958. 7: p. 155 - 204.
10. Kalaras, M.D., Richie, J.P., Calcagnotto, A. and Beelman, R.B., *Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione*. Food Chem, 2017. 233: p. 429-433.
11. Pfeiffer, C., Bauer, T., Surek, B., Schömig, E. and Gründemann, D., *Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine*. Food Chemistry, 2011. 129(4): p. 1766-1769.
12. Seebeck, F.P., *In vitro reconstitution of Mycobacterial ergothioneine biosynthesis*. J Am Chem Soc, 2010. 132(19): p. 6632-3.
13. Melville, D.B., Horner, W.H. and Lubschez, R., *Tissue ergothioneine*. J Biol Chem, 1954. 206(1): p. 221-228.
14. Salt, H.B., *The ergothioneine content of the blood in health and disease*. Biochemical Journal, 1931. 25(5): p. 1712.
15. Leone, E. and Mann, T., *Ergothioneine in the seminal vesicle secretion*. Nature, 1951. 168(4266): p. 205-6.

Literaturverzeichnis

16. Grundemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A. and Schomig, E., *Discovery of the ergothioneine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 5256-61.
17. Pfeiffer, C., Bach, M., Bauer, T., da Ponte, J.C., Schömig, E. and Gründemann, D., *Knockout of the ergothioneine transporter ETT in zebrafish results in increased 8-oxoguanine levels*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. 83: p. 178-185.
18. Nikodemus, D., Lazic, D., Bach, M., Bauer, T., Pfeiffer, C., Wiltzer, L., Lain, E., Schomig, E. and Grundemann, D., *Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma*. J Physiol Pharmacol, 2011. 62(4): p. 411-9.
19. Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Dessì, M.A. and Aruoma, O.I., *L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids*. Clinical Nutrition, 2004. 23(2): p. 183-193.
20. Arduini, A., Eddy, L. and Hochstein, P., *The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine*. Archives of biochemistry and biophysics, 1990. 281(1): p. 41-43.
21. Zhu, B.-Z., Mao, L., Fan, R.-M., Zhu, J.-G., Zhang, Y.-N., Wang, J., Kalyanaraman, B. and Frei, B., *Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to DNA and protein by forming a redox-inactive ergothioneine– copper complex*. Chemical research in toxicology, 2010. 24(1): p. 30-34.
22. Kato, Y., Kubo, Y., Iwata, D., Kato, S., Sudo, T., Sugiura, T., Kagaya, T., Wakayama, T., Hirayama, A., Sugimoto, M., Sugihara, K., Kaneko, S., Soga, T., Asano, M., Tomita, M., Matsui, T., Wada, M. and Tsuji, A., *Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1*. Pharm Res, 2010. 27(5): p. 832-40.
23. Aruoma, O.I., Spencer, J.P. and Mahmood, N., *Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine*. Food Chem Toxicol, 1999. 37(11): p. 1043-53.
24. Motohashi, N. and Mori, I., *Thiol-induced hydroxyl radical formation and scavenger effect of thiocarbamides on hydroxyl radicals*. Journal of inorganic biochemistry, 1986. 26(3): p. 205-212.
25. Aruoma, O.I., Whiteman, M., England, T.G. and Halliwell, B., *Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxyne nitrite*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 231(2): p. 389-91.
26. Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O.I. and Halliwell, B., *The antioxidant action of ergothioneine*. Arch Biochem Biophys, 1991. 288(1): p. 10-6.
27. Devasagayam, T.P., Steenken, S., Obendorf, M.S., Schulz, W.A. and Sies, H., *Formation of 8-hydroxy (deoxy) guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen*. Biochemistry, 1991. 30(25): p. 6283-6289.

Literaturverzeichnis

28. Rougee, M., Bensasson, R., Land, E.J. and Pariente, R., *Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity*. Photochemistry and photobiology, 1988. 47(4): p. 485-489.
29. Krüger, J., *Untersuchung der Reaktivität von Ergothionein gegenüber Singulett-Sauerstoff in vitro und intrazellulär*. 2016, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
30. Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. Food Chem Toxicol, 1999. 37(9-10): p. 949-62.
31. Mayumi, T., Kawano, H., Sakamoto, Y., Suehisa, E., Kawai, Y. and Hama, T., *Studies on ergothioneine. V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1978. 26(12): p. 3772-3778.
32. Cheah, I.K., Tang, R.M., Yew, T.S., Lim, K.H. and Halliwell, B., *Administration of Pure Ergothioneine to Healthy Human Subjects: Uptake, Metabolism, and Effects on Biomarkers of Oxidative Damage and Inflammation*. Antioxid Redox Signal, 2017. 26(5): p. 193-206.
33. Servillo, L., Castaldo, D., Casale, R., D'Onofrio, N., Giovane, A., Cautela, D. and Balestrieri, M.L., *An uncommon redox behavior sheds light on the cellular antioxidant properties of ergothioneine*. Free Radic Biol Med, 2015. 79: p. 228-36.
34. Foote, C.S., Wexler, S., Ando, W. and Higgins, R., *Chemistry of singlet oxygen. IV. Oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide*. Journal of the American Chemical Society, 1968. 90(4): p. 975-981.
35. Sheu, C. and Foote, C.S., *Reactivity toward Singlet Oxygen of a 7,8-Dihydro-8-Oxoguanosine (8-Hydroxyguanosine) Formed by Photooxidation of a Guanosine Derivative*. Journal of the American Chemical Society, 1995. 117(24): p. 6439-6442.
36. Redmond, R.W. and Kochevar, I.E., *Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen*. Photochem Photobiol, 2006. 82(5): p. 1178-86.
37. DeRosa, M.C. and Crutchley, R.J., *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. 233: p. 351-371.
38. Ogilby, P.R., *Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun*. Chem Soc Rev, 2010. 39(8): p. 3181-209.
39. Skovsen, E., Snyder, J.W., Lambert, J.D. and Ogilby, P.R., *Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell*. J Phys Chem B, 2005. 109(18): p. 8570-3.
40. Ogilby, P.R. and Foote, C.S., *Chemistry of Singlet Oxygen .42. Effect of Solvent, Solvent Isotopic-Substitution, and Temperature on the Lifetime of Singlet Molecular-Oxygen (1-Delta-G)*. Journal of the American Chemical Society, 1983. 105(11): p. 3423-3430.
41. Wilkinson, F., Helman, W.P. and Ross, A.B., *Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular-Oxygen in Solution - an Expanded and Revised Compilation*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1995. 24(2): p. 663-1021.

Literaturverzeichnis

42. Foote, C.S., Denny, R.W., Weaver, L., Chang, Y. and Peters, J., *Quenching of Singlet Oxygen*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1970. 171(1 International): p. 139-148.
43. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 305(3): p. 761-70.
44. Buettner, G.R. and Hall, R.D., *Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in hematoporphyrin derivative-cysteine, -NADH and -light systems*. Biochim Biophys Acta, 1987. 923(3): p. 501-7.
45. Tomita, M., Irie, M. and Ukita, T., *Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction*. Biochemistry, 1969. 8(12): p. 5149-60.
46. Sysak, P.K., Foote, C.S. and Ching, T.-Y., *Chemistry of Singlet Oxygen—Xxv. Photooxygenation of Methionine*. Photochemistry and Photobiology, 1977. 26(1): p. 19-27.
47. Nakagawa, M., Okajima, H. and Hino, T., *Photosensitized oxygenation of N-methoxycarbonyltryptamines. A new pathway to kynurenine derivatives*. J Am Chem Soc, 1977. 99(13): p. 4424-9.
48. Jin, F., Leitich, J. and von Sonntag, C., *The photolysis ($\lambda = 254$ nm) of tyrosine in aqueous solutions in the absence and presence of oxygen. The reaction of tyrosine with singlet oxygen*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1995. 92(3): p. 147-153.
49. Ravanat, J.-L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G. and Cadet, J., *Damage to Isolated DNA Mediated by Singlet Oxygen*. Helvetica Chimica Acta, 2001. 84(12): p. 3702-3709.
50. Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L. and Sauvaigo, S., *Hydroxyl radicals and DNA base damage*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999. 424(1-2): p. 9-21.
51. Harding, L.B. and Goddard, W.A., *Mechanism of the Ene Reaction of Singlet Oxygen with Olefins*. Journal of the American Chemical Society, 1980. 102(2): p. 439-449.
52. Leach, A.G. and Houk, K., *Diels–Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: transition states and mechanisms from contemporary theory*. Chemical Communications, 2002(12): p. 1243-1255.
53. MacManus-Spencer, L.A., Latch, D.E., Kroncke, K.M. and McNeill, K., *Stable Dioxetane Precursors as Selective Trap-and-Trigger Chemiluminescent Probes for Singlet Oxygen*. Analytical Chemistry, 2005. 77(4): p. 1200-1205.

Literaturverzeichnis

54. Kramarenko, G.G., Hummel, S.G., Martin, S.M. and Buettner, G.R., *Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide*. Photochemistry and photobiology, 2006. 82(6): p. 1634-1637.
55. Gollnick, K., *Type II photooxygenation reactions in solution*. Adv. Photochem, 1968. 6(1).
56. Dewilde, A., Pellieux, C., Pierlot, C., Wattré, P. and Aubry, J., *Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide*. Biological chemistry, 1998. 379(11): p. 1377-1379.
57. Saito, I., Matsuura, T. and Inoue, K., *Formation of superoxide ion from singlet oxygen. Use of a water-soluble singlet oxygen source*. Journal of the American Chemical Society, 1981. 103(1): p. 188-190.
58. Adam, W., Bosio, S.G. and Turro, N.J., *Highly Diastereoselective Dioxetane Formation in the Photooxygenation of Enecarbamates with an Oxazolidinone Chiral Auxiliary: Steric Control in the [2 + 2] Cycloaddition of Singlet Oxygen through Conformational Alignment*. Journal of the American Chemical Society, 2002. 124(30): p. 8814-8815.
59. Cadet, J., Ravanat, J.L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H. and Di Mascio, P., *Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights*. Photochem Photobiol, 2006. 82(5): p. 1219-25.
60. Cadet, J., Douki, T. and Ravanat, J.L., *Oxidatively generated base damage to cellular DNA*. Free Radic Biol Med, 2010. 49(1): p. 9-21.
61. Bruskov, V.I., *Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA*. Nucleic Acids Research, 2002. 30(6): p. 1354-1363.
62. Teixeira, M.M., Cunha, F.Q., Noronha-Dutra, A. and Hothersall, J., *Production of singlet oxygen by eosinophils activated in vitro by C5a and leukotriene B4*. FEBS Letters, 1999. 453(3): p. 265-268.
63. Kanofsky, J.R., *Singlet oxygen production by lactoperoxidase*. Journal of Biological Chemistry, 1983. 258(10): p. 5991-5993.
64. Hayaishi, O. and Nozaki, M., *Nature and mechanism of oxygenases: enzymes involved in the biological fixation of molecular oxygen are discussed*. Science, 1969. 164: p. 389-96.
65. Chan, H.W., *Singlet oxygen analogs in biological systems. Coupled oxygenation of 1, 3-dienes by soybean lipoxygenase*. Journal of the American Chemical Society, 1971. 93(9): p. 2357-2358.
66. Koga, S., Nakano, M. and Uehara, K., *Mechanism for the generation of superoxide anion and singlet oxygen during heme compound-catalyzed linoleic acid hydroperoxide decomposition*. Archives of biochemistry and biophysics, 1991. 289(1): p. 223-229.

67. Ryter, S.W. and Tyrrell, R.M., *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. 28(2): p. 289-309.
68. Min, D. and Boff, J., *Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods*. Comprehensive reviews in food science and food safety, 2002. 1(2): p. 58-72.
69. Ergaieg, K. and Seux, R., *A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue*. Desalination, 2009. 246(1): p. 353-362.
70. Tour, O., Meijer, R.M., Zacharias, D.A., Adams, S.R. and Tsien, R.Y., *Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation*. Nat Biotechnol, 2003. 21(12): p. 1505-8.
71. Bottiroli, G., Croce, A.C., Balzarini, P., Locatelli, D., Baglioni, P., Nostro, P.L., Monici, M. and Pratesi, R., *Enzyme-assisted Cell Photosensitization: A Proposal for an Efficient Approach to Tumor Therapy and Diagnosis. The Rose Bengal Fluorogenic Substrate*. Photochemistry and Photobiology, 1997. 66(3): p. 374-383.
72. Tada-Oikawa, S., Oikawa, S., Hirayama, J., Hirakawa, K. and Kawanishi, S., *DNA damage and apoptosis induced by photosensitization of 5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via singlet oxygen generation*. Photochem Photobiol, 2009. 85(6): p. 1391-9.
73. Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R. and Tsien, R.Y., *Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity*. Nat Biotechnol, 2005. 23(10): p. 1308-14.
74. Stoffels, C., Oumari, M., Perrou, A., Termath, A., Schlundt, W., Schmalz, H.-G., Schäfer, M., Wewer, V., Metzger, S., Schömig, E. and Gründemann, D., *Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity*. Free Radical Biology and Medicine, 2017, in 2nd review.
75. Lafleur, M., Nieuwint, A., Aubry, J., Kortbeek, H., Arwert, F. and Joenje, H., *DNA damage by chemically generated singlet oxygen*. Free radical research communications, 1987. 2(4-6): p. 343-350.
76. Pierlot, C., Hajjam, S., Barthélémy, C. and Aubry, J.M., *Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (1O2, 1Δg) carriers for biological media*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1996. 36(1): p. 31-39.
77. Pierlot, C., Aubry, J.-M., Briviba, K., Sies, H. and Di Mascio, P., *Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media*. Methods in enzymology, 2000. 319: p. 3.
78. Tsan, M.-F. and Chen, J.W., *Oxidation of methionine by human polymorphonuclear leukocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1980. 65(5): p. 1041.

Literaturverzeichnis

79. Stadtman, E.R., Moskovitz, J., Berlett, B.S. and Levine, R.L., *Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism.* Molecular and cellular biochemistry, 2002. 234(1): p. 3-9.
80. Naik, N. and Braslau, R., *Synthesis and applications of optically active nitroxides.* Tetrahedron, 1998. 54(5-6): p. 667-696.
81. Moan, J. and Wold, E., *Detection of singlet oxygen production by ESR.* Nature, 1979. 279(5712): p. 450-451.
82. Pennington, J., Cohen, R.D., Tian, Y. and Boulineau, F., *Development of an LC-MS method for ultra trace-level determination of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxl (TEMPO), a potential genotoxic impurity within active pharmaceutical ingredients.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. 114: p. 488-492.
83. Graham, F., Smiley, J., Russell, W. and Nairn, R., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.* Journal of General Virology, 1977. 36(1): p. 59-72.
84. Bach, M., Grigat, S., Pawlik, B., Fork, C., Utermöhlen, O., Pal, S., Banczyk, D., Lazar, A., Schömig, E. and Gründemann, D., *Fast set - up of doxycycline - inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor.* The FEBS journal, 2007. 274(3): p. 783-790.
85. Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. and Timpl, R., *Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican.* FEBS letters, 1997. 414(3): p. 557-561.
86. Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B., *Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells.* Nature, 1985. 313(6005): p. 812-815.
87. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings of the national academy of sciences, 1977. 74(12): p. 5463-5467.
88. Appala, R.N., Chigurupati, S., Appala, R.V., Krishnan Selvarajan, K. and Islam Mohammad, J., *A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC-12 Cells.* Scientifica (Cairo), 2016. 2016: p. 6897890.
89. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. and Klenk, D., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical biochemistry, 1985. 150(1): p. 76-85.
90. Wiechelmann, K.J., Braun, R.D. and Fitzpatrick, J.D., *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.* Analytical biochemistry, 1988. 175(1): p. 231-237.
91. Shea, C.R., Hefetz, Y., Gillies, R., Wimberly, J., Dalickas, G. and Hasan, T., *Mechanistic investigation of doxycycline photosensitization by picosecond-pulsed and continuous wave laser irradiation of cells in culture.* Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(11): p. 5977-5982.

92. Metlin. https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=advanced_search 2017 [cited 25.09.2017].
93. Stadtman, E.R. and Berlett, B.S., *Free-radical-mediated modification of proteins*. Free Radical Toxicol, 1997: p. 71-87.
94. Ugarte, N., Ladouce, R., Radjei, S., Gareil, M., Friguet, B. and Petropoulos, I., *Proteome alteration in oxidative stress-sensitive methionine sulfoxide reductase-silenced HEK293 cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. 65: p. 1023-1036.
95. Moskovitz, J., Poston, J.M., Berlett, B.S., Nosworthy, N.J., Szczepanowski, R. and Stadtman, E.R., *Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(19): p. 14167-14172.
96. Smythe, C., *The reaction of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations*. Journal of Biological Chemistry, 1936. 114(3): p. 601-612.
97. Meister, A., *Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals*. Journal of Biological Chemistry-Paper Edition, 1994. 269(13): p. 9397-9400.
98. Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R. and Kamiya, Y., *Regeneration of vitamin E from α -chromoxyl radical by glutathione and vitamin C*. Chemistry Letters, 1982. 11(6): p. 789-792.
99. Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M. and Kasprzak, K.S., *Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress*. J Biol Chem, 2004. 279(39): p. 40337-44.
100. Fuchs, J., Groth, N., Herrling, T. and Zimmer, G., *Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2, 2, 5, 5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. 22(6): p. 967-976.
101. Lushchak, V.I., *Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions*. Journal of amino acids, 2012. 2012.
102. Griffith, O.W., *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. 27(9): p. 922-935.
103. Griffith, O.W., *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. Analytical biochemistry, 1980. 106(1): p. 207-212.
104. Griffith, O.W. and Meister, A., *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (Sn-butyl homocysteine sulfoximine)*. Journal of Biological Chemistry, 1979. 254(16): p. 7558-7560.
105. Kubal, G., Meyer, D.J., Norman, R.E. and Sadler, P.J., *Investigations of glutathione conjugation in vitro by ^1H NMR spectroscopy. Uncatalyzed and glutathione transferase-catalyzed reactions*. Chemical research in toxicology, 1995. 8(5): p. 780-791.

Literaturverzeichnis

106. Reinhold, V.N., Ishikawa, Y. and Melville, D.B., *Synthesis of alpha-N-methylated histidines*. Journal of medicinal chemistry, 1968. 11(2): p. 258-260.
107. Gianazza, E., Tremoli, E. and Banfi, C., *The selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring-based mass spectrometry approach for the accurate quantitation of proteins: clinical applications in the cardiovascular diseases*. Expert review of proteomics, 2014. 11(6): p. 771-788.
108. Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum B. *Elektrosprayionisation (ESI)*. [Image] 2016 Available from: <http://www.bmfz.hhu.de>. [cited 2016 13.12.2016].
109. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M., *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. 9(1): p. 37-70.
110. Shimadzu. *Diagram of Quadrupole MS*. Available from: <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/61/61intro.html>. [cited 2017 05.02.2017].
111. Xiao, J.F., Zhou, B. and Resson, H.W., *Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. 32: p. 1-14.
112. Ramirez - Correa, G.A., Martinez - Ferrando, M.I., Zhang, P. and Murphy, A.M., *Targeted proteomics of myofilament phosphorylation and other protein posttranslational modifications*. PROTEOMICS-Clinical Applications, 2014. 8(7-8): p. 543-553.
113. Griffin, B.A., Adams, S.R. and Tsien, R.Y., *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. 281(5374): p. 269-72.
114. Ketterer, B., Coles, B. and Meyer, D.J., *The role of glutathione in detoxication*. Environmental Health Perspectives, 1983. 49: p. 59.
115. Reglinski, J., Smith, W. and Sturrock, R., *Spin - echo 1H NMR detected response of ergothioneine to oxidative stress in the intact human erythrocyte*. Magnetic resonance in medicine, 1988. 6(2): p. 217-223.
116. Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A. and Balbarini, A., *An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox*. Biomedicine & pharmacotherapy, 2006. 60(8): p. 453-457.
117. Mitsuyama, H. and May, J.M., *Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes*. Clin Sci (Lond), 1999. 97(4): p. 407-11.
118. Godley, B.F., Shamsi, F.A., Liang, F.-Q., Jarrett, S.G., Davies, S. and Boulton, M., *Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(22): p. 21061-21066.
119. Castano, A.P., Demidova, T.N. and Hamblin, M.R., *Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2004. 1(4): p. 279-293.

Literaturverzeichnis

120. Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J. and Tsien, R.Y., *New biarsenical Ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications*. Journal of the American Chemical Society, 2002. 124(21): p. 6063-6076.
121. Bottone, M., Soldani, C., Fraschini, A., Alpini, C., Croce, A., Bottiroli, G. and Pellicciari, C., *Enzyme-assisted photosensitization with rose Bengal acetate induces structural and functional alteration of mitochondria in HeLa cells*. Histochemistry and cell biology, 2007. 127(3): p. 263-271.
122. Snyder, J.W., Lambert, J.D. and Ogilby, P.R., *5, 10, 15, 20 - Tetrakis (N - Methyl - 4 - Pyridyl) - 21 H, 23H - Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation - dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell*. Photochemistry and photobiology, 2006. 82(1): p. 177-184.
123. Ali, H. and Van Lier, J.E., *Metal complexes as photo-and radiosensitizers*. Chemical Reviews, 1999. 99(9): p. 2379-2450.
124. Vincent, S.H. *Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids*. in *Seminars in hematology*. 1989.
125. Nagababu, E. and Rifkind, J.M., *Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation*. Biochemistry, 2000. 39(40): p. 12503-12511.
126. Everse, J., Johnson, M.C. and Marini, M.A., *[36] Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives*. Methods in enzymology, 1994. 231: p. 547-561.
127. Cui, D., Tian, F., Ozkan, C.S., Wang, M. and Gao, H., *Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells*. Toxicology letters, 2005. 155(1): p. 73-85.
128. Ravanat, J.L., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H. and Cadet, J., *Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA*. J Biol Chem, 2000. 275(51): p. 40601-4.
129. Saito, I., Matsuura, T., Nakagawa, M. and Hino, T., *Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives*. Accounts of Chemical Research, 1977. 10(9): p. 346-352.
130. Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P., *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. 78(11): p. 6858-6862.
131. Cannistraro, S., Vorst, A. and Jori, G., *EPR studies on singlet oxygen production by porphyrins*. Photochemistry and Photobiology, 1978. 28(2): p. 257-259.
132. Bisby, R.H., Morgan, C.G., Hamblett, I. and Gorman, A.A., *Quenching of singlet oxygen by Trolox C, ascorbate, and amino acids: effects of pH and temperature*. The Journal of Physical Chemistry A, 1999. 103(37): p. 7454-7459.

Literaturverzeichnis

133. Nualart, F., Castro, T., Low, M., Henriquez, J.P., Oyarce, K., Cisternas, P., Garcia, A., Yanez, A.J., Bertinat, R., Montecinos, V.P. and Garcia-Robles, M.A., *Dynamic expression of the sodium-vitamin C co-transporters, SVCT1 and SVCT2, during perinatal kidney development*. *Histochem Cell Biol*, 2013. 139(2): p. 233-47.
134. Baker, A. and Kanofsky, J.R., *Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells*. *Photochemistry and photobiology*, 1992. 55(4): p. 523-528.
135. Agon, V.V., Bubb, W.A., Wright, A., Hawkins, C.L. and Davies, M.J., *Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006. 40(4): p. 698-710.
136. Shen, H.-R., Spikes, J.D., Smith, C.J. and Kopeček, J., *Photodynamic cross-linking of proteins: IV. Nature of the His–His bond (s) formed in the rose bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000. 130(1): p. 1-6.
137. Gay, C., Collins, J. and Gebicki, J.M., *Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex*. *Analytical biochemistry*, 1999. 273(2): p. 149-155.
138. Méndez - Hurtado, J., López, R., Suárez, D. and Menéndez, M.I., *Theoretical study of the oxidation of histidine by singlet oxygen*. *Chemistry-A European Journal*, 2012. 18(27): p. 8437-8447.
139. El-Harakany, A., Halim, F.A. and Barakat, A., *Dissociation constants and related thermodynamic quantities of the protonated acid form of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in mixtures of 2-methoxyethanol and water at different temperatures*. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 1984. 162(1-2): p. 285-305.
140. Clennan, E.L. and Pace, A., *Advances in singlet oxygen chemistry*. *Tetrahedron*, 2005. 61(28): p. 6665-6691.
141. Hand, C.E. and Honek, J.F., *Biological chemistry of naturally occurring thiols of microbial and marine origin*. *Journal of natural products*, 2005. 68(2): p. 293-308.
142. Briviba, K. and Sies, H., [21] *Biological singlet oxygen quenchers assessed by monomol light emission*. *Methods in enzymology*, 2000. 319: p. 222-226.
143. Cunningham, M.L., Johnson, J.S., Giovanazzi, S.M. and Peak, M.J., *Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290–405 nm) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes*. *Photochemistry and photobiology*, 1985. 42(2): p. 125-128.
144. Kai, S. and Suzuki, M., *Dye-sensitized photooxidation of 2, 4-disubstituted imidazoles: The formation of isomeric imidazolinones*. *Heterocycles*, 1996. 43(6): p. 1185-1188.

8 Anhang

Dargestellt ist der der Tetracyclin-Repressor-Sequenz mit dem modifiziert Tetracystein-Motiv aus dem verwendeten Konstrukt pEBTetD/ETT/TetR-TC. Dabei ist in Grün der Tetracyclin-Repressor, in Blau der Klonierungsüberhang, in orange die ursprüngliche BamHI-Restriktionsschnittstelle und in Rot das Tetracystein-Motiv gezeigt.

```

1  ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG CTG CTT AAT GAG GTC GGA ATC GAA GGT TTA ACA
1▶ M S R L D K S K V I N S A L E L L N E V G I E G L T
79 ACC CGT AAA CTC GCC CAG AAG CTA GGT GTA GAG CAG CCT ACA TTG TAT TGG CAT GTA AAA AAT AAG CGG GCT TTG CTC
27▶ T R K L A Q K L G V E Q P T L Y W H V K N K R A L L
157 GAC GCC TTA GCC ATT GAG ATG TTA GAT AGG CAC CAT ACT CAC TTT TGC CCT TTA GAA GGG GAA AGC TGG CAA GAT TTT
53▶ D A L A I E M L D R H H T H F C P L E G E S W Q D F
235 TTA CGT AAT AAC GCT AAA AGT TTT AGA TGT GCT TTA CTA AGT CAT CGC GAT GGA GCA AAA GTA CAT TTA GGT ACA CGG
79▶ L R N N A K S F R C A L L S H R D G A K V H L G T R
313 CCT ACA GAA AAA CAG TAT GAA ACT CTC GAA AAT CAA TTA GCC TTT TTA TGC CAA CAA GGT TTT TCA CTA GAG AAT GCA
105▶ P T E K Q Y E T L E N Q L A F L C Q Q G F S L E N A
391 TTA TAT GCA CTC AGC GCT GTG GGG CAT TTT ACT TTA GGT TGC GTA TTG GAA GAT CAA GAG CAT CAA GTC GCT AAA GAA
131▶ L Y A L S A V G H F T L G C V L E D Q E H Q V A K E
469 GAA AGG GAA ACA CCT ACT ACT GAT AGT ATG CCG CCA TTA TTA CGA CAA GCT ATC GAA TTA TTT GAT CAC CAA GGT GCA
157▶ E R E T P T T D S M P P L L R Q A I E L F D H Q G A
547 GAG CCA GCC TTC TTA TTC GGC CTT GAA TTG ATC ATA TGC GGA TTA GAA AAA CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC GCG
183▶ E P A F L F G L E L I I C G L E K Q L K C E S G S A
625 TAC AGC GGA TTT CTG AAC TGC TGC CCG GGC TGC TGC ATG GAA CCG TCC CGG GAA TTC AGA TCT TAT TAA
209▶ Y S G F L N C C P G C C M E P S R E F R S Y •

```


Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Vergabe des Projekts, die freundliche Unterstützung und die großartige Möglichkeit in dieser Arbeitsgruppe meine Promotion anfertigen zu dürfen.

Zudem danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Ines Neundorf und Prof. Dr. Olaf Utermöhlen für die Promotionsbetreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Ich danke auch unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Schmalz und seinem Mitarbeiter, Waldemar Schlundt, für die Bereitstellung des DHPNO₂, sowie Frau Dr. Sabine Metzger und Ihrer Mitarbeiterin Frau Dr. Vera Wewer für die Messung der akkuraten Masse.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Samira, Simone, Kathi als auch bei den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Aris, Chih-hsuan, Julia, Julian, Marc, Mhmd und Thorsten für das tolle Arbeitsklima und die beständige, tägliche Unterstützung.

Einen ganz besonderen Dank haben sich die Korrekturleser*innen Dr. Peter Skwara, Steffi und Evelyn verdient. Peters IT-Service darf an dieser Stelle auch nicht unerwähnt bleiben. Vielen Dank für deine Geduld bei meiner Unwissenheit.

Bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden möchte ich mich für ihre Unterstützung während meiner Promotion und ihre motivierenden Worte in den letzten Wochen bedanken.

Vielen Dank!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ines Neundorf betreut worden

Köln, den 03.02.2018

Christopher Stoffels

Teilpublikationen:

Stoffels, C., Oumari, M., Perrou, A., Termath, A., Schlundt, W., Schmalz, H.-G., Schäfer, M., Wewer, V., Metzger, S., Schömig, E. and Gründemann, D., *Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity*. Free Radical Biology and Medicine, 2017.