

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden generell in der höchsten verfügbaren Reinheit bestellt. Alle Peptidhormone und Derivate von Peptidhormonen sowie alle Aminosäuren, Aminosäureester und Acetylaminosäuren waren von Bachem, soweit nicht anders angegeben. Peroxynitrit, Sperminnonoat, und 3-Morpholinonydnomin (SIN-1) waren von Calbiochem.

Alle anderen Biochemika sowie insbesondere Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholin (DPPC), Dilauroyl-L- α -phosphatidylcholin (DLPC), Linolsäureethylester, Propidiumiodid (PI), Dichlorfluoresceindiacetat (DCFA), LHRH(7-10), N-*tert*-butyl- α -phenylnitron (PBN), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (Luminol), S-Butylhomocysteinsulfoximin (BSO) und 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) waren von Sigma.

Das bovine Serumalbumin von Sigma wurde durch Säulenchromatographie über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt und UV/VIS-spektroskopisch quantifiziert. Das Sephadex war von Pharmacia.

Alle Lösungsmittel und weiteren Chemikalien und Reagentien waren, soweit nicht anders vermerkt, von Aldrich, insbesondere auch Wasserstoffperoxid, *tert*-Butylhydroperoxid (tBuOOH), 2,2'-Azo-bis-(2-methylpropionamidin) (AIBN) und 1,1'-Azo-bis-(1-cyanocyclohexan) (ACCH).

Die Platten für die Dünnschichtchromatographie sowie alle weitere Laborausstattung für die chemisch-synthetischen und chemisch-analytischen Experimente waren von Merck.

2.2 Chemische Synthesen

2.2.1 Peptide

Spezielle Peptide mit Sequenzen, die Sequenzen aus den Transmembrandomänen integraler Membranproteine entsprechen, wurden nach üblichen Methoden der Peptid-Festphasensynthese hergestellt. Die Sequenzen wurden entsprechend den Sequenzen des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (SwissProt, SP) gewählt. Die Peptide und die für sie verwendeten Abkürzungen rekrutieren sich wie im folgenden angegeben:

ps-i mit der Sequenz Ac-WTAWL-NH₂ entspricht den Aminosäuren 244-248 von Presenilin I (Transmembransegment (TM) 6; SwissProt-Identifikationsnummer (SP ID) P49768).

ingr hat die Sequenz Ac-SLWIPVVA-NH₂ und entspricht den Aminosäuren 246-253 des Interferon- γ -Receptors (ein nur einfach die Membran durchspannendes Protein; SP ID P15260).

cftr ist Ac-LSVLPY-NH₂ und entspricht den Aminosäuren 320-325 des bei der Cystischen Fibrose mutierten Kanalproteins (TM 5; SP ID P13569).

na/k hat die Sequenz Ac-LYLGVVL-NH₂ und entspricht den Aminosäuren 130-136 der katalytischen α_1 -Kette der Na⁺/K⁺-transportierenden ATPase (TM 2; SP ID P05023). Eine identische Sequenz taucht auch in der α_2 -Kette an den Positionen 128-134 auf (SP ID P50993).

Alle Peptide wurden in N-acetylierter und C-amidierter Form hergestellt, um ladungstragende und die Lipophilie verringernde Gruppen an den Peptiden zu vermeiden und somit die Situation in den als Vorbildern dienenden Membranproteinen besser nachzuahmen.

Die Peptidsynthesen wurden von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Die Peptide wurden mittels RP-HPLC gereinigt und ihre Identität über MALDI-Massenspektroskopie verifiziert. Alle Peptide waren gemäß HPLC zu mindestens 95 % rein.

Zur Applikation der Peptide in den biochemischen und zellbiologischen Versuchen wurden unterschiedliche Solubilisierungsmethoden verwendet. Cftr wurde in Wasser gelöst und in allen Experimenten als wäßrige Lösung eingesetzt. Im Falle von ps-i, ingr und na/k wurde für die Applikation zur Zellkultur eine Liposomenpräparation mit den Peptiden hergestellt. Die Peptide wurden hierzu in heißem Chloroform gelöst und mit 0,5 Gewichtsäquivalenten an Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholin (DPPC) und Dilauroyl-L- α -phosphatidylcholine (DLPC) versetzt. Das Lösungsmittel wurde mit einem Stickstoffstrom evaporiert, und der erhaltene Lipidfilm wurde mit 500 Äquivalenten Wasser hydratisiert. Nach 1 h wurden die Präparationen unter Kühlung intermittierend für etwa 5 min ultraschallbehandelt. Für ingr und na/k wurde diese Behandlung noch zweimal wiederholt, wobei jeweils nochmals 0,5 Äquivalente DLPC zugegeben wurden. Danach war bei allen Peptiden eine für mindestens 1 h gemäß UV/VIS-Absorption bei 550 nm stabile Vesikelpräparation erreicht, die direkt für Zellexperimente verwendet wurde. Entsprechende peptidfreie Vesikel dienten als Kontrolle. Alle obigen Präparationsschritte wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Für die Applikation der Peptide in lösungsmittelbasierten Oxidationsversuchen (Dienoxidation) wurden die Peptide direkt gelöst in Chloroform eingesetzt.

2.2.2 Aminoacyllipide

Langkettig acylierte Aminosäurederivate (Aminoacyllipide) wurden nach einer Schotten-Baumann-Reaktion durch Verknüpfung eines freien Amins mit einer aktivierten Säure unter Basenkatalyse hergestellt. Als Aminkomponente wurden Aminosäureethylester eingesetzt, als

aktivierte Säuren die entsprechenden Säurechloride, und als Katalysator wurde Pyridin verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte durch Lösungsmittlextraktion mit anschließender Gradienten-Säulenchromatographie und nachfolgender Umkristallisation. Die Strukturen und ihre Reinheit wurden über analytische Dünnschichtchromatographie sowie ¹H-NMR-Spektroskopie und MALDI-Massenspektroskopie verifiziert.

Die folgenden Substanzen wurden synthetisiert:

NDo-F-OEt, N-Dodecanoyl-phenylalaninethylester,

NDo-Y-OEt, N-Dodecanoyl-tyrosinethylester,

NDo-W-OEt, N-Dodecanoyl-tryptophanethylester,

NDo-L-OEt, N-Dodecanoyl-leucinethylester,

NDo-V-OEt, N-Dodecanoyl-valinethylester,

NDo-A-OEt, N-Dodecanoyl-alaninethylester,

NPa-W-OEt, N-Palmitoyl-tryptophanethylester,

NOI-W-OEt, N-Oleoyl-tryptophanethylester.

Im folgenden ist ein typischen Syntheseprotokoll beschrieben:

4 mmol eines Aminosäureethylesters wurden bei Raumtemperatur in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und anschließend mit zwei Äquivalenten (8 mmol) wasserfreiem Pyridin versetzt. Die Lösung wird auf -40°C abgekühlt. Anschließend werden 4 mmol eines Fettsäurechlorides, gelöst in 10 ml wasserfreiem THF, unter Rühren langsam zugetropft. Nach einer weiteren Stunde wird das Kühlbad entfernt, und die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Zugabe von 5 ml Wasser wird die THF-Phase mit dreimal ausgiebig mit einem auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellten Phosphatpuffer (50 g/l) ausgeschüttelt. Die gesammelten wäßrigen Phasen werden einmal mit THF gegengeschüttelt. Die vereinigten THF-Phasen werden dann mit basischem Phosphatpuffer (pH 9,5; 50 g/l) ebenfalls dreimal nachhaltig ausgeschüttelt. Die organische Phase wird anschließend mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend unter niedrigem Vakuum eingedampft. Die erhaltenen Rohausbeuten betragen zwischen 60 % und 85 %.

Die rohen Aminoacyllipide wurden anschließend durch Säulenchromatographie über Aluminiumoxid (150 mesh, pH 6, desaktiviert mit 7 % Wasser) weiter gereinigt. Auf eine mit dem in Methanol:Chloroform (1:1) aufgeschlemmten Trägermaterial gefüllte Säule (3 cm x 60 cm) wurden die Rohsubstanzen, gelöst in dem kleinstmöglichen Volumen Methanol:Chloroform (1:1), aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit etwa 1 l Lösungsmittel steigenden Chloroformgehaltes (stufenweise von 50 % bis auf 100 %) eluiert

und das Eluat fraktioniert gesammelt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert und vereinigt. Nach Filtration über eine mit geglühtem Kieselgur (Celite) gefüllte kleine Säule (50 ml) wurden die eluierten Verbindungen unter Vakuum eingedampft.

Zur Umkristallisation wurden die Substanzen in dem geringstmöglichen Volumen an siedendem Ethanol:Wasser (1:1) vollständig gelöst. Die heiße Lösung wurde dann in einem isolierenden Behältnis langsam auf 4°C abgekühlt. Das nach zwei Tagen erhaltene Präzipitat wurde abfiltriert, mit 50 ml gekühltem, frischem Ethanol:Wasser (1:1) gewaschen und anschließend über trockenem Calciumchlorid unter Vakuum getrocknet. Im Falle der aromatischen Aminosäuren ergaben sich klare bis weißliche Kristalle als Präzipitat, im Falle der Leucin-, Valin- und Alanin-Verbindungen weiße, amorphe Niederschläge. Die Valin- und Leucinverbindungen NDo-V-OEt und NDo-L-OEt waren bei Raumtemperatur flüssig. Die finalen Ausbeuten an Reinsubstanz betragen zwischen 38 % und 62 %.

Alle Substanzen wurden durch Dünnschichtchromatographie auf ihre Einheitlichkeit untersucht. Hierzu wurden die Substanzen in Ether gelöst und auf eine mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatte aufgetragen. Als Laufmittel wurde eine je nach Substanz modifizierte Mischung von Butanol:Essigsäureethylester:Toluol, ausgehend von der äquivolumentalen Mischung, verwendet. Nach der Umkristallisation waren alle Substanzen gemäß diesen Chromatogrammen einheitlich.

Zur Sicherung der erhaltenen Strukturen wurden von allen Verbindungen ¹H-NMR-Spektren sowie in einigen Fällen auch MALDI-TOF-Massenspektren angefertigt. Die erhaltenen Spektren entsprachen in ihren chemischen Verschiebungen, Signalintensitäten und Hyperfeinaufspaltungen vollständig der jeweils zugeordneten Struktur. Auch die Massenspektren entsprachen der Erwartung. In Abbildung 2 sind exemplarisch die ¹H-NMR-Spektren und die MALDI-TOF-Massenspektren von NDo-F-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-W-OEt dargestellt.

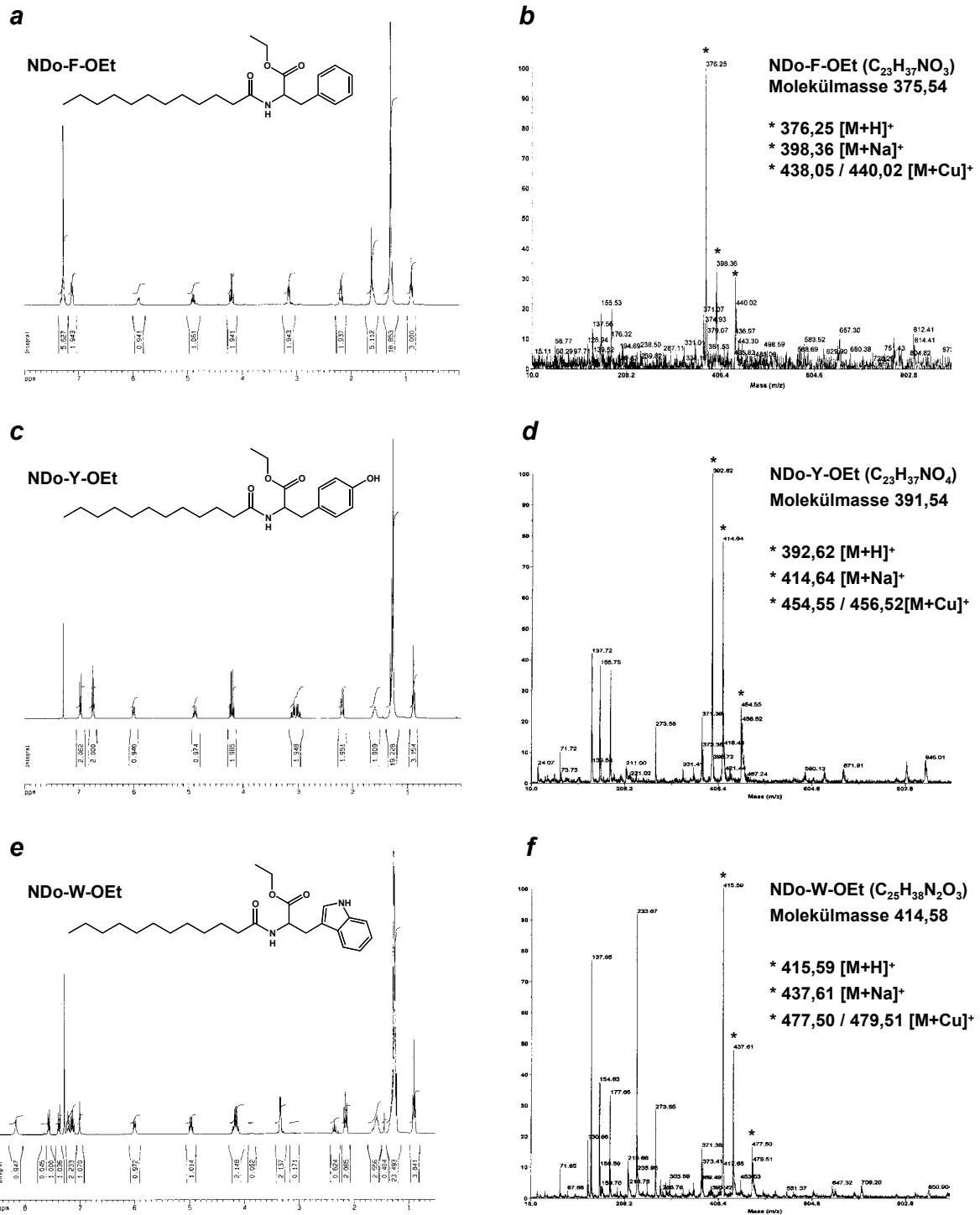


Abbildung 2. Protonen-NMR-Spektren und MALDI-TOF-Massenspektren von NDo-F-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-W-OEt.

Die NMR-Spektren von NDo-F-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-W-OEt sind in *a*, *c* und *e* dargestellt. Die Signale lassen sich für allen Spektren wie folgt zuordnen: 0,9 ppm, endständige Methylgruppe der langen Acylkette; 1,3 ppm, endständige Methylgruppe der Ethylestergruppe überlappt mit den γ - bis κ -ständigen Methylengruppen der Acylkette; 1,7 ppm; β -ständige Methylengruppe der Acylkette; 2,2 ppm, α -ständige Methylengruppe der

Acylkette; 3,1-3,3 ppm, zum Aromaten α -ständige Methylengruppe; 4,2 ppm, Methylengruppe der Ethylestergruppe; 4,9-5,0 ppm, zentrale Methingruppe der Aminosäure; 5,9-6,0 ppm; Proton der Säureamidgruppe; 6,7-7,6 ppm, Aromatenbereich, 8,2 ppm, Proton des Indolstickstoffs. Die Integrale der Signalintensitäten sowie die Hyperfeinaufspaltungen der einzelnen Signale entsprachen der jeweiligen Erwartung gemäß den angegebenen Substanz-Strukturformeln. Der Peak bei 7,3 ppm rührt von im Lösungsmittel Deuteriochloroform enthaltenem ^1H -Chloroform her.

Die MALDI-TOF-Massenspektren von NDo-F-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-W-OEt sind in **b**, **d** und **f** gezeigt. Die rechnerischen Molekülmassen der einzelnen Verbindungen sind angegeben. Die markierten Peaks lassen sich jeweils dem protonierten Molekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$, dem Molekülion im Komplex mit Natrium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und dem Molekülion im Komplex mit einem der beiden Kupferisotope $[\text{M}+\text{Cu}]^+$ zuordnen. Die Peaks mit einem Masse/Ladungsverhältnis von etwa 273,5; 177,6; 155,7; 154,6 und 137,6 erscheinen auch im Kontrollspektrum der verwendeten Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure (MW 154,12) und sind deshalb nicht den Analysesubstanzen zuzuordnen.

Die ^1H -NMR-Spektren und die MALDI-TOF-Massenspektren wurden von der Firma Reseachem (Burgdorf, Schweiz) angefertigt.

Für die zellbiologischen Experimente wurden die Aminoacyllipide als 10^{-1} oder 10^{-2} M Stammlösungen in Ethanol gelöst und auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen verdünnt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Klonale Zelllinien

Zelllinien wurden bei 37°C in 5 % kohlendioxidhaltiger Atmosphäre in humidifizierten Begasungsbrutschränken (Heraeus) kultiviert. Das Standardkulturmedium war Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in der modifizierten Variante mit 4,5 g/l Glucose, 4 mg/l Pyridoxal und 1 mM Pyruvat, in manchen Fällen supplementiert mit einer Antibiotikamischung (100 U/ml Penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B). Wurden die Zellen für aktuelle Experimente subkultiviert, wurde mindestens zwei Tage vor Beginn eines Experiments zu antibiotikafreien Bedingungen gewechselt. Das Basismedium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert. Das FCS wurde vor Zugabe für 30 Minuten bei 56°C zur Komplementinaktivierung hitzebehandelt und anschließend nochmals sterilfiltriert (0,2 μm Filter von Schleicher & Schuell).

Alle Medien, Seren und Supplemente für die eukaryontische Zellkultur waren von Gibco Life Technologies. Sterile Kunststoffwaren für die Zellkultur wurden von TPP bezogen.

Die folgenden Zelllinien wurden verwendet:

HT22-Zellen sind hippocampale neuronale Zellen aus der Maus, die erstmals bei Morimoto und Koshland, 1990 beschrieben sind. Sie wurden in mit 10 % FCS supplementiertem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert und etwa alle 50 Stunden im Verhältnis 1 zu 8 passagiert.

SK-N-MC-Zellen sind eine Neuroblastomzelllinie menschlichen Ursprungs (ATCC-Nummer HTB-10), die von Biedler *et al.*, 1973 angelegt wurde. Sie wurden etwa alle 75 Stunden im Verhältnis 1 zu 4 passagiert. Ihr Kulturmedium war mit 10 % FCS versetztes DMEM.

NIH3T3-Zellen sind klonale murine Fibroblasten (ATCC-Nummer CRL-1658). Sie wurden standardisiert in DMEM mit 10 % FCS kultiviert und etwa alle 50 Stunden im Verhältnis 1 zu 10 passagiert.

2.3.2 Primäre Zellkultur

Cerebelläre primäre Neuronen wurden aus den Kleinhirnen neugeborener Sprague-Dawley-Ratten des Postnatalaltages 3 isoliert. Nach der Anästhesie mit Halothan wurden die Ratten dekapitiert und die Gesamthirne präpariert. Nach der Abtrennung der Cerebella vom restlichen Hirngewebe wurden diese von Blutgefäßen und Hirnhäuten befreit und in mehrere kleine Stücke geschnitten. Alle diese Schritte fanden unter gekühltem Minimal Essential Medium (MEM) statt. Die erhaltenen Gewebeproben wurden anschließend für 20 min bei Raumtemperatur in Dulbecco's PBS (D-PBS), versetzt mit 0.05 % Trypsin und 0.02 % EDTA, inkubiert. Die angedauten Gewebeproben wurden in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) überführt und durch vorsichtiges, wiederholtes Pipettieren durch eine serologische Pipette disintegriert. Überbleibende, undissoziierte Gewebstücke wurden durch Filtration durch eine 50 µm Membran (Nybolt Filter, Eckert) entfernt. Nach einer Zentrifugation (200 g, 4 min) wurden die Zellen in MEM mit 10 % FCS resuspendiert und in einer Dichte von $0,2-1,0 \times 10^5$ Zellen pro Quadratcentimeter ausplattiert. Die Zellkulturplatten waren durch 4 h Inkubation mit einer poly-L-Lysin-Lösung (0,01 mg/ml eines 70-150 kDa Polymers) vorbeschichtet worden. Nach 36 h in Kultur wurden die Zellen in ihr finales, serumfreies Medium überführt. Dieses Medium bestand aus MEM:F12 (1:1) versetzt mit N2 Supplementen und 0,5 nM Triiodthyronin, eingestellt auf eine erhöhte finale Glucosekonzentration von 5 g/l. Experimente mit den primären Zellen wurden beginnend 24 h nach dem Wechsel zu serumfreiem Medium durchgeführt.

2.3.3 Organotypische Schnittkultur

Zur Präparation hippocampaler, organotypischer Schnittkulturen wurden 8 bis 10 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die isolierten Hirne aus den nach Anästhesie dekapitierten Ratten wurden in eiskaltes Minimal Essential Medium (MEM) transferiert und anschließend mit einem Gewebsschneider in 400 µm dicke Scheiben geschnitten. Die hippocampalen Scheiben wurden auf sterile, poröse 0,4 µm Membranen (Millipore) verbracht, welche in mit Kulturmedium bedeckte Zellkulturschalen gelegt wurden. Als Kulturmedium wurde MEM, supplementiert mit 1% FCS, verwendet. Dieses Kulturmedium wurde alle drei Tage erneuert. Nach sieben Tagen in vitro wurden die Schnittkulturen für Experimente herangezogen.

Die hippocampalen Schnittkulturen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. T. Skutella, Neurowissenschaftliches Zentrum der Charité, Berlin, angefertigt.

2.4 Zellvitalitäts- und Zellüberlebensbestimmungen

2.4.1 Mikroskopische Methoden und Färbemethoden

Alle Zelllinien und Primärzellen wurden unter einem binokularen Phasenkontrastmikroskop der Firma Olympus examiniert. Als qualitative Marker für den Zustand der Zellen nach Streß-Experimenten wurden bei klonalen Zellen das Proliferationsverhalten, das kloniforme Verhalten, die Vakoulisierung, die Proliferation des endoplasmatischen Retikulums sowie die generelle Morphologie der Zellfortsätze herangezogen. Bei primären Neuronen wurden im wesentlichen die Zahl und Struktur der dendritischen Fortsätze beurteilt. Zur Quantifizierung dieser Marker als Resultat verschiedener Überlebenstests wurden Phasenkontrastaufnahmen bei 200facher Vergrößerung angefertigt und nach diesen Kriterien ausgezählt.

Zur Messung der zellulären Membranintegrität wurden DNA-Interkalationsexperimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) durchgeführt, welcher bei intakter Zellmembran nicht in die Zelle eindringt, während bei einer Schädigung der Membran beispielsweise durch Oxidationen die Substanz bis in den Zellkern vordringt und unter Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute in die chromosomale DNA interkaliert. Zellen in dissoziierter Kultur wurden für 10 min mit 10 µg/ml PI markiert und nach zwei Waschschritten mit farbstofffreiem Medium ausgewertet. Die hippocampalen Schnitte wurden mit 5 µg/ml PI für circa 4-6 h markiert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden ein 479-490 nm Anregungsfilter und ein 515-550 nm Emissionsfilter verwendet.

2.4.2 Metabolische Tests

Als metabolischer Meßparameter für das Zellüberleben nach der Intoxikation mit verschiedenen oxidativen Stressoren wurde die Reduktion des substituierten Tetrazols MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem Formazanfarbstoff eingesetzt. Zur Quantifizierung der Zellvitalitäten wurden etwa 4000 HT22-Zellen, 10000 NIH3T3-Zellen oder 20000 SK-N-MC-Zellen in 96-Loch-Platten für 24 h subkultiviert. Primäre Neuronen wurden in verschiedenen Gefäßen bei 10^5 Zellen pro Quadratcentimeter kultiviert. Nach unterschiedlichen Behandlungen mit potentiellen Protektoren und Stressoren wurde das Kulturmedium auf 0,5 mg/ml MTT eingestellt und für circa 2 bis 10 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Volumenäquivalent einer Solubilisierungslösung (45 % DMF, 10 % SDS, pH 4,2 mit Eisessig) lysiert und einige Stunden später bei 550 nm photometrisch vermessen. Im Falle der klonalen Zelllinien traten für keine der Substanzen proliferationsstimulierende Effekte auf. Auch wurden keine direkten Interferenzen mit der MTT-Reduktion beobachtet.

2.5 Oxidationsmessungen

2.5.1 Zelluläre Peroxidbestimmung

Die Messung der intrazellulären Peroxid-Akkumulation erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung von Dichlorfluorescindiacetat (DCFA) als Indikator. DCFA wird nach der Aufnahme durch die Zellen hydrolytisch in nicht mehr zellmembrangängiges Dichlorfluorescein umgesetzt, welches eine hohe Reaktivität gegenüber Peroxiden und anderen oxidativen Spezies besitzt. Es wird bei dieser Reaktion zu dem eigentlichen Fluorophor Dichlorfluorescein umgesetzt, welches sensitiv quantifiziert werden kann.

Kultivierte klonale HT22 Zellen wurden für die angegebene Zeit mit Glutamat und mit den zu testenden Substanzen behandelt. Anschließend wurden sie für 15 min mit 50 µM DCFA inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit frischem DMEM wurde die zelluläre Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Wallac 1420 Mehrkanalzähler) quantifiziert. Die Grenzwellenlänge des Anregungsfilters betrug 485 nm, die des Emissionsfilters 535 nm.

2.5.2 Hirnmembranperoxidation

Zur Messung antioxidativer Effekte auf membranäre Lipidperoxidationsprozesse wurde eine native kortikale Membranpräparation aus dem Gehirn der Ratte eingesetzt. Zerebraler Kortex männlicher adulter Ratten vom Stamm Sprague-Dawley wurde in einem dreifachen Volumen eines entgasten, nicht reduzierenden Lipidpuffers (20 mM TRIS pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 5 mM

KCl) mit einem Glasmörser homogenisiert. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Nach einer Zentrifugation (3000 g, 5 min) wurde das entstandene Pellet durch Ultraschallbehandlung in mit 0,5 M NaCl supplementiertem Lipidpuffer resolubilisiert, für 30 min inkubiert und anschließend wieder zentrifugiert (100'000 g, 20 min). Dieser Schritt wurde bis zum Erreichen eines weißen Pellets noch dreimal wiederholt, wobei Wasser statt Lipidpuffer verwendet wurde. Das letzte Pellet wurde mit Wasser solubilisiert, auf 5 mg/ml Protein eingestellt und durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Die Chemilumineszenz, die bei der Relaxation angeregter Zustände in Zuge der Lipidperoxidation entsteht, wurde als Meßparameter für die oxidative Zerstörung der Lipidmembran herangezogen. Hierzu wurde die Lipidpräparation mit PBS auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml Protein eingestellt und durch Ultraschallbehandlung solubilisiert. Nach Zugabe der Aminoacyllipide oder der Peptide zu den Aliquots (1 ml Endvolumen) wurde die oxidative Radikalkettenreaktion durch Zugabe von 50 µM Ascorbat bei 37°C gestartet. Die resultierende Chemilumineszenz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem Beckman LS 6500 Szintillationszähler gemessen.

2.5.3 Lipidvesikeloxidation

Oxidationslabile Lipidvesikel wurden aus Lecithin und Linolsäureethylester durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Hierzu wurden Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholin (DPPC) und Linolsäureethylester im Massenverhältnis 5:2 in Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter einem Stickstoffstrom bei 37°C evaporiert, und der entstandene Lipidfilm wurde mit entgastem Wasser, berechnet auf 5 mg/ml DPPC, für 1 h hydratisiert. Der hydratisierte Film wurde danach für mehrere Minuten unter Kühlung ultraschallbehandelt, wobei sich die weißliche Vesikelpräparation bildete.

Für die Oxidationsversuche wurden die Vesikel mit PBS auf 0,1 mg/ml DPPC eingestellt und mit 10 µM Kupfer-(II)-sulfat bei 37°C die Autooxidation der Vesikel eingeleitet. Die resultierende zeitabhängige Zunahme der Absorption Vesikelpräparation bei 234 nm wurde als Marker für die Bildung konjugierter Diene im Zuge der Oxidation des Linolsäureesters herangezogen (zum Mechanismus der Bildung konjugierter Diene siehe Abbildung 15). Die Stabilität der Vesikel während der Versuchsdauer von 6 h wurde durch Messung der unspezifischen Absorption bei 600 nm überprüft, und es konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

2.5.4 Linolsäureoxidation

Die direkte Oxidation einer reinen Linolsäure-Präparation wurde photometrisch durch Messung des Anstiegs der Absorption im Zuge der Oxidation bei 234 nm verfolgt. Hierzu wurde eine 1 mg/ml Lösung von Linolsäureethylester in Acetonitril mit 10 mM des lipophilen Peroxids tBuOOH mit oder ohne Zugabe der Aminoacyllipide bei 50°C inkubiert. Nach 4 h wurden die Proben UV/VIS-spektrophotometrisch vermessen. Die Resultate wurden auf entsprechende Kontrollen ohne Linolsäure normiert. Bei der phenolischen und indolischen längstwelligigen Absorptionsbande bei 280 nm ergaben sich keine Veränderungen im Zuge der Inkubation. Das gleiche galt für den sichtbaren Bereich.

2.5.5 LDL-Oxidation

Die Messung der Autooxidation von humanem *Low-Density Lipoprotein* (LDL) erfolgte durch photometrische Analyse der Bildung konjugierter Diene aus den enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Zuge der Oxidation.

Natives humanes LDL (6,0 mg/ml Protein in 150 mM NaCl, 0,01 % EDTA, pH 7,4) wurde mit PBS (120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Phosphat, pH 7,4) auf eine Konzentration von 100 µg/ml Protein sowie dann auf 0,5 mM MgCl₂ eingestellt. Die Autoxidation des LDL wurde durch Zugabe von 10 µM Kupfer-(II)-sulfat und Erwärmung auf 37°C gestartet. Die entsprechenden Konzentrationen der Peptide wurden zusammen mit dem Kupfersulfat zugegeben. Anschließend wurde die Zunahme der Absorption bei 234 nm für fünf Stunden mit einem Beckman DU 640 Spektrophotometer aufgezeichnet.

Als eine zweite, Schwermetall-unabhängige LDL-Oxidationsmethode wurde die direkte Oxidation des LDL mit dem Radikalinitiator 2,2'-azo-bis-(2-methylpropionamidin) (AIBN) eingesetzt. Hierzu wurde das mit PBS auf 0,2 mg/ml Protein eingestellte LDL mit 15 µM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt und nach Zugabe der Peptide mit 5 mM AIBN bei 37°C die Oxidationsreaktion initiiert. Nach jeweils 60 min wurden für insgesamt 5 h Aliquots von den Proben genommen, mit PBS um den Faktor 1:4 verdünnt und sofort photometrisch bei 234 nm vermessen.

2.5.6 Proteinoxidation

Zur Messung antioxidativer Effekte einer Substanz in wässrigem Medium wurde eine Methode der Oxidans-verursachten Bleichung der Fluoreszenz eines in unoxidiertem Zustand fluoreszierenden Proteins adaptiert. *Porphyridium cruentum* B-Phycoerythrin (10 nM) wurde durch Zugabe von 500 µM 2,2'-azo-bis-(2-methylpropionamidin) (AIBN) als Quelle freier

Peroxyradikale in PBS langsam unter An- oder Abwesenheit der zu testenden Verbindungen oxidiert. AIBN zerfällt thermisch zunächst in Methylpropionamidin-Radikale, die jedoch schnell mit im wäßrigem Puffer gelöstem Sauerstoff zu Peroxyradikalen reagieren, welche dann wesentlich langsamer die Proteinstruktur des Phycoerythrins angreifen, das dadurch seine Fluoreszenz verliert.

Dieser Fluoreszenzverlust wurde mittels eines Blitzlichtfluoreszenz-Meßprogramms mit zeitverzögerter Messung des emittierten Lichtes durch ein Fluoreszenz-Plattenlesegerät quantifiziert. Das Anregungsfenster lag bei 340 ± 50 nm, das Emissionsfenster bei 572 ± 6 nm, die Meßverzögerung betrug 25 μ s, und die Meßzeit pro Blitz betrug 30 μ s. Bei diesen Einstellungen wurde keine signifikante Photobleichung festgestellt.

Zur Messung antioxidativen Schutzes vor Peroxynitrit wurde eine Lösung von B-Phycoerythrin (20 nM) in Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) verwendet. Peroxynitrit wurde entweder direkt eingesetzt oder durch den Zerfall von 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) in situ erzeugt (Singh *et al.*, 1999). Peroxynitrit (200 mM) in alkalischer Natriumhydroxidlösung (1,18 M) wurde durch schnelles Vermischen mit der beschriebenen Phycoerythrinlösung so verdünnt, daß sich eine rechnerische Endkonzentration an Peroxynitrit von 100 μ M ergab. Der pH-Wert der erhaltenen Mischung wich nicht wesentlich vom pH-Wert der Ausgangslösung ab. Die Inkubation des Phycoerythrins mit einer entsprechenden Natriumhydroxidlösung mit oder ohne eine dem Peroxynitrit entsprechende Konzentration an Natriumnitrat hatte keinen Einfluß auf die Fluoreszenz des Phycoerythrins. Die Messung erfolgte 30 min nach der Reaktion.

Bei Verwendung von SIN-1 als Quelle von Peroxynitrit wurde das Phycoerythrin mit 1 μ M SIN-1 für 4 h bei 37°C inkubiert und begleitend fluorimetrisch vermessen. Jedes Molekül SIN-1 zerfällt unter sequentieller Freisetzung je eines Moleküls Stickstoffmonoxid und Superoxid, bei Abwesenheit höherer Konzentrationen von Elektronenakzeptoren wird aber davon ausgegangen, daß SIN-1 im wesentlichen eine Quelle von Peroxynitrit darstellt.

2.5.7 Oxidation von speziellen Indikatormolekülen

Luminol. Zur Messung der Aktivität von aus Stickstoffmonoxid entstehenden reaktiven Spezies wurde die lumineszierende Indikatorverbindung 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion (Luminol) eingesetzt. Bei Reaktion mit einer oxidierenden Stickstoff- oder Sauerstoffverbindung wie Peroxynitrit sendet Luminol Quanten im sichtbaren Bereich aus, die sich mit einem Photoelektronenvervielfacher quantifizieren lassen.

Zur primären Freisetzung von Stickstoffmonoxid wurde Sperminnonoat (10 μM) in mit Stickstoff gespültem und anschließend entgastem PBS bei 22°C gelöst. Die Aktivität der Peptidhormone zur Unterdrückung des dadurch induzierten Lumineszenzsignals von Luminol (20 μM) wurde nach 3 h Koinkubation in einem Szintillationszähler (eingestellt auf den Bereich sichtbaren Lichtes) gemessen und anschließend auf die entsprechenden Kontrollwerte normiert.

Hämoglobin. Eine 5 μM Lösung von humanem Blutplasma-Hämoglobin in PBS wurde mit 10 μM SIN-1 für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Oxidation des Hämoglobins wurde durch die Veränderung seines UV/VIS-Spektrums analysiert. Hämoglobin gilt als eine der wichtigsten physiologischen Senken für Peroxynitrit und andere reaktive Stickstoffspezies. Zur Kontrolle mit SIN-1 behandeltes LHRH wurde durch Inkubation einer 10 mM LHRH-Lösung mit einem dreifachen molaren Überschuss an SIN-1 über Nacht hergestellt.

2.6 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanzspektren wurden auf einem Spektrometer der Firma Bruker (ER-200 D-SRC, ausgerüstet mit einer TE 102 Meßzelle) aufgezeichnet. Die Meßparameter wurden auf die folgenden Werte eingestellt: Zentralfeld 3360 G, Feldmodulation 100 G, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0,8 G, Mikrowellenleistung 5 mW. Der Verstärkungsfaktor des Empfängers wurde auf 5×10^5 eingestellt. Bei einer Aquisitionszeit von 5 s pro Durchgang wurden generell 10 Spektren pro Probe akkumuliert, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur in Glaskapillaren mit einem inneren Durchmesser von 0,9 mm gemessen. Das typische Probenvolumen betrug 50 μl .

Die Aminoacyllipid-Proben für die ESR-Spektroskopie wurden durch Inkubation von 50 mM Aminoacyllipid, 50 mM N-*tert*-butyl- α -phenylnitron als Spinindikator (PBN), und 100 mM *tert*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) als Oxidans für 8 h bei 75°C in reinem Ethanol hergestellt. Bei den peptidischen Proben wurde als Spinindikator ebenfalls PBN (50 mM) verwendet, als Radikalinitiator jedoch die Substanz 1,1'-azo-bis-(1-cyanocyclohexan) (ACCH; 100 mM), da mit dieser symmetrischen Substanz klarere Massenspektroskopie-Resultate in den Vergleichsexperimenten zu erwarten waren. Die finale Lösungsmittelzusammensetzung war Acetonitril:Ethanol:Wasser 1:2:1. Zur Initiation der radikalischen Oxidationsreaktion wurden die Proben für 6 h bei 80°C inkubiert.

Bei den peptidischen Proben wurden die oben angegebenen Geräteeinstellungen geringfügig modifiziert. Die Modulationsamplitude betrug hier 2 G, die Verstärkung durch den Empfänger $2,5 \times 10^5$.

2.7 Massenspektroskopie

Die Elektronenspray-Ionisations-Massenspektren wurden auf einem Perkin Elmer API 150EX Massenspektrometer gemessen. Zur Applikation der einzelnen Proben wurden 5 μl der zu untersuchenden Lösung in eine kurze HPLC-Kapillare mit einem inneren Volumen von 10 μl eingespritzt. Zum Transfer des Probenmaterials in die Ionisationseinheit wurde die HPLC-Kapillare mit Acetonitril:Wasser 1:1, azidifiziert durch 0,1 % Ameisensäure, gespült. Die Flußrate des Elutionsmittels betrug 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die ESI-Massenspektren wurden bei der Firma Reseachem (Burgdorf, Schweiz) aufgenommen.

Die peptidischen Proben wurden wie im Absatz ESR-Spektroskopie beschrieben durch Oxidation der nativen Peptide mit ACCH in Acetonitril:Ethanol:Wasser hergestellt.

2.8 Chemische Berechnungen

Molekülmechanik- und semiempirische quantenchemische Berechnungen wurden mit Hilfe des Chem3D Software-Pakets durchgeführt. Geometrieoptimierungen wurden auf der Basis des in diesem Paket eingebauten MM2-Kraftfeldalgorithmus nach Allinger berechnet. Die semi-empirische Berechnung der verschiedenen quantenchemischen Molekülparameter (energetische Niveaux, Dipolmomente) sowie der abgeleiteten Größen wurde mit dem Unterprogramm MOPAC 97 durchgeführt. Als angenäherte Hamiltonfunktion wurde der AM1-Basissatz verwendet; bei der Berechnungen der Moleküle (und derer Radikale) wurde eine beschränkte, geschlossenschalige Wellenfunktion zugrundegelegt. Alle Moleküle wurden im Grundzustand berechnet.