

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Toxikologie

Kommissarische Leiterin: Prof. Dr. Helga Stopper

In vitro Untersuchungen zur

Genotoxizität von Insulin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annekathrin Leyh, geb. 22. September 1987

aus Würzburg

Würzburg, Mai 2015

Referentin: Prof. Dr. Helga Stopper

Korreferent: Prof. Dr. Martin Faßnacht-Capeller

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2016

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.	Einleitung	01
1.1.	Insulin	01
1.1.1.	Molekulare Struktur	01
1.1.2.	Biosynthese und Freisetzung	02
1.1.3.	Insulinsignalweg	02
1.1.4.	Regulation von Glukose- und Lipidmetabolismus	06
1.2.	Diabetes mellitus und assoziierte Erkrankungen	07
1.3.	Oxidativer Stress	09
1.3.1.	Abwehr gegen ROS	10
1.4.	Hyperinsulinämie und Krebs	10
1.5.	Antioxidantien	11
1.6.	Inhibitoren	12
2.	Zielsetzung	16
3.	Material und Methoden	17
3.1.	Materialien	17
3.1.1.	Zelllinien und Zellkulturreagenzien	17
3.1.2.	Chemikalien	17
3.2.	Methoden	18
3.2.1.	Zellkultur	18
3.2.2.	Lymphozytenisolation	18
3.2.3.	Genotoxizitätstests	19
3.2.3.1.	Vitalitätstest	19
3.2.3.2.	Comet Assay	20
3.2.3.3.	Mikrokerntest	22
3.2.4.	Mikroskopie	24

3.2.4.1.	Mikroskopische Bestimmung der Superoxid-Produktion	24
3.3.	Statistik	26
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Hep-G2 Zellen	27
4.1.1.	Genotoxizitätstests	27
4.1.1.1.	Versuchsreihen mit H ₂ O ₂ und MMS	27
4.1.1.2.	Genotoxizität von Insulin	29
4.1.1.3.	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schäden durch Tempol	33
4.1.1.4.	Glukose beeinflusst die Insulin-induzierte DNA-Schädigung	35
4.1.1.5.	Der Antioxidans und NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin verringert die DNA-Schädigung durch Insulinbehandlung	37
4.1.1.6.	Vas2870, ein NADPH-Oxidase-Inhibitor, verringert die DNA-Schädigung durch Insulin	39
4.1.1.7.	Der PI3K-Inhibitor Wortmannin reduziert die Genotoxizität von Insulin	41
4.1.1.8.	Die Blockierung des Insulinrezeptors senkt die Insulin-induzierte DNA-Schädigung	43
4.1.1.9.	Die Blockierung des IGF1- Rezeptors senkt die durch Insulin induzierte DNA-Schädigung	45
4.1.1.10.	Der mitochondriale Inhibitor Rotenone vermindert die Insulin-induzierte DNA-Schädigung	47
4.1.1.11.	Plumbagin schützt vor Insulin-induzierten DNA-Schädigungen	48
4.2.	HT29-Zellen	49
4.2.1.	Genotoxizitätstests	49
4.2.1.1.	Genotoxizität von Insulin	49
4.2.1.2.	Der PI3K- Inhibitor Wortmannin reduziert die Insulin-vermittelte DNA-Schädigung	55
4.2.1.3.	Die Blockierung des IGF1- Rezeptors senkt die durch Insulin induzierte DNA-Schädigung	56
4.2.1.4.	Der mitochondriale Inhibitor Rotenone mindert die Insulin-Induzierte Genomschädigung	57

4.2.2.	Oxidativer Stress	58
4.2.2.1.	Insulin erhöht den oxidativen Stress in HT29 Zellen	58
4.2.2.2.	Der oxidative Stress kann durch Inhibitoren gesenkt werden	59
4.3.	Lymphozyten	61
4.3.1.	Genotoxizitätstests	61
3.3.1.1.	Genotoxizität von Insulin	61
5.	Diskussion	65
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	72

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AKT	= PKB (Proteinkinase B)
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cytb	Cytochalasin b
DABCO	Diazabicyclooctan
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endo-plasmatisches Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum (Kälberserum)
FDA	Fluorescein Diacetat
GLUT4	Glukosetransporter 4
GRB2	Growth receptor bound protein 2
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
h	Stunde
HMP-Agarose	High Melting Point Agarose
HNMPA-(AM) ₃	Hydroxy-2-naphthalenylmethyl phosphonic acid acetoxymethyl ester
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IRS	Insulinrezeptorsubstrate
LMP-Agarose	Low Melting Point Agarose
M	Molar

mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute
MK	Mikrokerne
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMS	Methylmethansulfonat
ml	Milliliter
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O ₂ ⁻	Superoxid
OH ⁻	Hydroxylradikal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKD1	Proteinkinase-3-phosphoinositolabhängige Proteinkinase 1
PHA	Phytohämagglutinin
PI(3,4)P2	Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PPP	Picropodophyllin
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOCS	suppressors of cytokine signaling
SOD	Superoxiddismutase
Sos	son of sevenless protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 :	Insulinmolekül	01
Abb.2:	Der vereinfacht dargestellte Insulinsignalweg	05
Abb.3:	Chemische Struktur Tempol	12
Abb.4 :	Chemische Struktur Plumbagin	13
Abb.5a:	Comet Assay Hep-G2 Zellen, Kontrolle	21
Abb.5b:	Comet Assay Hep-G2 Zellen, 100nM Insulin	21
Abb.6:	Mikrokerntest mit Zugabe von Cytochalasin B	23
Abb.7a:	DHE-Färbung HT29 Zellen, Kontrolle	25
Abb.7b:	DHE-Färbung HT29 Zellen, 10nM Insulin	25
Abb.8a:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch H ₂ O ₂	27
Abb.8b:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch MMS	28
Abb.9a:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in Hep-G2 Zellen im Comet Assay	30
Abb.9b:	Konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest	30
Abb.10:	Zeitabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch Insulin im Comet Assay	32
Abb.11a:	Einfluss von Tempol auf die Insulin-induzierte DNA- Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay	33
Abb.11b:	Einfluss von Tempol auf die Insulin-induzierte DNA- Schädigung im Mikrokerntest in Hep-G2 Zellen	34
Abb.12a:	Einfluss von 15mM und 30mM Glukose auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay	36
Abb.12b:	Einfluss von 15mM und 30mM Glukose auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest	36
Abb.13a:	Einfluss von Apocynin auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay	38
Abb.13b:	Einfluss von Apocynin auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest	38

Abb.14a:	Einfluss von 10µM Vas2870 auf die durch 100nM Insulin induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay	40
Abb.14b:	Einfluss von 10µM Vas2870 auf die durch 2µM Insulin induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest	40
Abb.15a:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch 100nM Wortmannin im Comet Assay	42
Abb.15b:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch 100nM Wortmannin im Mikrokerntest	42
Abb.16:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des Insulinrezeptors	44
Abb.17:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des IGF1-Rezeptors in Hep-G2 Zellen	46
Abb.18:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Zugabe von 10nm Rotenone	47
Abb. 19:	Plumbagin schützt Hep-G2 Zellen vor Insulin-induzierter DNA-Schädigung	49
Abb.20a:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen	50
Abb.20b:	Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen	50
Abb.20c:	Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen	52
Abb.20d:	Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen	53
Abb.20e:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen	53
Abb.20f:	Zeitabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung bei Behandlung von HT29 Zellen mit 10nM Insulin	54
Abb.21:	Reduktion der Genotoxizität von Insulin durch Zugabe von Wortmannin in HT29 Zellen	55
Abb.22:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des IGF1-Rezeptors in HT29 Zellen	56
Abb.23:	Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Zugabe von Rotenone in HT29 Zellen	57

Abb.24a:	Superoxidproduktion in HT29 Zellen	58
Abb.24b:	Reduktion der Superoxidproduktion in HT29 Zellen durch Zusatz von Antioxidantien und Inhibitoren	60
Abb.25a:	Konzentrationsabhängige DNA–Schädigung durch Insulin in primären Lymphozyten nach 30 Minuten im Comet Assay	61
Abb.25b:	Konzentrationsabhängige DNA–Schädigung durch Insulin in primären Lymphozyten nach 16 Stunden im Comet Assay	62
Abb.25c:	Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in primären peripheren Lymphozyten im Mikrokerntest	63

Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach Behandlung mit H ₂ O ₂	29
Tab.2:	Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin	31
Tab.3:	Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit 100nM Insulin für 5, 15 und 30 Minuten, sowie 1, 2, 4 und 16 Stunden	32
Tab.4:	Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin und Tempol für 2 Stunden	34
Tab.5:	Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin und Glukose für 2 Stunden	37
Tab.6:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach Behandlung mit Insulin und Apocynin für 2 Stunden	39
Tab.7:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und Vas2780	41
Tab.8:	Vitalitätstest Hep-G2 nach 2-stündiger Behandlung mit Insulin und Wortmannin	43
Tab.9:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und HNMP-(AM) ₃	45
Tab.10:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und PPP	46
Tab.11:	Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit 100nM Insulin und 10nM Rotenone	48
Tab.12:	Vitalitätstest primärer Lymphozyten nach 30 minütiger Behandlung mit Insulin	63
Tab.13:	Vitalitätstest primärer Lymphozyten nach 16 stündiger Behandlung mit Insulin	64

1. Einleitung

1.1. Insulin

Insulin ist ein anaboles Peptidhormon, welches in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird. Es senkt die Blutglukosekonzentration und fördert die Bildung von Energiespeichern (Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten), verhindert deren Abbau und fördert das Zellwachstum [1,2].

1.1.1. Molekulare Struktur

Das Insulinmolekül besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren. Es wird durch zwei Polypeptidketten gebildet, die wiederum über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die A-Kette besteht aus 21 Aminosäuren (A1-A21), die B-Kette aus 30 Aminosäuren (B1-B30). Zwischen A7 und B7 befindet sich die erste, zwischen A20 und B19 die zweite Disulfidbrücke. Eine weitere Disulfidbrücke verbindet in der A-Kette A6 und A11 miteinander (Abb.1). Die A-Kette formt zunächst von A1 bis A7 ein spiralförmiges Segment, nach einer Wende folgt ein zweites spiralförmiges Segment (A14-A20), welches antiparallel zum ersten Segment verläuft. Der N-terminale Teil der B-Kette ist zu einer α -Helixstruktur geformt welche nach einer Wende von einem β -Bogen gefolgt wird. Ist das Insulinmolekül aktiv, so liegt es als Monomer vor, während der Biosynthese und der Speicherung als Dimer und in Anwesenheit von Zink als Hexamer [3].

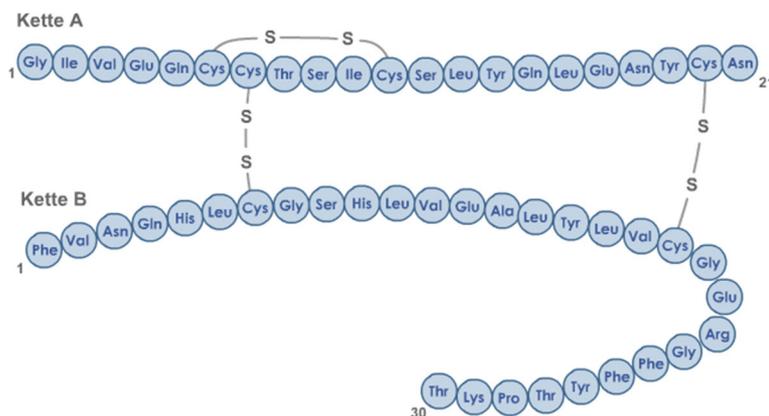


Abb.1: Insulinmolekül © www.pharmawiki.ch [4]

1.1.2. Biosynthese und Freisetzung

Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas produziert, gespeichert und auf gezielte Stimulation hin freigesetzt. Die erste Vorstufe des Insulins ist das Präproinsulin. Es besteht aus einem Signalpeptid, bestehend aus 24 Aminosäuren, gefolgt von der B-Kette, an die sich das C-Peptid und am Ende die A-Kette anschließen. Das Signalpeptid ermöglicht die Translokation des Präproinsulins vom Zytoplasma zum rauen Endo-plasmatischen Retikulum (ER). Dort gelangt es ins Lumen und unter Abspaltung des Signalpeptids kann Proinsulin entstehen. Im ER findet die Faltung des Moleküls statt. Die korrekten Disulfidbrücken zwischen A- und B-Kette werden hergestellt. Nach diesem Schritt gelangt das Proinsulin in Vesikeln zum cis-Golgi-Apparat. Dieser Transport ist ATP-abhängig. Durch Abspaltung des C-Peptids entsteht Insulin. Insulin, sowie das C-Peptid, bleiben solange in den β -Zellen des Pankreas gespeichert, bis es aufgrund eines spezifischen Signals zur Exozytose kommt. Die Granula gelangen zur Plasmamembran der β -Zelle, fusionieren mit dieser und entleeren ihren Inhalt in den Extrazellulärraum. Der physiologisch relevanteste Stimulus der Proinsulinsynthese ist ein steigender Blutglukose-spiegel. Weitere Stimuli sind Mannose, Ketonkörper, Wachstumshormone, ein erhöhter cAMP-Spiegel, Schwangerschaft und Übergewicht. Zu den hemmenden Faktoren zählen zum Beispiel Mannoheptulose, Fettsäuren und hohes Alter [5].

1.1.3. Insulinsignalweg

Das Insulinsignal aktiviert verschiedene intrazelluläre Pfade, die wiederum verschiedene biologische Prozesse kontrollieren. Hierzu zählen der Zellmetabolismus, das Wachstum und die Differenzierung. Die Insulinsignalkaskade beginnt mit der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor [6,7]. Der Insulin-rezeptor ist in allen Geweben von Wirbeltieren zu finden. Seine Anzahl in den verschiedenen Zelltypen variiert jedoch von zirka 40 Insulinrezeptoren in zirkulierenden Erythrozyten bis hin zu über 200.000 in Adipozyten und

Hepatozyten [8]. Er ist ein heterotetrameres Transmembranprotein und besteht aus zwei extrazellulären α - und zwei transmembranen β -Untereinheiten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Nach Bindung von Insulin an die α -Untereinheit des Rezeptors erfolgt eine Konformationsänderung im Rezeptor. Diese stimuliert die eigene intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheit des Rezeptors und autophosphoryliert diese Untereinheit. Der nun aktivierte Rezeptor phosphoryliert die Tyrosinreste einer Reihe von andockenden Substrate (z.B. IRS = Proteine der Insulinrezeptorsubstrat-Familie, Shc-Adapterprotein und Cbl), an die wiederum andere Substrate andocken und so komplexe intrazelluläre Signalwege in Gang setzen [2,6,7,]. Darunter der PI3-Kinase-Signalweg (Phosphatidylinositol 3-Kinase), die MAPK-Aktivierung (mitogen-activated protein kinase) und die Aktivierung des Cbl/CAP-Komplexes. Durch diese Mechanismen findet die Regulation von Glukose-, Lipid- und Proteinmetabolismus statt [9,10].

Viele entscheidende Wege beginnen mit der Phosphorylierung von Tyrosinresten der IRS-Proteine. Sie dienen als Adapter für weitere Proteine [10]. IRS interagieren wiederum mit der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3-Kinase. Die PI3-Kinase spielt eine essentielle Rolle für die Glukoseaufnahme in die Zelle. Sie ist ein heterodimeres Enzym, bestehend aus einer p85 regulierenden Untereinheit und einer p110 katalysierenden Untereinheit. Mit ihrer katalytischen Untereinheit (p110) phosphoryliert sie Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat (PI(3,4)P₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) [2,9]. Der nächste Schritt der Insulinkaskade ist die Rekrutierung von AKT (auch PKB = Proteinkinase B) zur Zellmembran. Zur Phosphorylierung von AKT ist allerdings noch die PDK1 (Proteinkinase-3-phosphoinositol-abhängige Proteinkinase-1) notwendig. Das nun aktivierte AKT gelangt weg von der Plasmamembran ins Zytoplasma und sorgt für die Phosphorylierung und so auch Inaktivierung der Glykogensynthasekinase-3 (GSK3). Durch diese Inaktivierung wird die Glykogensynthase nicht durch GSK3 gehemmt und die Glukosespeicherung in Form von Glykogen wird gefördert. Außerdem führt die Inaktivierung von GSK3 zur Dephosphorylierung von eIF-2B. Dies hat eine gesteigerte Proteinbiosynthese und die Speicherung von Aminosäuren zur Folge. Eine andere Aktivierung in der Insulinkaskade führt aber auch zur gesteigerten Proteinbiosynthese, die Aktivierung vom mTOR (mammalian target of rapamycin)

durch AKT. Eine sehr wichtige Aufgabe, die erfüllt wird, ist die Glukoseaufnahme in die Zelle. Wie oben beschrieben ist hierfür unter anderem die PI3K/AKT-Kaskade verantwortlich. Ein weiterer Weg, der zur Glukoseaufnahme führt, beginnt mit der Phosphorylierung von Cbl, welches mit dem Adapterprotein CAP assoziiert ist. Cbl interagiert mit dem Adapterprotein Crk, welches wiederum assoziiert ist mit der Rho-Familie (C3G). Im letzten Schritt kommt es zur Aktivierung von TC10, welches für die Translokation von GLUT4 (Glukosetransporter 4) zur Plasmamembran verantwortlich ist. GRB2 (growth receptor bound protein 2) kann sowohl mit IRS-Proteinen, als auch mit SHC interagieren. Dieses Adapterprotein (GRB2) enthält SH3-Domänen, welche mit sos (son of sevenless protein) assoziiert sind und die Aktivierung der MAPK-Kaskade und somit die mitogene Antwort auslösen [9,10].

Zu den negativen Regulatoren des Insulinsignalwegs gehört die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B). Sie katalysiert die Dephosphorylierung des Insulinrezeptors und seiner Substrate [7]. ROS (Reaktive Sauerstoffspezies), wie zum Beispiel H_2O_2 sind in der Lage die PTPase zu oxidieren und so zu inaktivieren [11]. PTEN (Phosphatase and tensin homologue) ist ein weiterer negativer Regulator des Insulinsignals. In Experimenten mit Zellkulturen fand man heraus, dass hohe Konzentrationen an PTEN die insulininduzierte $PI(3,4)P_2$ - und $PI(3,4,5)P_3$ -Produktion, die Akt-Aktivierung, sowie die GLUT4 Translokation zur Zellmembran inhibiert und somit die Glukoseaufnahme in die Zelle hemmt. Auch SHIP2 gehört zu den negativen Regulatoren. In hohen Konzentrationen vermindert es die $PI(3,4,5)P_3$ -Produktion, hemmt die Akt-Aktivierung, die GSK3-Inaktivierung und somit auch die aktive Glykogen-Synthetase. Ein letzter negativer Regulator ist die SOCS-Familie (suppressors of cytokine signaling). Sie binden an den Insulinrezeptor und sorgen für die Degradation von IRS-1 und IRS-2 [7,10].

In Abbildung 2 ist der wie oben beschriebene Insulinsignalweg vereinfacht schematisch dargestellt.

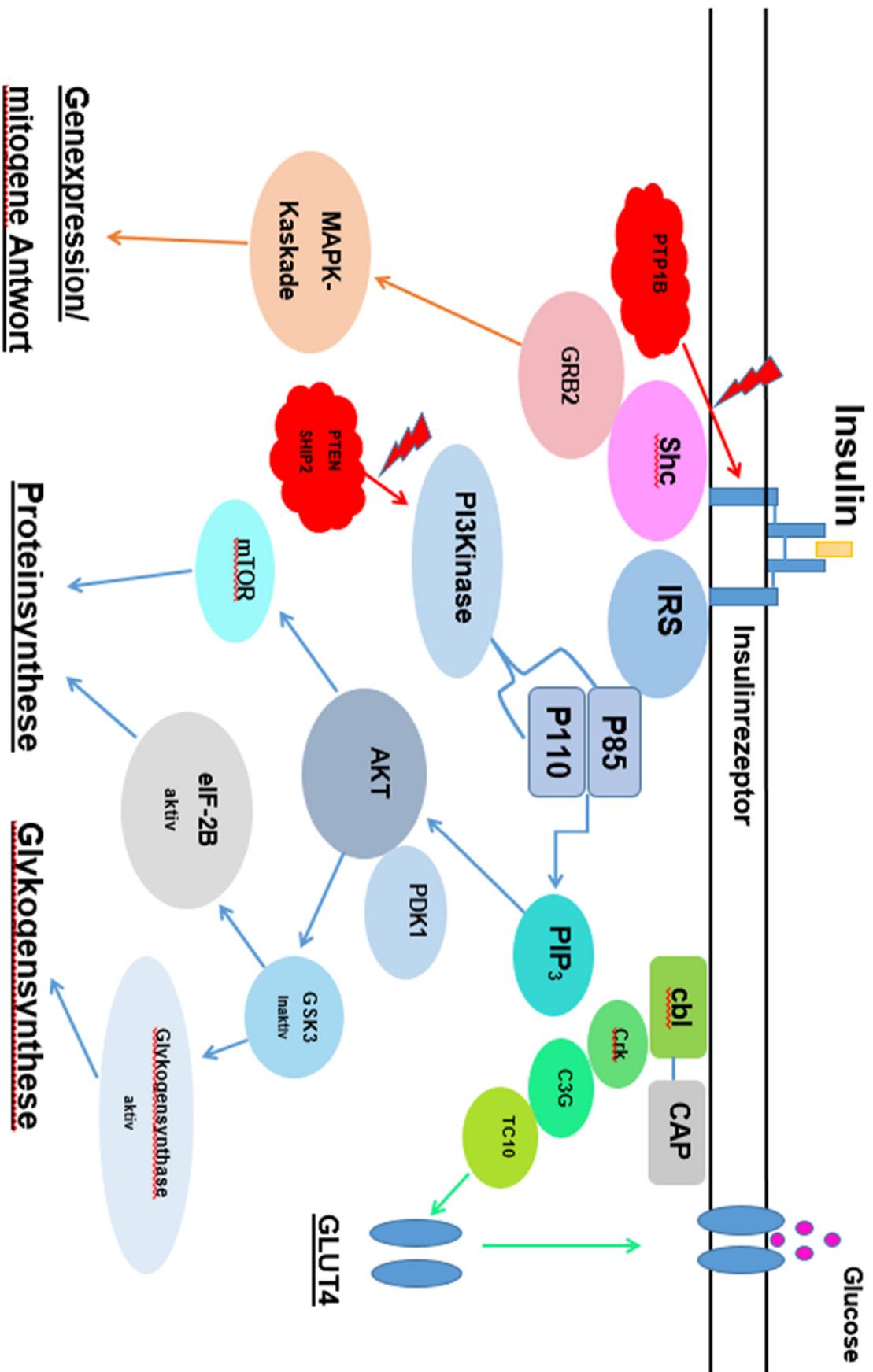


Abb.2: Der vereinfacht dargestellte Insulinsignalweg [7,9].

Fehlregulierungen innerhalb des Insulinsignalweges sind eng verbunden mit der Entwicklung einer Insulinresistenz. Sie ist ein Symptom des Diabetes mellitus Typ 2. Aber auch andere metabolische, endokrine und kardiovaskuläre Erkrankungen können in Zusammenhang mit Dysregulationen im Insulinsignalweg auftreten [12].

1.1.4. Regulation von Glukose-, Protein- und Lipidmetabolismus

Insulin ist das wahrscheinlich bekannteste und potenteste anabole Hormon des menschlichen Körpers. Es sorgt für die Speicherung und Synthese von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Im Gegenzug dazu inhibiert es deren Abbau und Freisetzung [2,7]. Weitere essentielle Aufgaben wie das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung werden durch Insulin gesteuert [12].

Insulin steuert die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe durch Stimulation des GLUT4-Transporters zur Translokation in die Plasmamembran. Dies ist der erste bedeutende Schritt für die Glukose-Homöostase. Ist diese Translokation vermindert, kann weniger Glukose aufgenommen werden, es kommt zur Hyperglykämie und somit zur Insulinresistenz.

Nach der Glukoseaufnahme stimuliert Insulin die Glykogensynthese in der Leber und inhibiert die Glykogenolyse, sowie die Gluconeogenese. So wird die Speicherung von Glukose gefördert und der Abbau von Glykogen (Speicherform der Glukose) gehemmt. Dies geschieht durch Aktivierung und Deaktivierung spezifischer Enzyme, welche für den Metabolismus entscheidende Rollen spielen. Weiterhin wird durch Insulin die Lipidsynthese gefördert und im Gegenzug dazu die Lipolyse gehemmt [7].

1.2. Diabetes mellitus und assoziierte Erkrankungen

Diabetes mellitus ist eine chronische metabolische Erkrankung, von der zirka 5% der Bevölkerung industrieller Staaten betroffen sind. Man unterteilt diese Krankheiten in zwei unterschiedliche Typen. Typ 1 ist mit einem absoluten Mangel oder einer starken Reduktion der Insulinproduktion assoziiert. Die Ursache ist eine autoimmune Destruktion der β -Zellen des Pankreas. Die Pathogenese des zweiten Typs, von dem mehr als 90% der Diabetiker betroffen sind, ist sehr komplex [7]. Diabetes mellitus Typ 2 ist gekennzeichnet durch eine Insulinresistenz, die der Körper in den ersten Jahren durch eine kompensatorische Insulinüberproduktion auszugleichen versucht. Erst nach Jahren bis hin zu Jahrzehnten kommt es zum Versagen der β -Zellen und somit zu einer reduzierten Insulinsekretion und zur Hypoinsulinämie [13,14]. Hauptrisikofaktoren für Diabetes mellitus Typ 2 sind Adipositas, Bauchfett und physische Inaktivität. Diese Risikofaktoren werden unter dem Begriff metabolisches Syndrom zusammengefasst [7,14]. In den letzten 20 Jahren ist die Anzahl der Menschen mit Übergewicht oder Adipositas in den westlichen, industrialisierten Ländern stark angestiegen. Zwei Drittel der Erwachsenen in den USA im Jahr 2000 sind übergewichtig oder adipös. Gleichzeitig ist die Inzidenz an Diabetes mellitus Typ 2 gestiegen. Man kann heute davon ausgehen, dass Adipositas eine bedeutende Ursache für Diabetes mellitus Typ 2 ist [15].

Beide Formen des Diabetes mellitus sind durch erhöhte Level an zirkulierender Glukose im Blut gekennzeichnet. Bestehen sie unbehandelt über längere Zeiträume sind beide Formen mit bestimmten Krankheiten assoziiert. Zu ihnen zählen zum Beispiel Retinopathie, Nierenleiden, Neuropathie und vaskuläre Erkrankungen [8]. Erhöhte endogene Hormonlevel, wie ein erhöhter Insulinspiegel bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 in den ersten Jahren der Erkrankung, können zur Schädigung des Genoms führen. Diese Schädigung wird zum einen durch den bekannten mitogenen Effekt von Insulin hervorgerufen sowie auch durch eine erhöhte ROS-Produktion. Othman et al. beschreiben in Ihrer Veröffentlichung die Induktion von DNA-Schädigung durch Insulin [16]. Erkrankungen wie zum Beispiel Kolon-, Brust- und Prostatakrebs, Polyzystisches

Ovarialsyndrom, aber auch Akne, ein frühes Auftreten der ersten Menstruation sowie ein Anstieg der Körpergröße durch hormonelle Interaktion werden mit Hyperinsulinämie verbunden [17]. Aber auch die Erkrankungen, die zum metabolischen Syndrom gezählt werden, wie Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Bluthochdruck, Dyslipidämie und die Neigung zu kardiovaskulären Erkrankungen stehen im Zusammenhang zum Typ 2 des Diabetes mellitus. Es existieren auch noch andere metabolische Abnormalitäten die typisch für den Diabetes mellitus Typ 2 sind. Hierzu zählt zum Beispiel die Fehlsteuerung der Blutkoagulation durch sehr hohe Levels an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 und Fibrinogen. Alle diese Veränderungen scheinen eine Umgebung zu schaffen, die vermehrt Risiken für die Entstehung von Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen und Nierenerkrankungen beinhaltet [18].

Eine für die Zahnmedizin wichtige Erkenntnis ist der Zusammenhang zwischen Parodontitis und Diabetes mellitus. Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronische Erkrankung mit gering entzündlichen Konditionen. Man kann bei Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, erhöhte Level an Entzündungsfaktoren, wie zum Beispiel an Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α feststellen. Diese Faktoren spielen bei der Pathogenese und der Progression eine entscheidende Rolle. Auch bei Parodontitis werden diese proinflammatorischen Zytokine freigesetzt. Bei dieser Erkrankung kommt es zur überdurchschnittlich erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und gewebeabbauenden Enzymen, welche die Knochenresorption fördern. Es wurde herausgefunden, dass beide Erkrankungen in wechselseitiger negativer Beeinflussung zueinander stehen. Die gesteigerte Anzahl an Entzündungsmediatoren im Blut fördert die Entstehung und Progression von Parodontitis, verringert aber auch die Empfindlichkeit des Insulinrezeptors, was zu einer Insulinresistenz führen kann. Aus diesem Grund ist eine gute Einstellung des Diabetes mellitus, sowie eine regelmäßige Parodontitistherapie die Grundvoraussetzung um beide Erkrankungen kontrollieren zu können [19].

1.3. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist ein Zustand mit erhöhtem Spiegel an ROS, welcher das endogene antioxidative System des Körpers überfordert [20].

ROS sind freie Radikale oder deren Vorgänger, die mindestens ein Sauerstoffatom besitzen. Im Fall der Radikale befinden sich auf ihrem äußersten Orbital einzelne oder mehrere ungepaarte Elektronen. Aufgrund dieser Tatsache sind sie sehr instabil und reaktionsfreudig. Zu den wichtigen Vertretern der ROS zählen das Hydroxylradikal (OH⁻), Superoxid (O₂⁻), und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Generierung von ROS kann durch exogene und endogene Faktoren ausgelöst werden. Zu den exogenen gehören zum Beispiel Tabakrauch, UV-Licht, und ionisierende Strahlung. [21,22]. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen aber auch aus endogenen Quellen. Superoxid wird zum Beispiel in phagozytischen Zellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet durch Aktivierung des respiratorischen Bursts während akuten oder chronischen Entzündungen. Das superoxidproduzierende System ist ein Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH)-Oxidase-Komplex. Die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies dienen der Zerstörung von Mikroorganismen. Andere Quellen für ROS sind Peroxisomen. Sie sind verantwortlich für den oxidativen Metabolismus von langen Fettsäureketten (β-Oxidation). Sie produzieren als Nebenprodukt Wasserstoffperoxid. Die mitochondriale Atmungskette ist ein weiterer Faktor, der beteiligt ist an der Entstehung von ROS. Ein geringer Prozentsatz (1-2%) der Elektronen, die die Elektronentransportkette passieren, durchsickert sie, verbindet sich mit molekularem Sauerstoff und bildet so ROS [22].

ROS können sowohl nützlich als auch schädlich für den Organismus sein. ROS sind in geringen Konzentrationen sehr wichtig für den Körper. Sie spielen eine Rolle bei der zellulären Antwort auf Noxen, wie zum Beispiel bei Infektionen, aber auch als second messenger bei der intrazellulären Signaltransduktion und der Induktion der mitogenen Antwort. Eine Überproduktion von ROS (durch zum Beispiel die mitochondriale Elektronentransportkette oder die NAD(P)H-Oxidase) führt zu oxidativem Stress. Er kann zu Schädigungen der Zellstrukturen, wie von Lipiden, Membranen, Proteinen und DNA führen. Diese Schädigungen stehen in Verbindung zu verschiedenen Erkrankungen wie kardiovaskulären

Erkrankungen, neurologischen Beschwerden, Diabetes, bestimmten Tumorarten sowie dem Alterungsprozess. Die richtige Balance zwischen Nutzen und Schaden der ROS ist für den Körper und seine Gesundheit essentiell [23].

1.3.1. Abwehr gegen ROS

Antioxidantien bieten Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Sie vermitteln die Reduktion der ROS zu Wasser [22,23]. Die Dismutation von Superoxid durch die Superoxiddismutase lässt das stabilere ROS Wasserstoffperoxid entstehen, welches anschließend in Wasser umgewandelt wird durch die Katalase und die Glutathion-Peroxidase [20].

Nicht-enzymatische Antioxidantien sind zum Beispiel die Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion und Karotinoide. Sie ergänzen die Tätigkeit der Enzyme und sind in der Lage ROS zu neutralisieren und werden entweder durch Zellen gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen [22,23].

Dies sind die ersten Abwehrmechanismen gegen ROS. Sollten diese Abwehrmechanismen nicht greifen, besitzt der Körper Enzyme, die oxidativ geschädigte Moleküle reparieren können. Die dritte Möglichkeit der Abwehr besteht in der Einleitung der Apoptose von irreversibel geschädigten Zellen [22].

1.4. Hyperinsulinämie und Krebs

Epidemiologische Studien zeigen, dass das Risiko an bestimmten Krebsarten (Pankreas, Leber, Brust, Darm, Urogenitaltrakt und weiblichen Reproduktionsorganen) zu erkranken bei Patienten mit Diabetes erhöht ist. Die stärkste Verbindung wurde zwischen Diabetes mellitus Typ 2 und Leber- sowie Pankreaskarzinomen beschrieben. Denn Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas gebildet und gelangt durch die portale Blutzirkulation zunächst in die Leber. Da in der Anfangszeit der Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung die Insulinresistenz durch kompensatorische Insulinüberproduktion versucht wird

auszugleichen, werden Leber- und Pankreaszellen sehr viel höheren Konzentrationen an Insulin ausgesetzt als andere Körperzellen. Es wird auch darüber diskutiert, ob Diabetes direkt oder diabetesassoziierte Zustände, wie zum Beispiel Adipositas, Hyperglykämie, freie Fettsäuren im Blut, die chronische Entzündung oder oxidativer Stress das Krebsrisiko erhöhen [24].

Veröffentlichungen, wie von Giovannucci et al., beschreiben, eine Verbindung zwischen Hyperinsulinämie oder anderen Faktoren, die mit Insulinresistenz in Verbindung stehen wie z.B. Hyperglykämie oder Hypertriglyceridemia und der Karzinogenese von Kolonkarzinomen [25].

Neale et al. berichtet von einer Beziehung zwischen Diabetes und Adenokarzinomen des Oesophagus [26].

Wichtige Risikofaktoren für eine Diabetes mellitus Erkrankung vom Typ 2 stellen starkes Übergewicht sowie Adipositas dar. Dieses Risiko geht mit Veränderungen im Metabolismus von Hormonen einher (u.a. von Insulin) und kann so zum Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose führen. Deshalb scheint eine Reduktion des Körpergewichts bei adipösen Patienten ein wichtiges Ziel in der Prävention von Diabetes mellitus und bestimmter Krebsarten zu sein [27].

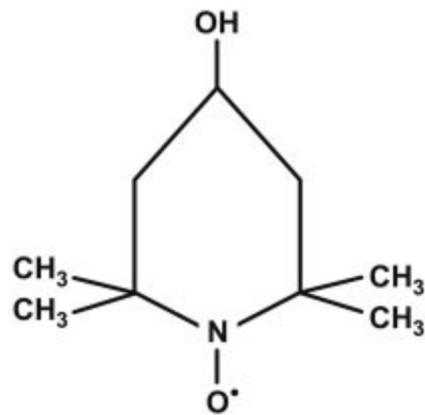
Bei Menschen mit Diabetes mellitus liegen, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird, über die Norm erhöhte Level an ROS vor. ROS induzierte DNA-Schäden können Einzel- und Doppelstrangbrüche, Purin-, Pyrimidin- und Desoxyribose-Modifikationen, sowie DNA-cross-links sein. Werden diese Schäden nicht repariert, kommt es zur Replikation des Fehlers und somit zu genetischer Instabilität. Diese Instabilität ist mit der Entstehung von Tumoren assoziiert [23].

1.5. Antioxidantien

In dieser Arbeit kommen einige Antioxidantien zum Einsatz, mit welchen getestet wurde, inwieweit sie sich protektiv auf die ungünstigen Effekte von sehr hohen Insulinkonzentrationen auswirken. Othman et al. belegten in ihrer Veröffentlichung auch, dass die Anwesenheit von Antioxidantien die DNA-Schädigung durch Insulin reduzieren kann [16].

Tempol

Tempol (4-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) ist ein stabiles Nitroxid (Abb.3). Es ist bekannt als membranpermeables Antioxidans und agiert als freier Radikalfänger [28].



Tempol

(4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)

Abb.3: chemische Struktur Tempol [29].

1.6. Inhibitoren

Wortmannin

Wortmannin ist ein pharmakologischer Inhibitor der PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase). Er blockiert die insulinstimulierte Translokation vom GLUT4-Transporter zur Zelloberfläche und so die Glukoseaufnahme in die Zellen [7].

Plumbagin

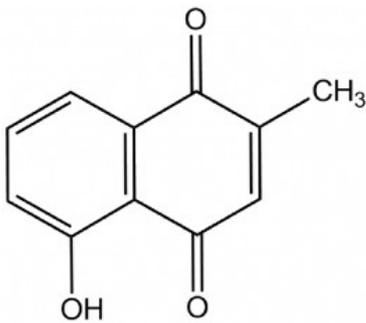


Abb.4: chemische Struktur Plumbagin [30]

Aus der indischen Bleiwurz (*Plumbago zeylanica* Linn) wird der Wirkstoff Plumbagin (5-hydroxy-2 methyl-1,4-naphthoquinone) gewonnen. In der orientalischen Medizin und der indischen Ayurveda wird er zur Behandlung von Beschwerden wie allergischen Reaktionen und mikrobiellen Infektionen genutzt. Plumbagin zeigt präventive, antiproliferative und apoptotische Effekte gegenüber dem Wachstum von Krebszellen. Es hemmt die Adhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen. Eine weitere Eigenschaft von Plumbagin ist die Inhibierung der NADPH-Oxidase. Diese Wirkung ist für die später folgenden Experimente von Bedeutung [30].

Apocynin

Apocynin (4-Hydroxy-3-Methoxy-Acetophenone) ist Bestandteil des himalayanischen Krauts *Picrorhiza kurroa* Royle (*Scrophulariaceae*). Es ist bekannt als Inhibitor der NADPH (Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat)-Oxidase und wird häufig als Antioxidans genutzt.

Durch die Inhibierung der NADPH-Oxidase, welche eine Hauptquelle für die Entstehung von ROS ist, wird die Bildung des Superoxid-Anions reduziert. Studien berichten, dass oxidativer Stress in der Lage sein kann durch die Aktivierung des NF- κ B (nuclear factor kappa-B) Entzündungen zu induzieren. Diese Studien belegen auch, dass Antioxidantien, wie Apocynin, diese Aktivierung unterdrücken und so Entzündungen hemmen können. Apocynin kann

außerdem die Anzahl der Entzündungsfaktoren (TNF- α , IL-6, Leptin) in Blut, Leber und Fettgewebe herabsetzen und ist so auch in der Lage die Insulinresistenz zu verbessern. Denn man weiß heute, dass Entzündungen im Körper über längere Zeiträume eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Insulinresistenz spielen [31].

Rotenone

Mitochondrien sind bedeutende Quellen für die Entstehung von ROS. Um diese Quellen zu inhibieren wurde für einige Experimente Rotenone genutzt. Rotenone ist ein natürlich vorkommendes Isoflavonoid, welches in Blättern und Wurzeln tropischer Pflanzen der Gattungen Derris, Lonchocarpus und Tephrosia produziert wird. Es ist hydrophob und passiert aufgrund dieser Eigenschaft sehr einfach biologische Membranen. Seine Wirkung besteht in der nichtkompetitiven Inhibierung des mitochondrialen Komplexes I der Atmungskette [32,33].

VAS2870

VAS2870 inhibiert die NADPH-Oxidase und blockiert so die Produktion von ROS. Dieser inhibitorische Effekt von Vas2870 auf die Nox-Enzyme ist nicht isoformspezifisch. Die Nox-Familie der NADPH-Oxidase beinhaltet 7 verschiedene Enzyme, deren Hauptfunktion es ist ROS zu produzieren [34].

Insulinrezeptorblocker

Um den Insulinrezeptor zu blockieren wurde HNMPA-(AM)₃ genutzt. Es handelt sich dabei um einen Antagonist des Insulinrezeptors. Durch seine Bindung an den Rezeptor ist dieser für die Bindung mit Insulin blockiert [16].

IGF1-Rezeptorblocker

Liegen pathophysiologische Insulinlevel vor, so kann Insulin auch an den IGF1-Rezeptor binden [13].

Der IGF1-Rezeptor ist dem Insulinrezeptor strukturell sehr ähnlich. Er besteht aus zwei heterodimeren Untereinheiten, welche intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen. PPP (Picropodophyllin) ist ein Mitglied der Cyclolignan-Familie und Inhibitor des IGF1-Rezeptors. Er blockiert die Phosphorylierung des IGF1-Rezeptors ohne dabei den homologen Insulinrezeptor zu beeinflussen [35,36].

2. Zielsetzung

Es besteht die Annahme, dass unter Hyperinsulinämie mehr reaktive Sauerstoffspezies produziert werden, als dies unter physiologischen Bedingungen der Fall ist. Liegen solche pathologisch erhöhten ROS-Levels vor, existieren mehr ROS als für die Signalkaskade erforderlich wäre und auch mehr als das zelluläre Abwehrsystem inaktivieren kann.

Um beurteilen zu können, ob Insulin eine mögliche Rolle in der Transformation von primären Zellen zu Tumorzellen und somit zur Progression zu einem malignen Status der Zellen beiträgt, analysierte ich das Potential von Insulin in vitro oxidativen Stress und DNA-Schäden hervorzurufen.

Wir nutzten pathophysiologische Insulinkonzentrationen und untersuchten, ob auch sie schon in der Lage sind DNA-Schädigungen zu induzieren.

Weiterhin wurde untersucht, ob Radikalfänger, wie zum Beispiel Tempol, oder auch Inhibitoren bestimmter ROS-Produktionsquellen oder des Insulinsignalweges in der Lage sind, diese schädigende Wirkung durch Insulin aufzuheben bzw. zu vermindern.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Zelllinien und Zellkulturreagenzien

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedenen Zelllinien genutzt. HepG2-Zellen, humane Leberkarzinomzellen, und HT29-Zellen, humane Kolonkarzinomzellen, welche von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MO; HPACC, Salisbury, UK) bezogen wurden.

Als humane Primärzellen wurden primäre periphere Lymphozyten für einige Versuche herangezogen.

Alle Zelltypen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Das Medium für HT29-Zellen bestand aus Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM, 4,5 g/l Glukose) ergänzt durch 10% Kälberserum (FBS), 1% L-Glutamin und 0,4% Antibiotika (50 U/ml Penicillin, 50mg/ml Streptomycin).

Ein Medium, hergestellt aus Dulbecco's modified Eagle medium low glucose (DMEM, 1g/l Glukose), 10% Kälberserum (FBS), 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 0,4% Antibiotika (50 U/ml Penicillin, 50mg/ml Streptomycin) diente der Kultivierung der Hep-G2 Zellen.

HT29- und HepG2-Zellen wurden zwei bis drei Mal pro Woche subkultiviert.

Das Medium für die Lymphozyten setzt sich zusammen aus RPMI 1640 Medium, 15% Kälberserum, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 0,4% Antibiotika (50 U/ml Penicillin, 50mg/ml Streptomycin) sowie 0,1% Tylosin zusammen.

3.1.2. Chemikalien

Es kamen zur Anwendung: humanes Insulin und PPP (sc-204008) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland), Tempol, Apocynin, Rotenone, Wortmannin, Histopaque 1077 und Lectin/ PHA L8902 der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Vas 2870 von Vasopharm GmbH (Würzburg, Deutschland), HNMPA-(AM)₃ von Enzo life science (Lörrach, Deutschland), Dihydroethidium (DHE) von Merck Bioscience GmbH (Schwal-

bach, Deutschland). Von Biotrend (Köln, Deutschland) wurde Gel Red, Gel Green und Plumbagin bezogen, Zellkulturmedien und Reagenzien stammten von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) und Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland).

Die im Text nicht weiter beschriebenen Basis-Laborchemikalien stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, München), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) und PAA (Pasching, Österreich).

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturen

Die adhärennten Zelllinien HepG2 und HT29 wurden zwei bis drei Mal pro Woche subkultiviert. Hierzu wurde das Medium verworfen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die 5 minütige Inkubation mit 0,25% Trypsin bei 37 °C und 5% CO₂. Durch diesen Schritt lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Der Vorgang wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zell-Medium-Suspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Zellpellet wurde frisches Medium gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauerkammer, anschließend wurden die Zellen neu ausgesät.

3.2.2. Lymphozytenisolation

10 ml frisches Vollblut wurde in Heparin EDTA-Röhrchen aufgenommen. Die Isolation der Lymphozyten erfolgte durch Pipettieren des frischen Blutes in ein Zentrifugenröhrchen, in dem sich das gleiche Volumen Histopaque befand. Dieser Schritt musste sehr langsam und vorsichtig durchgeführt werden damit sich die beiden flüssigen Phasen nicht vermischten. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation bei 1600 U/min. Mittels Pasteurpipette wurde die dünne Lymphozytenschicht isoliert und in ein frisches Zentri-

fugenröhrchen gegeben. 10ml Lymphozytenmedium wurde auf die isolierten Lymphozyten gegeben. Zwei weitere Male erfolgte die Zentrifugation der Zellen mit frischem Medium. Diesmal für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 U/min. Danach wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in 24-Well-Plates platziert. In jedes Well wurde PHA (Phytohämagglutinin) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. PHA diente zur Stimulation der Proliferation. Nach 42–44 Stunden, bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen 30 Minuten bzw. 16 Stunden für den Comet Assay mit 10nM und 100nM Insulin behandelt und für den Mikrokerntest für 16 Stunden mit 10nM und 100nM Insulin. 24 Stunden vor dem Ablösen der Zellen für den Mikrokerntest erfolgte die Zugabe von 3µg/ml Cytochalasin B.

3.2.3. Genotoxizitätstests

3.2.3.1. Vitalitätstest

Zum Nachweis, dass die verwendeten Substanzkonzentrationen keinen zytotoxischen Effekt haben, wurden behandelte Zellen für den Comet Assay und den Mikrokerntest auch für den Vitalitätstest herangezogen.

So konnte man sicherstellen, dass entstandene Schädigungen genotoxisch sind und nicht lediglich über Zelltod vermittelt sekundär auch geschädigte DNA detektierbar war.

Hep-G2-Zellen wurden wie für den Comet Assay 2 Stunden oder wie für den Mikrokerntest 4 Stunden behandelt. Ausnahme bildete lediglich der zeitabhängige Comet Assay. Hier variierten die Behandlungszeiten zwischen 5 Minuten und 16 Stunden.

Nach dem Ablösen der Zellen wurden 70µl der Zellsuspension mit 30µl Vitalitätsfärbelösung (FDA 30µg/ml + Gel Red 1µl/ml) gefärbt. 20µl der Zellfärbelösung wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Vitale Zellen nehmen das farblose Fluoresceindiacetat auf, aktivieren es mittels Esterasen zum grünen Fluorescein und erscheinen somit unter dem Mikroskop grün, tote Zellen werden durch das Gel Red, das intakte Membranen lebendiger Zellen erst nach viel längerer Zeit durchdringt, rot gefärbt. Pro Konzentration

wurden 200 Zellen ausgezählt und die Vitalität in Prozent angegeben. Die Auswertung erfolgte mit einem Eclipse 55i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit 200-facher Vergrößerung.

3.2.3.2. Comet Assay

Der Comet Assay ist ein Standardtest zur Detektion von DNA-Schäden in eukaryotischen Zellen [37]. Wie von Singh et al. beschrieben, erlaubt dieser Test unter alkalischen Bedingungen die Feststellung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabilen Stellen.

Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Zellen abgelöst und zentrifugiert (1000 U/min, 5min), der Überstand verworfen und 20µl der Zellsuspension zu 180µl 0,5% Low-Melting-Point Agarose (LMP-Agarose) gegeben. 45µl von dieser Suspension wurden auf einen mit 1,5% High-Melting-Point Agarose beschichteten Superfrost-Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Von jeder Konzentration wurden zwei Objektträger angefertigt. Nachdem sich die Suspension etwas verfestigt hatte, wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger für 1 Stunde bei 4°C in die Lyselösung (Lysepuffer: 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 10g/L Na-Sarcosinat eingestellt auf pH 10 durch Zugabe von NaOH; Lyselösung: 66.5ml Lysepuffer, 7,5ml DMSO, 0,75ml Triton X-100) gegeben. Dieser und die nächsten Schritte erfolgten unter Ausschluss von Licht. Die Objektträger wurden nach Ablauf der Stunde gewaschen und horizontal in eine mit Eis gekühlte Elektro-phoresekammer eingelegt. In diese Kammer wurde frischer Elektro-phoresepuffer (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) eingefüllt. Nach 20 Minuten in denen die DNA-Abwicklung und die Expression von alkalilabilen Stellen stattgefunden haben, erfolgte die Elektrophorese. Sie wurde im selben Elektrophoresepuffer durchgeführt bei 25V und 300mA für 20 Minuten. Zur Neutralisation wurden die Objektträger in 0,4M Tris-Puffer (pH 7,5) gewaschen und anschließend für 10 Minuten in Methanol bei -20°C fixiert. Nach dem Trocknen im Inkubator bei 37 °C konnten die Objektträger gefärbt und ausgewertet werden. Zur Färbung wurden je Objektträger 20µl einer Gel Red/DABCO-Lösung (1:3) verwendet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Labophot 2, Nikon, Germany) bei 200-facher Vergrößerung 50 Zellen pro Objektträger. Zur

Auswertung wurde Image Analysis Software (Komet 5, BFI Optilas, Germany) genutzt.

Die Quantifizierung der DNA-Schäden erfolgte durch Angabe des Prozentsatzes der DNA, welcher sich in der Schweifregion des Kometen befand [38].

Die Abbildungen 5a und 5b zeigen repräsentative Bilder für den Comet Assay.

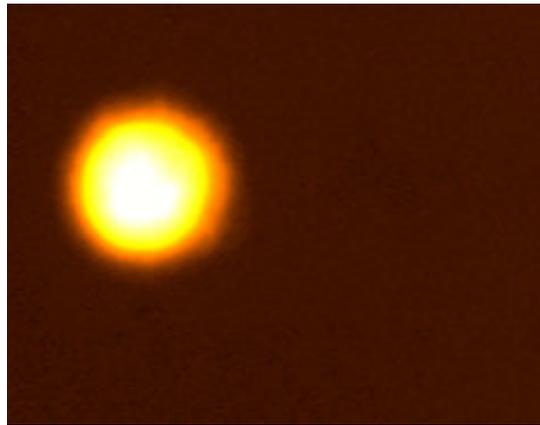


Abb.5a: Comet Assay Hep-G2 Zellen, Kontrolle

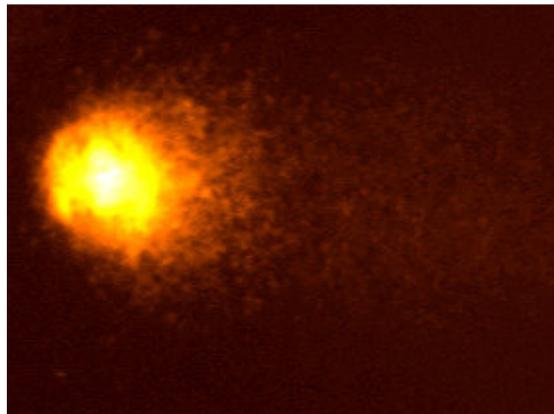


Abb.5b: Comet Assay Hep-G2 Zellen, 100nM Insulin

3.2.3.3. Mikrokerntest

Der Mikrokerntest dient zur Detektion von chromosomalen Schäden. Mikrokerne entspringen hauptsächlich azentrischen Chromosomenfragmenten, azentrischen Chromatidfragmenten oder ganzen Chromosomen, welche nicht in den Tochterkern eingeschlossen sind. Diese falsch platzierten Chromosomen oder Fragmente sind von einer Membran umgeben. Ihre Größe ist kleiner als die des Hauptkerns, ihre Morphologie und Färbeintensität sind identisch [39].

Für die Lymphozyten und ein Teil der Experimente mit HT29-Zellen wurde der Mikrokerntest durchgeführt wie von Fenech et al. 2000 beschrieben. Im CBMN- (cytokinesis-block mikronucleus) Assay durchlaufen die Zellen eine Kernteilung. Die Zytokinese wird aber durch Zugabe von 3µg/ml Cytochalasin B blockiert. In diesem Fall wurden nur Mikrokerne in doppelkernigen Zellen ausgewertet [40].

Hep-G2 Zellen wurden nicht mit Cytochalasin B inkubiert. Aus diesem Grund wurden hier die Mikrokerne pro einkernige Zellen angegeben.

Die Substanzbehandlung erfolgte an 1×10^5 Zellen/ml in 5ml Medium. Nach 4 Stunden Behandlungszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und neues Medium wurde zugefügt. Dieser Schritt wurde sowohl bei Hep-G2, als auch bei HT-29-Zellen durchgeführt. Da Lymphozyten keine adhären Zellen sind, brauchten sie nicht gewaschen (von Trypsinlösung befreit) zu werden. Ihnen wurde wie auch den HT29-Zellen nach Mediumwechsel für 20-22 Stunden eine Cytochalasin B-Konzentration von 3µg/ml zugefügt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen abgelöst. Alle anderen Schritte wurden für alle Zelllinien gleichermaßen durchgeführt. Die Zellen wurden abgelöst und daraufhin auf Objektträgern durch den Cytospin (Zytozentrifuge) platziert. Danach folgte die mindestens 2 stündige Lagerung der Objektträger in Methanol bei -20°C.

Den 5 Tage mit Insulin behandelten Zellen wurde täglich 50% des Mediums ausgetauscht und frisches Insulin zugegeben. Wegen des frisch zugegebenen Insulins variierten die Konzentrationen zwischen 0,5-1nM, 1-2nM und 10-20nM in der Kultur während der Behandlungszeit. Die Behandlung der Lymphozyten betrug 16 Stunden. Zunächst wurden 1×10^6 Zellen/ml ausgesät, die für 42-44 Stunden mit PHA stimuliert wurden. Die Auswertung erfolgte für alle Zelllinien gleichermaßen.

Vor der Auswertung wurden die Objektträger 8 Minuten mit Gel Green (10µl Stocklösung in 990µl destilliertes Wasser) gefärbt, zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10µl DABCO und einem Deckgläschen bedeckt. Für jede Konzentration wurden zwei Objektträger angefertigt. Es folgte die Auswertung von 1000 Zellen pro Objektträger. Dabei wurden einkernige Zellen, doppelkernige Zellen, mehrkernige Zellen, Apoptosen und Mitosen erfasst. Mikrokerne wurden entweder pro 1000 einkernige- (HepG2-Zellen oder HT29-Zellen) oder pro 1000 doppelkernige (HT29-Zellen oder Lymphozyten) Zellen erfasst. In Abbildung 6a ist ein repräsentatives Bild eines Mikrokerntests mit doppelkernigen Zellen dargestellt. Als Maß für den genomschädigenden Einfluss einer Substanz kann die Anzahl der Mikrokerne angesehen werden [41]. Die Auswertung erfolgte mit 400-facher Vergrößerung mit dem Nikon Eclipse 55i bzw. Nikon TE-2000-E.

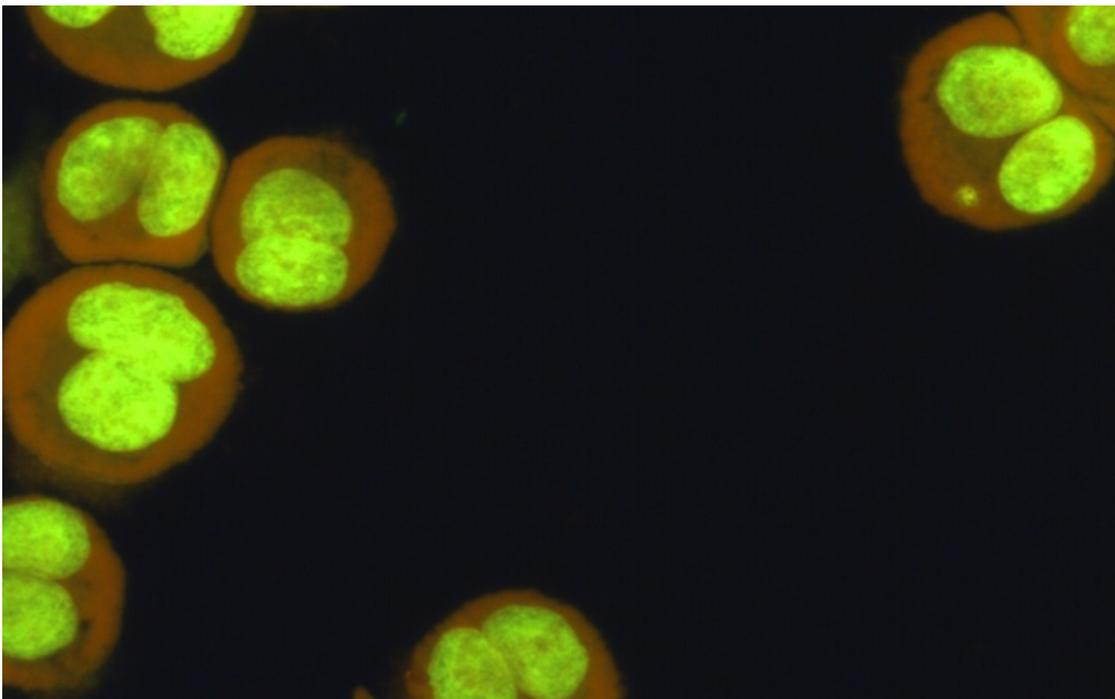


Abb.6: Mikrokerntest mit Zugabe von Cytochalasin B

HT29 Zellen wurden für den Mikrokerntest 4 Stunden mit 10nM Insulin behandelt, der Mikrokernel ist im Zytoplasma der rechts oben befindlichen Zelle zu erkennen.

3.2.4. Mikroskopie

3.2.4.1. Mikroskopische Bestimmung der Superoxid-Produktion

Um die Superoxidproduktion in HT29-Zellen nach Behandlung mit Insulin alleine oder in Kombination mit Inhibitoren nachzuweisen, wurde das zellpermeable, fluorogene DHE (Dihydroethidium) genutzt. Einen Tag vor Durchführung des Experiments wurden je 2×10^5 Zellen auf ein 24mm im Durchmesser großes Deckgläschen in 6-Well Plates in 3 ml Medium ausgesät.

Unter Ausschluss von Licht wurden 10 μ M DHE, Insulin, Antioxidantien und Inhibitoren für 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C zu den Zellen gegeben. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter dem Eclipse 55i Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und eine Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) erstellte Bilder bei 200-facher Vergrößerung. Alle aufgenommenen Fotos wurden bei gleicher Belichtungszeit unter Anregung mit UV-Licht angefertigt. Die Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der Grauwerte von 200 Zellen pro Konzentration mit Image J 1.40g (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

In der Literatur wird dieser Farbstoff am häufigsten mit einer Wellenlänge von 520 ± 10 nm angeregt. Dies ermöglicht die Detektion von mindestens zwei Oxidationsprodukten durch DHE. Die hier durchgeführte Anregung mit UV-Licht ist spezifisch für das Superoxid-DHE-Reaktionsprodukt [42,43]. In den Abbildungen 7a und 7b kann man die Anregung der mit DHE behandelten Zellen unter UV-Licht sehen. In der Kontrolle (Abb.7a) kann man von einer normalen zellulären Superoxidproduktion ausgehen. Hier ist hauptsächlich die blaue zytoplasmatische Färbung erkennbar. In Abb. 7b wurden HT29-Zellen mit 10nM Insulin behandelt. Die Rotfärbung im Kern der Zellen deutet auf eine erhöhte Superoxidproduktion verglichen mit der Kontrolle hin.

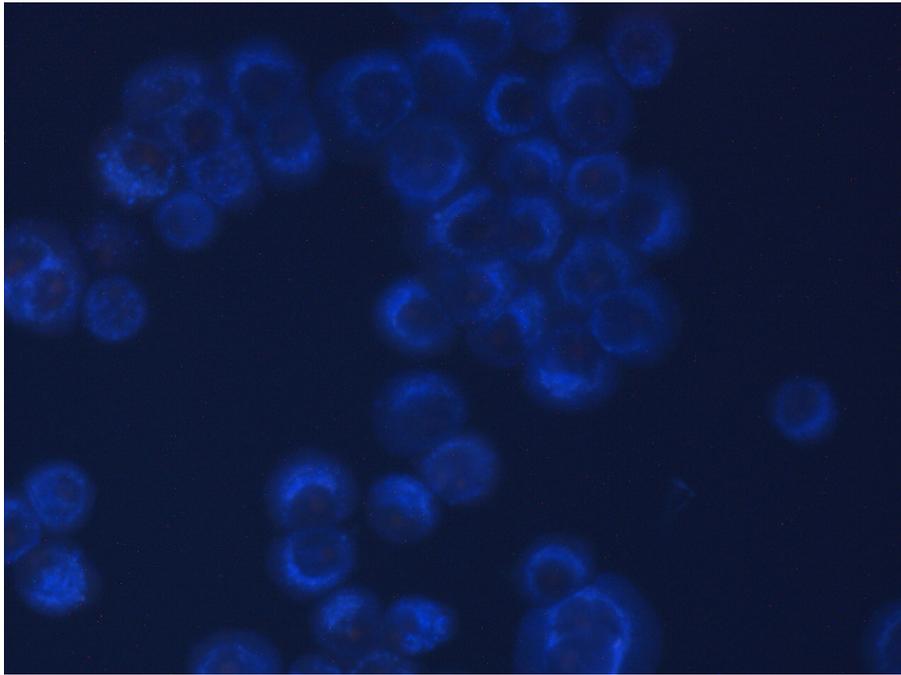


Abb.7a: DHE-Färbung HT29 Zellen, Kontrolle

HT29 Zellen zeigen eine blaue zytoplasmatische Färbung, superoxidinduzierte Rotfärbung im Zellkern ist kaum erkennbar

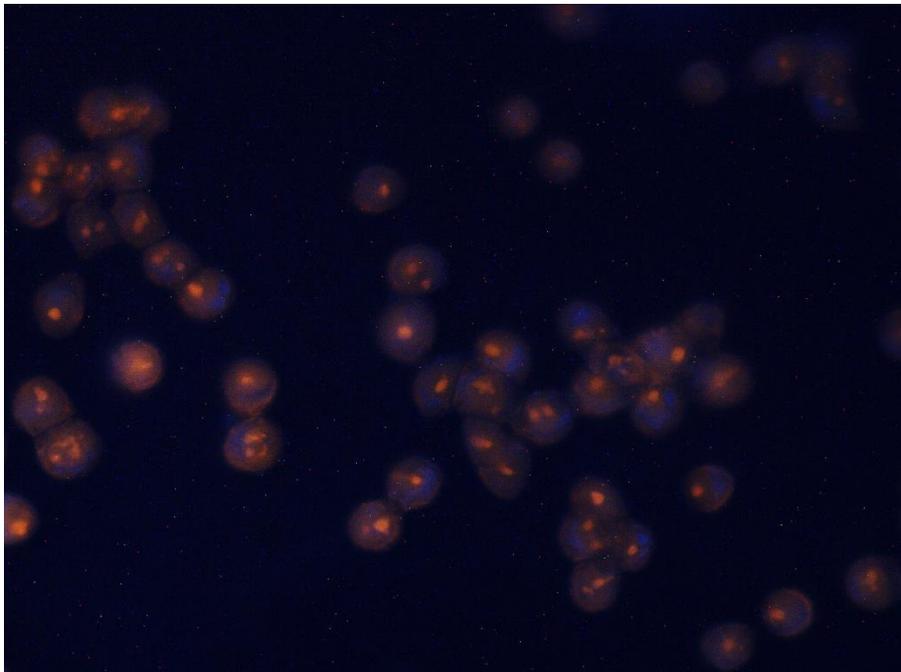


Abb.7b: DHE-Färbung HT29 Zellen, 10nM Insulin

HT29 Zellen zeigen eine deutliche superoxidinduzierte Rotfärbung im Zellkern

3.3. Statistik

Alle angegebenen Daten stammen von je drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in vitro. Es werden immer Durchschnitt \pm Standardabweichung gezeigt. Die Durchschnittswerte der Prozentsätze der DNA im Schweif von 100 Zellen pro Behandlung werden im Comet Assay angegeben. Zur Auswertung kamen jeweils 50 Zellen von zwei Objektträgern der gleichen Konzentration. In den Mikrokerntests wird die durchschnittliche Anzahl der vorhandenen Mikrokerne pro 1000 einkerniger bzw. doppelkerniger Zellen angegeben. Für jede Konzentration wurden im einzelnen Experiment zwei Mal die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 Zellen bestimmt und gemittelt (Auswertung von 2000 Zellen pro Konzentration). Für die relativen Werte wurde der Durchschnitt aller Kontrollwerte auf 1,0 gesetzt und alle anderen Werte im Verhältnis dazu angegeben. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ sind als signifikant markiert.

4. Ergebnisse

4.1. Hep-G2 Zellen

4.1.1. Genotoxizitätstests

4.1.1.1. Versuchsreihen mit H₂O₂ und MMS

Durch die zytotoxische und mutagene Wirkung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und von MMS (Methylmethansulfonat) eignen sich diese beiden Substanzen zum Test der Genotoxizität in Hep-G2 Zellen. Zur Detektion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, sowie alkalilabilen Stellen wurden die Zellen für den Comet Assay mit verschiedenen Konzentrationen an H₂O₂ (6,25µM; 12,5µM, 25µM und 50µM) 2 Stunden behandelt (Abb. 8a). Man kann einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung durch H₂O₂ erkennen. Zur Detektion chromosomaler Schäden wurden die Zellen mit MMS behandelt und man kann im Mikrokerntest einen signifikanten Anstieg der Mikrokerne pro 1000 einkerniger Zellen beschreiben. Hep-G2 Zellen wurden hierfür mit verschiedenen Konzentrationen von MMS (6,25µM; 12,5µM; 25µM und 50µM) 4 Stunden behandelt (Abb.8b).

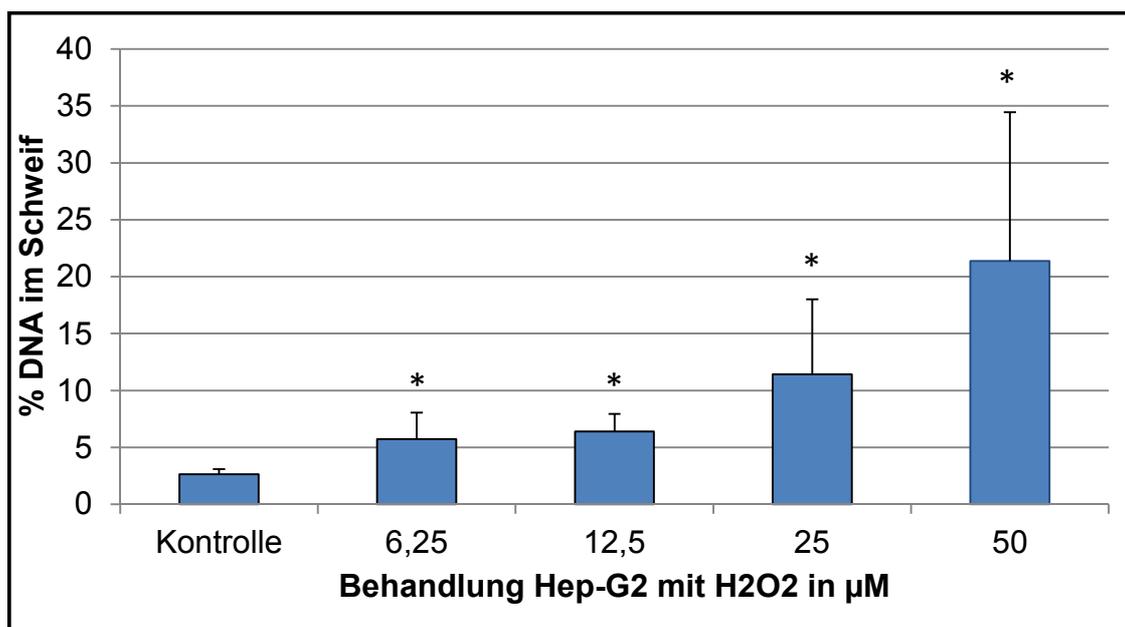


Abb.8a: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch H₂O₂

Hep-G2 Zellen wurden für den Comet Assay 2 Stunden mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen ($6,25\mu M$; $12,5\mu M$ und $25\mu M$) behandelt. Anschließend wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz an DNA im Schweif des Kometen. Es handelt sich um den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant gegenüber der Kontrolle markiert (*). Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

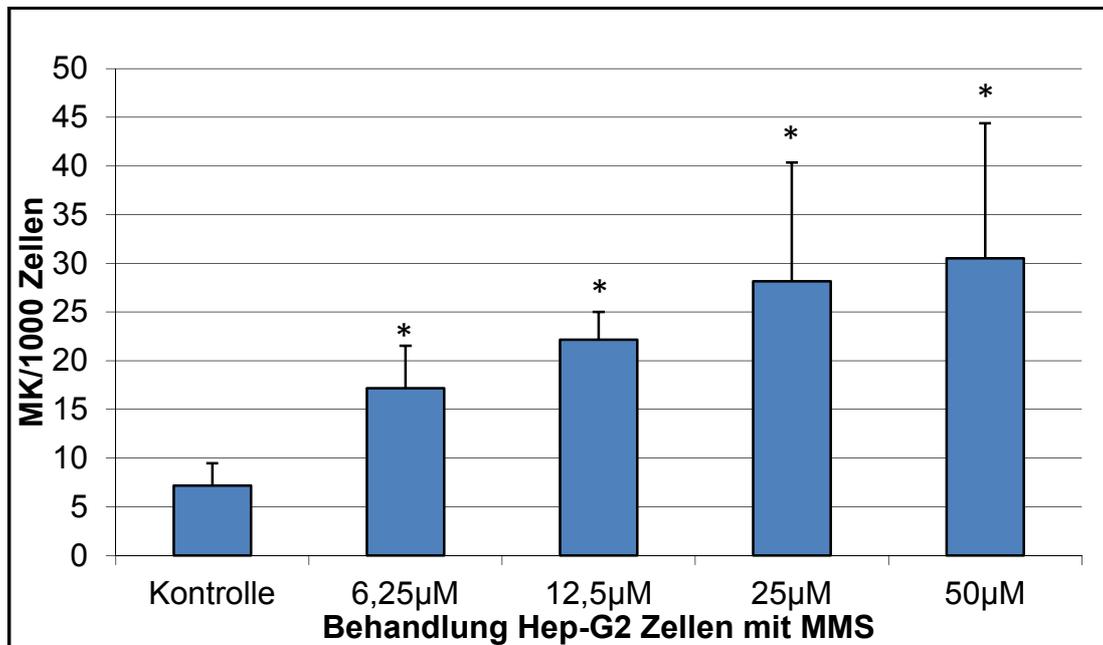


Abb.8b. Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch MMS

Für den Mikrokerntest wurden Hep-G2 Zellen 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an MMS ($6,25\mu M$; $12,5\mu M$; $25\mu M$; und $50\mu M$) behandelt. Das Diagramm zeigt den Durchschnitt von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Aufgezeigt ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant gegenüber der Kontrolle markiert (*). Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

Zu jeder Versuchsreihe wurden die Zellen auch auf ihre Vitalität getestet. Dies diente zum Ausschluss der Zytotoxizität der einzelnen Substanzen. Der Tabelle 1 kann man die Vitalität der behandelten Hep-G2 Zellen mit H_2O_2 in Prozent entnehmen. Ab einer Konzentration von $12,5\mu M$ H_2O_2 ist die Vitalität zwar signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle (p -Wert $\leq 0,05$), jedoch liegt die Vitalität bei allen Konzentrationen deutlich über 90% und somit kann man nicht von einem zytotoxischen Effekt durch die angewandten H_2O_2 -Konzentrationen ausgehen.

Konzentration H ₂ O ₂	Vitalität in %
Kontrolle	98,34±1,04
6,25µM	97±1,00
12,5µM	95,5±0,50
25µM	96,34±0,76
50µM	96,5±0,00

Tab.1: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach Behandlung mit H₂O₂.

4.1.1.2. Genotoxizität von Insulin

Um sicher zu gehen, dass die verwendeten Insulinkonzentrationen nicht zytotoxisch wirken, wurde die Vitalität der behandelten Zellen überprüft. Keine der genutzten Insulinkonzentrationen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität.

Die Genotoxizität von Insulin wurde mithilfe von Comet Assay und Mikrokernstest überprüft. Für den Comet Assay wurden Insulinkonzentrationen von 5nM bis 2µM (5nM, 10nM, 50nM, 100nM, 500nM, 1µM und 2µM) genutzt. In Abb. 9a kann man eine Zunahme der DNA-Schädigung erkennen, die ab einer Konzentration von 5nM signifikant ist. Der Anstieg der Schädigung ist nicht gleichmäßig. Bei den Insulinkonzentrationen 500nM und 1µM scheint die DNA-Schädigung etwas abzufallen bei einer relativ hohen Standardabweichung. Es wurden auch Mikrokernstests durchgeführt mit verschiedenen Insulinkonzentrationen (100nM, 500nM, 2µM und 5µM). In Abb. 9b erkennt man einen gleichmäßigen Anstieg der Mikrokernzahl pro 1000 einkerniger Zellen. Jedoch handelt es sich hierbei um keinen signifikanten Anstieg.

Der parallel zum Comet Assay angefertigte Vitalitätstest (Tab.2) zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität bei Behandlung mit steigenden Insulinkonzentrationen (p-Wert > 0,05).

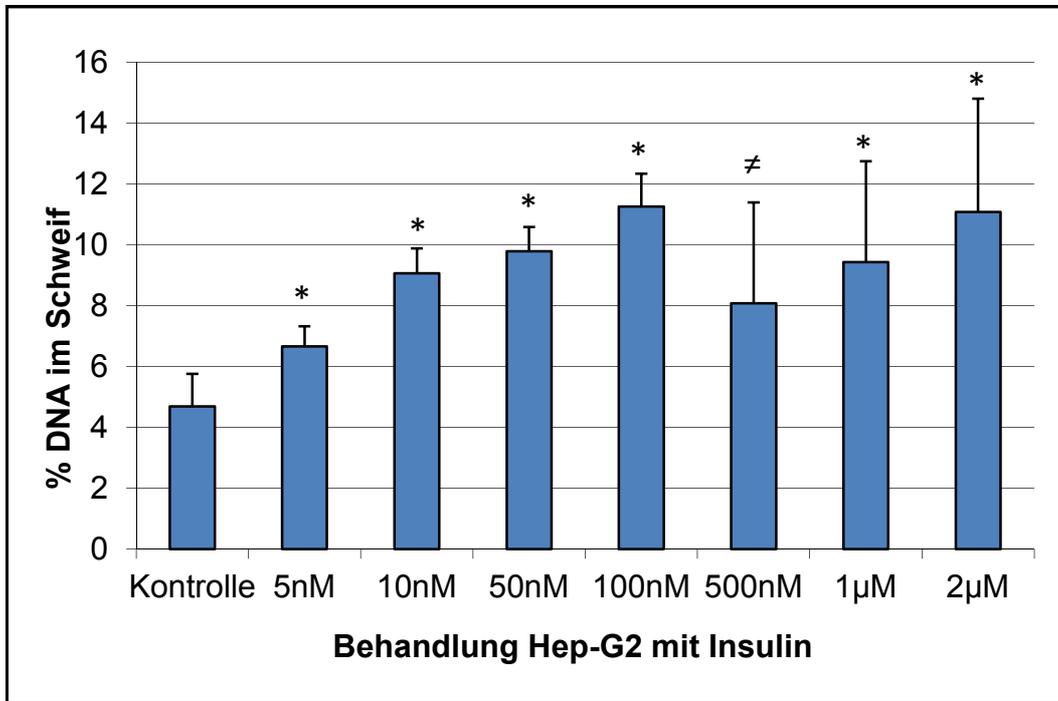


Abb.9a: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in Hep-G2 Zellen im Comet Assay

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 5nM, 10nM, 50nM, 100nM, 500nM, 1µM und 2µM Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif, befindet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.

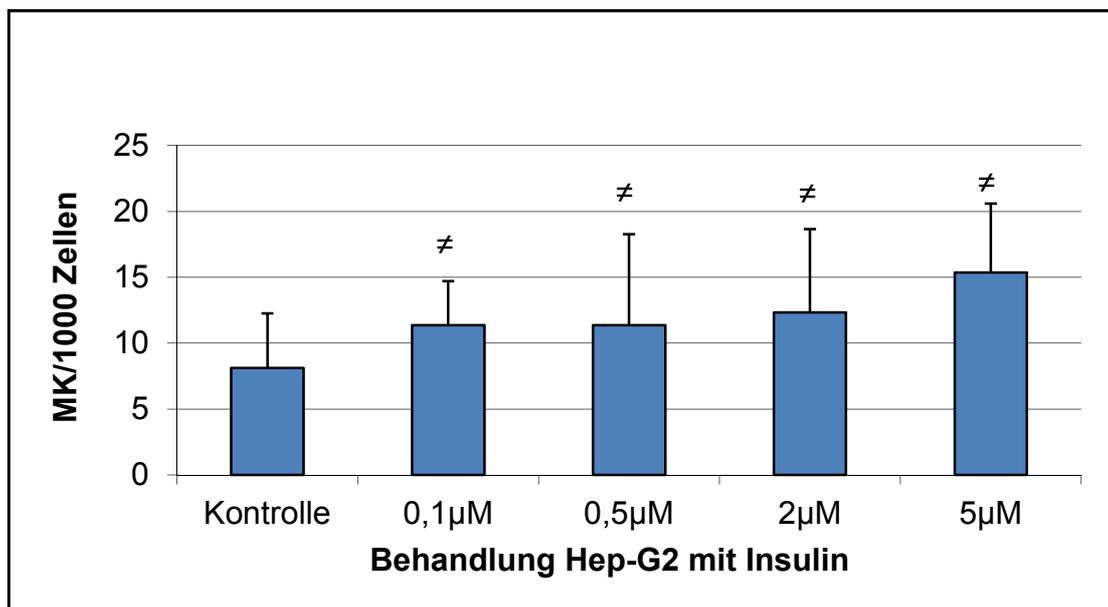


Abb.9b: Konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest

Angegeben ist der Durchschnitt von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Hep-G2 Zellen wurden für 4 Stunden mit 100nM, 500nM, 2µM und 5µM Insulin behandelt. Angegeben sind die Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit # markiert.

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	95,3±5,41
5nM	97,0±0,87
10nM	97,5±0,87
50nM	97,3±2,02
100nM	94,5±4,02
500nM	95,8±4,62
1µM	94,8±2,45
2µM	96,2±0,58

Tab.2: Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin

In Abb.10 wurden Hep-G2 Zellen für den Comet Assay mit 100nM Insulin für 5, 15 und 30 Minuten, sowie 1, 2, 4 und 16 Stunden behandelt. Die DNA-Schädigung steigt mit zunehmender Inkubationszeit an. Schon bei 5 minütiger Behandlungszeit ist eine signifikante Erhöhung der Schädigung zu erkennen. Die Schädigung nach 15 Minuten Behandlungszeit ist geringer als die Schädigung nach 5 Minuten. Trotz dieser Abweichung kann man auch nach 15 Minuten einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung im Vergleich zur Kontrolle beschreiben. Nach 16 Stunden Behandlung mit Insulin sinkt die DNA-Schädigung wieder. Jedoch ist auch nach 16 Stunden Behandlungszeit ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung verglichen mit der Kontrolle zu verzeichnen.

Der Vitalitätstest in Tabelle 3 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität bei steigender Inkubationszeit mit 100nM Insulin (p-Wert $> 0,05$).

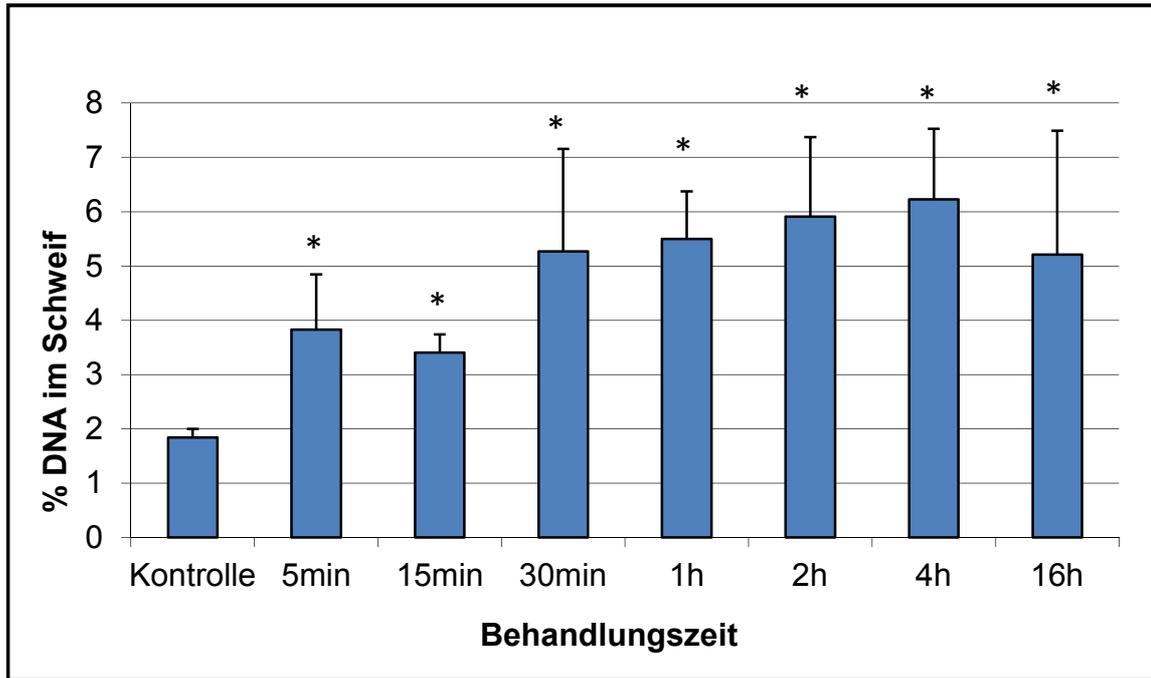


Abb.10: Zeitabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch Insulin im Comet Assay

Für den Comet Assay wurden Hep-G2 Zellen mit 100nM Insulin für 5, 15, und 30 Minuten, sowie 1, 2, 4 und 16 Stunden behandelt. Daraufhin wurde der Prozentsatz der DNA, welche sich in der Schweifregion des Kometen befand, ausgewertet. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt drei unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.

Behandlungszeit	Vitalität in %
Kontrolle	97±3,04
5 min.	97,7±1,76
15 min.	95,2±2,02
30 min.	97±2,18
1 h	98,5±0,50
2 h	97,7±0,58
4 h	96±2,50
16 h	93,5±5,07

Tab.3: Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit 100nM Insulin für 5, 15 und 30 Minuten, sowie 1, 2, 4 und 16 Stunden

4.1.1.3. Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schäden durch Tempol

Tempol ist ein Antioxidans und reagiert als Radikalfänger [28]. Um diesen vermeintlich protektiven Effekt zu detektieren, wurden nachfolgende Experimente durchgeführt. Im Comet Assay wurden 100nM Insulin und im Mikrokerntest 2µM Insulin verwendet. Die Tempolkonzentration für alle Experimente betrug 50µM. Sowohl im Comet Assay (Abb. 11a), als auch im Mikrokerntest (Abb. 11b) löst Insulin eine DNA-Schädigung aus, die signifikant ist gegenüber der Kontrolle. Wurde den Zellen eine Konzentration von 50µM Tempol zugeführt, ist in beiden Tests eine Erhöhung der DNA-Schädigung verglichen mit der Kontrolle erkennbar. Die Behandlung von Hep-G2 Zellen mit beiden Substanzen hat eine Verringerung der DNA-Schädigung gegenüber Insulin zur Folge. Im Comet Assay ist diese Reduktion nur sehr gering und nicht signifikant, während man den Ergebnissen vom Mikrokerntest entnehmen kann, dass es sich um eine signifikante Verringerung der DNA-Schädigung handelt.

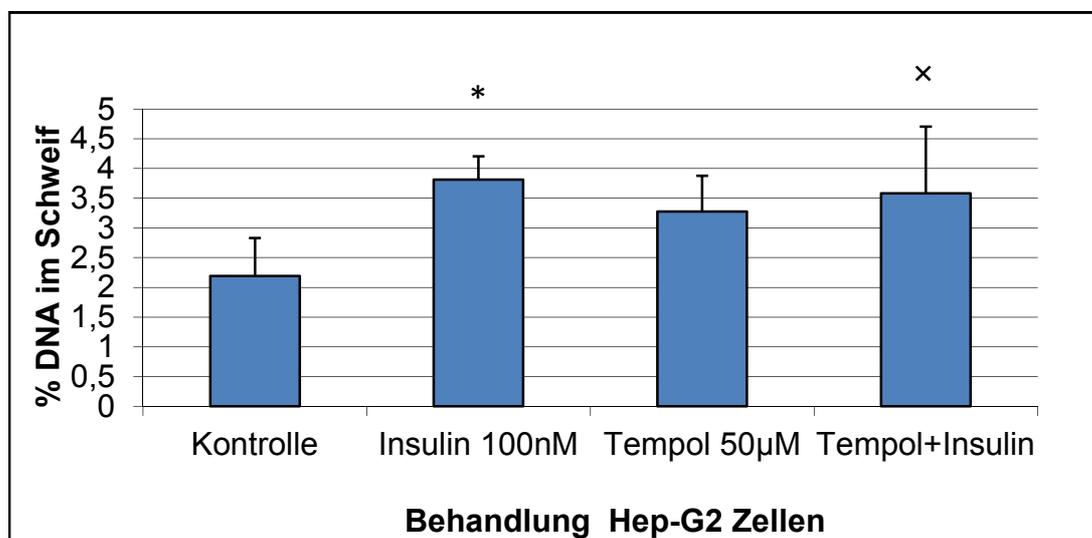


Abb.11a: Einfluss von Tempol auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay

Gezeigt ist der Durchschnitt von drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. DNA-Strangbrüche wurden quantifiziert. Angegeben ist der Prozentsatz der DNA im Schweif. Behandelt wurden Hep-G2 Zellen für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 50µM Tempol. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit × markiert, nicht signifikante mit ×.

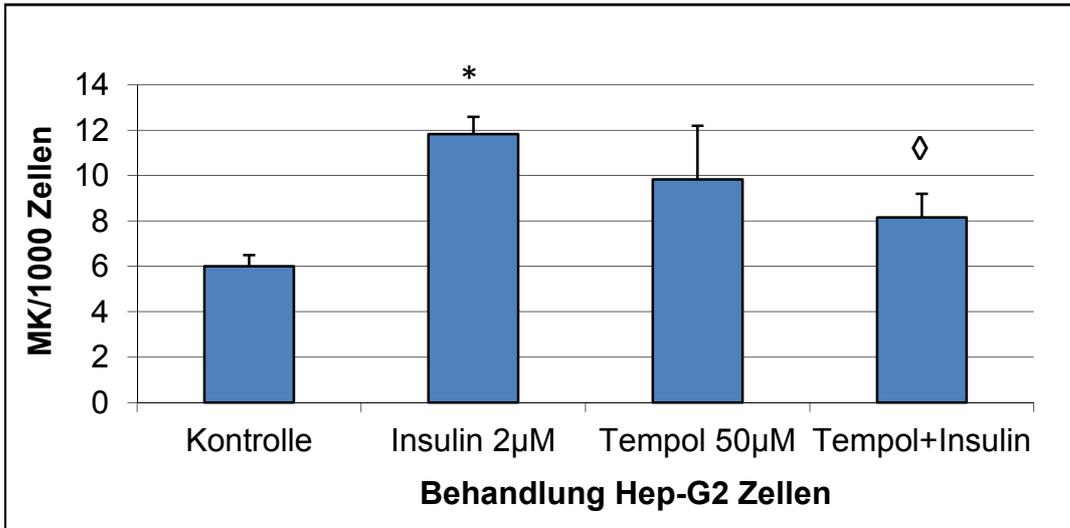


Abb.11b: Einfluss von Tempol auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung im Mikrokerntest in Hep-G2 Zellen

Mikrokerne wurden quantifiziert im Mikrokerntest. Hep-G2 Zellen wurden 4 Stunden mit 2µM Insulin und 50µM Tempol behandelt. Gezeigt ist der Durchschnitt von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	96,8±2,89
Insulin 100nM	93,0±3,04
Tempol 50µM	89,7±4,54
Tempol+Insulin	91,8±4,48

Tab.4: Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin und Tempol für 2 Stunden

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Vitalitätstest. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 50µM Tempol behandelt. Lediglich die alleinige Behandlung der Zellen mit 50µM Tempol zeigt eine signifikante Verringerung der Vitalität (p-Wert $\leq 0,05$). Jedoch liegt die Vitalität bei allen Behandlungen deutlich über 80% und somit in einem akzeptablen Bereich.

4.1.1.4. Glukose beeinflusst die Insulin-induzierte DNA-Schädigung

Glukose spielt eine wesentliche Rolle im Insulinsignalweg. Nach Mahlzeiten erhöht sich der Glukosespiegel im Blut. Dies ist der Reiz für die Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas. Insulin veranlasst daraufhin die Aufnahme von Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren in Leber, Fettgewebe und Muskeln und sorgt für deren Speicherung [9]. Abbildung 12a und 12b zeigt den Einfluss von Glukose auf die schädigende Wirkung durch Insulin. Hep-G2 Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium low glucose (DMEM, 1g/l Glukose \pm 5,5mM) kultiviert. Für die Tests wurden 15mM und 30mM Glukose zugegeben. Im Comet Assay in Abb.12a kann man einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung durch alleinige Zugabe von 100nM Insulin erkennen. Glukose selbst löst im Comet Assay in 15mM, sowie 30mM eine Erhöhung der DNA-Schädigung verglichen mit der Kontrolle aus. Die Gabe von 15mM Glukose und 100nm Insulin im Comet Assay bewirkt eine geringe Reduktion der DNA-Schädigung, die nicht als signifikant beschrieben werden kann. Bei der Zugabe von 30mM zu 100nM Insulin kann man von keiner Reduktion der Schädigung sprechen. Auch Im Mikrokerntest (Abb.12b) kann man einen signifikanten Anstieg der Schädigung durch 2 μ M Insulin erkennen. Beide zugegebenen Glukosekonzentrationen lösen eine Erhöhung der Mikrokernzahl verglichen mit der Kontrolle aus. Im Mikrokerntest kann man eine deutlichere Reduktion der DNA-Schädigung durch beide Glukosekonzentrationen erkennen. Allerdings ausschließlich die Zugabe von 15 mM Glucose zu 2 μ M Insulin führt zu einer signifikanten Verringerung der DNA-Schädigung.

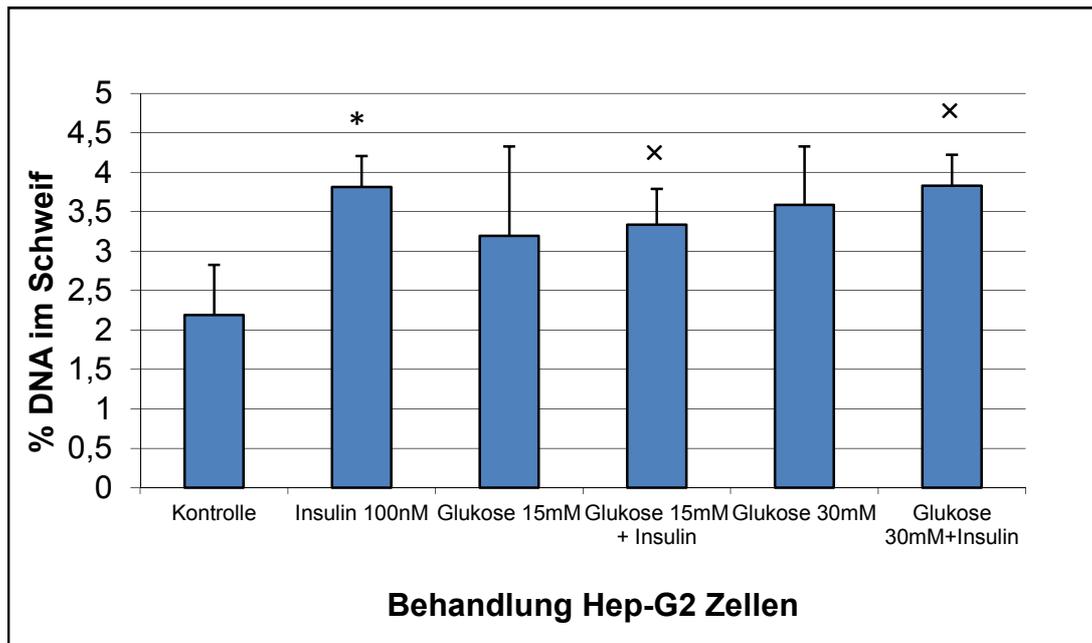


Abb. 12a: Einfluss von 15mM und 30mM Glukose auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay

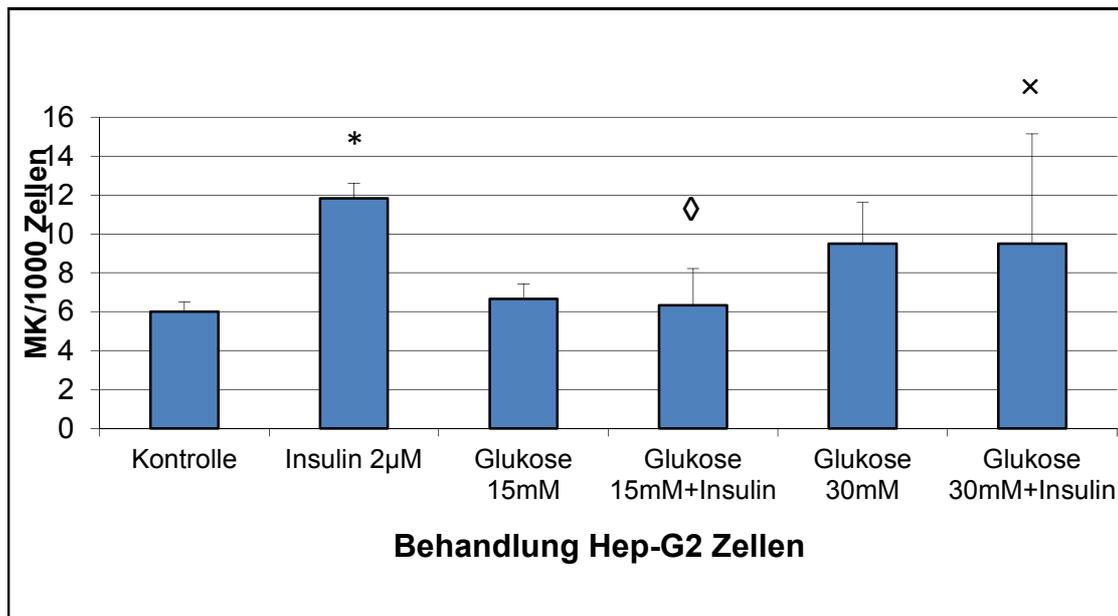


Abb.12b: Einfluss von 15mM und 30mM Glukose auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest

Für den Comet Assay (Abb.12a) wurden Hep-G2 Zellen mit 100nM Insulin und 15 bzw. 30mM Glukose für 2 Stunden behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Angegeben ist der Prozentsatz der DNA, der sich im Schweif befand. In Abb.12b wurden die Zellen für den Mikrokerntest 4 Stunden mit 2µM Insulin und 15- bzw. 30mM Glukose behandelt. Angegeben ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Beide Abbildungen zeigen jeweils den Durchschnitt von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimente und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung

im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	96,8 \pm 2,89
Insulin 100nM	93 \pm 3,04
Glucose 15nM	97,5 \pm 1,04
Glucose 15nM+Insulin	96,7 \pm 0,29
Glucose 30nM	97,8 \pm 2,08
Glucose 30nM	96,7 \pm 2,31

Tab. 5: Vitalitätstest Hep-G2 nach Behandlung mit Insulin und Glukose für 2 Stunden

Der Vitalitätstest in Tabelle 5 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p -Wert $> 0,05$). Von den gewählten Konzentrationen an Glukose und Insulin geht also kein zytotoxischer Effekt aus.

4.1.1.5. Der Antioxidans und NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin verringert die DNA-Schädigung durch Insulinbehandlung

Apocynin wirkt als Antioxidans und somit als freier Radikalfänger, sowie auch als Inhibitor der NADPH-Oxidase, welche eine entscheidende Quelle für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies ist [31]. Durch Verwendung von Apocynin in den folgenden Experimenten soll festgestellt werden, ob Apocynin einen protektiven Effekt auf die durch Insulin induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen hat. Im Folgenden wurden Comet Assays und Mikrokerntests mit Apocynin und Insulin durchgeführt. Im Comet Assay (Abb.13a) wurden 100 μ M Apocynin und 100nM Insulin genutzt. Man kann hier einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung durch Insulin erkennen, sowie einen signifikanten Rückgang der DNA-Schädigung durch Zugabe von 100 μ M Apocynin. Im Mikrokerntest (Abb.13b) ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 Zellen durch 2 μ M signifikant angestiegen. Allerdings ist auch die Schädigung durch alleinige Behandlung der Zellen mit 100 μ M Apocynin erhöht gegenüber der Kontrolle. Man kann eine Reduktion der Mikrokernelzahl bei Behandlung der Zellen mit Insulin und

Apocynin erkennen, allerdings ist diese Reduktion im Vergleich zur alleinigen Insulinbehandlung nicht signifikant. Der Vitalitätstest in Tabelle 6 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert > 0,05). Von den Behandlungen der Zellen mit Apocynin und Insulin geht also kein zytotoxischer Effekt aus.

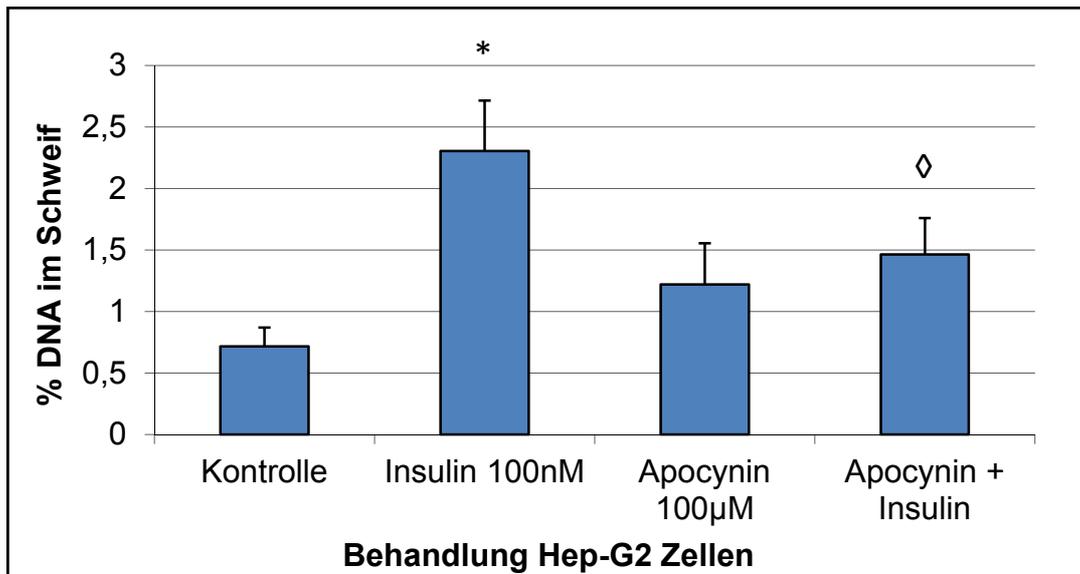


Abb.13a: Einfluss von Apocynin auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay

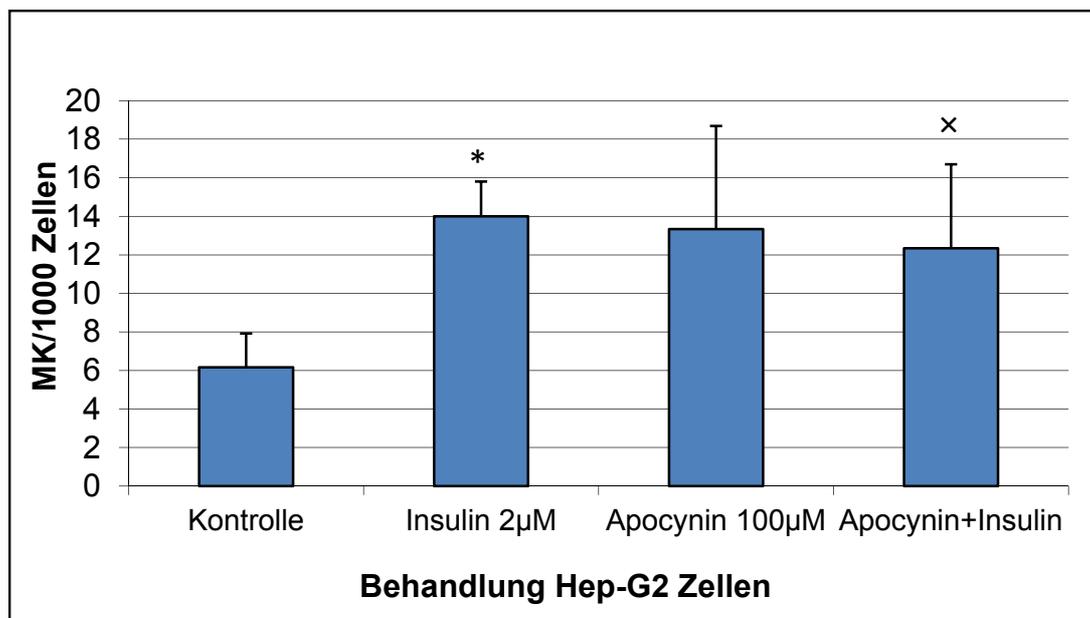


Abb.13b: Einfluss von Apocynin auf die Insulin-induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest

Hep-G2 Zellen wurden für den Comet Assay (Abb.13a) für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 100µM Apocynin behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Angegeben ist der Prozentsatz der DNA, der sich im Schweif befand. In Abb.13b wurden Hep-G2 Zellen für den Mikrokerntest für 4 Stunden mit 2µM Insulin und 100µM Apocynin behandelt. Angegeben ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Abb.13a und 13b zeigen jeweils den Durchschnitt von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	93,83±2,36
Insulin 100nM	96,83±1,53
Apocynin 100µM	94±2,65
Apocynin+Insulin	93,4±0,87

Tab.6: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach Behandlung mit Insulin und Apocynin für 2 Stunden

4.1.1.6. Vas2870, ein NADPH-Oxidase-Inhibitor, verringert die DNA-Schädigung durch Insulin

Vas2870 inhibiert die NADPH-Oxidase und blockiert so die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies [34]. Zu dieser Substanz wurden sowohl Comet Assays als auch Mikrokerntests durchgeführt. Im Comet Assay (Abb.14a) und im Mikrokerntest (Abb.14b) kann man einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung durch Insulin erkennen. Die Hep-G2 Zellen wurden im Comet Assay für 2 Stunden mit 100nM Insulin behandelt, die im Mikrokerntest für 4 Stunden mit 2µM Insulin. In beiden Tests wurden die Zellen mit 10µM Vas2870 behandelt. Bei alleiniger Zugabe von Vas2870 in Abbildung 14b steigt die Anzahl der Mikrokerne im Vergleich zur Kontrolle an. Bei gemeinsamer Behandlung der Zellen mit Insulin und Vas2870 ist in beiden Abbildungen (14a und 14b) eine signifikante Reduktion der DNA-Schädigung zu erkennen. Der Vitalitätstest in Tabelle 7 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-

Wert > 0,05). Von den Behandlungen der Hep-G2 Zellen mit Vas2870 und Insulin geht also kein zytotoxischer Effekt aus.

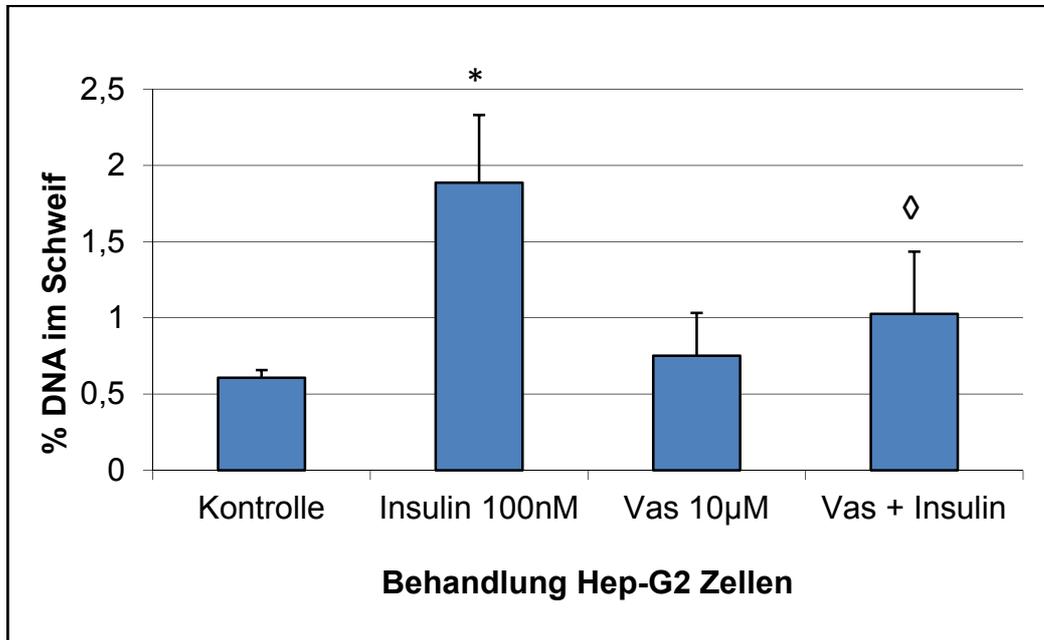


Abb.14a: Einfluss von 10µM Vas2870 auf die durch 100nM Insulin induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Comet Assay

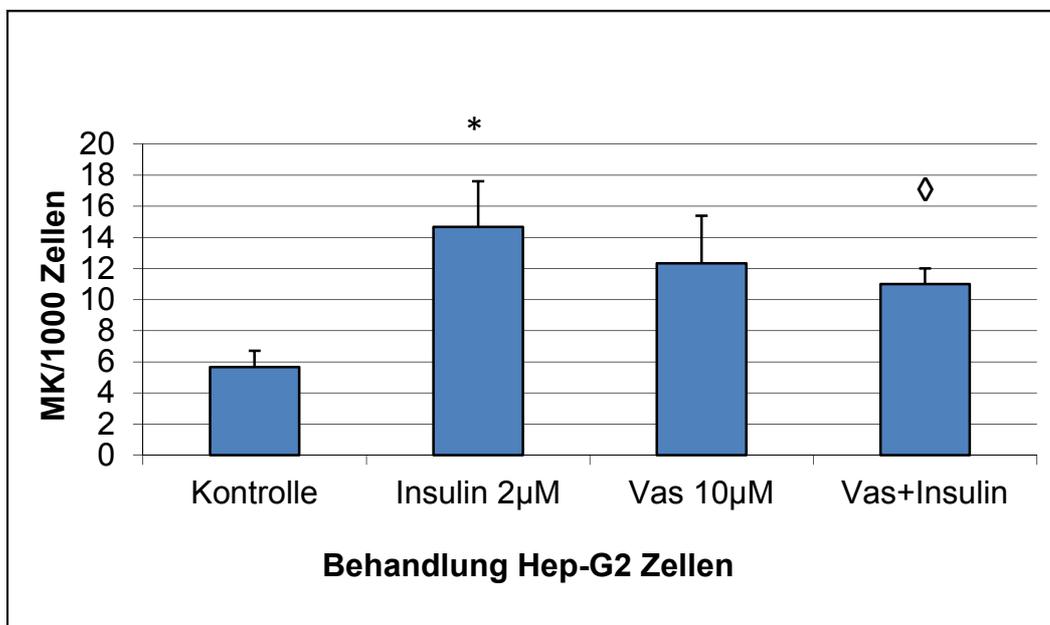


Abb.14b: Einfluss von 10µM Vas2870 auf die durch 2µM Insulin induzierte DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen im Mikrokerntest

Hep-G2 Zellen wurden für den Comet Assay (Abb.14a) für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 10µM Vas2870 behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Angegeben ist der Prozentsatz der DNA, der sich im Schweif des Kometen befand. In Abb.14b wurden Hep-G2 Zellen für den Mikrokerntest für 4 Stunden mit 2µM Insulin und 10µM Vas2870 behandelt. Angegeben ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Abb.14a und 14b zeigen jeweils den Durchschnitt von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	93,83±2,36
Insulin 100nM	96,83±1.53
Vas 10µM	94,50±5,58
Vas+Insulin	90,00±5,29

Tab.7: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und Vas2780

4.1.1.7. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin reduziert die Genotoxizität von Insulin

Im Insulinsignalweg ist die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) ein Schlüsselenzym. Dieses Enzym kann durch Wortmannin inhibiert werden und so die Reduktion der Schädigung durch Insulin bewirken [16].

In Abbildung 15a wurden Hep-G2 Zellen für den Comet Assay 2 Stunden mit 100nM Insulin und 100nM Wortmannin behandelt. Die Abbildung 15b zeigt das Ergebnis von Hep-G2 Zellen, welche für den Mikrokerntest 4 Stunden mit 2µM Insulin und 100nM Wortmannin behandelt wurden. In beiden Abbildungen ist ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung bei alleiniger Zugabe von Insulin zu erkennen. Im Mikrokerntest (Abb.15b) ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1000 einkerniger Zellen durch die alleinige Behandlung der Zellen mit Wortmannin im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Im Comet Assay (Abb.15a) löst die Behandlung der Hep-G2 Zellen mit Wortmannin keine Erhöhung der DNA-Schädigung aus. In

beiden Abbildungen ist die DNA-Schädigung durch Behandlung mit Insulin und Wortmannin reduziert gegenüber der alleinigen Insulinbehandlung. Signifikant ist diese Reduktion im Comet Assay, nicht aber im Mikrokernstest. Der Vitalitätstest in Tabelle 8 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert > 0,05). Von der 2 stündigen Behandlung der Zellen mit 100nM Insulin und 100nM Wortmannin geht also kein zytotoxischer Effekt aus.

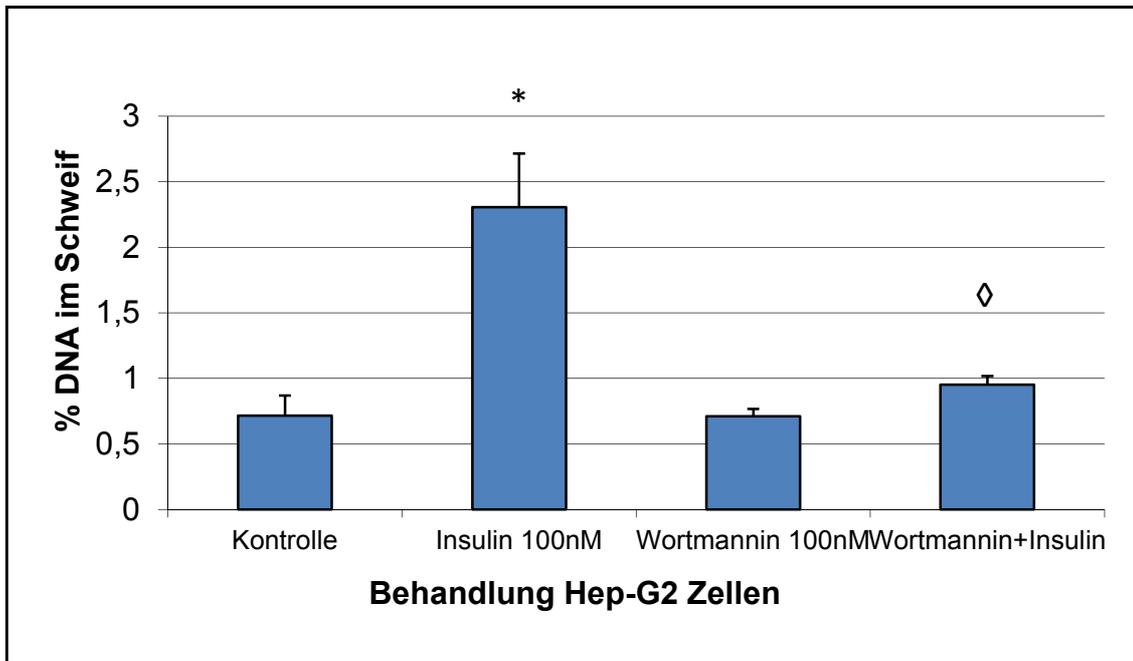


Abb.15a: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch 100nM Wortmannin im Comet Assay

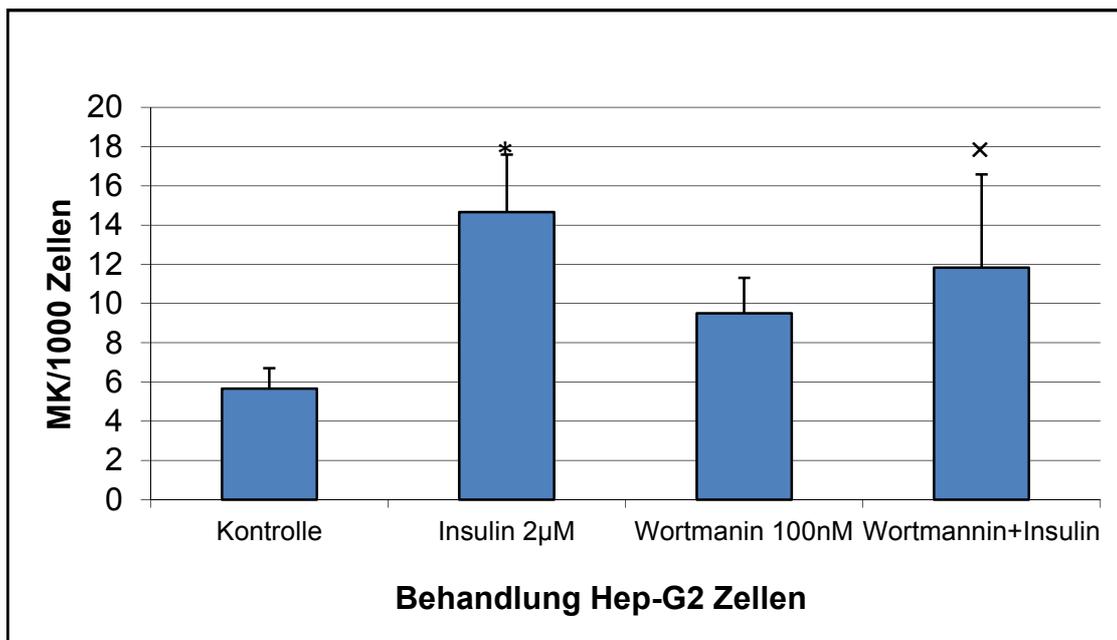


Abb.15b: : Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen durch 100nM Wortmannin im Mikrokerntest

Abb.15a: DNA-Strangbrüche quantifiziert durch den Comet Assay. Gezeigt wird der Prozentsatz der DNA, welche sich im Schweif des Kometen befand. Behandelt wurden Hep-G2 Zellen für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 100nM Wortmannin. Abb.15b: Mikrokerne wurden quantifiziert im Mikrokerntest. Hep-G2 Zellen wurden 4 Stunden mit 2µM Insulin und 100nM Wortmannin behandelt. Beide Abbildungen zeigen jeweils den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente und deren Standardabweichung. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	93,83±2,36
Insulin 100nM	96,83±1,53
Wortmanin 100nM	93,50±3,77
Wortmanin+Insulin	93,00±6,61

Tab.8: Vitalitätstest Hep-G2 nach 2-stündiger Behandlung mit Insulin und Wortmanin

4.1.1.8. Die Blockierung des Insulinrezeptors senkt die Insulin-induzierte DNA-Schädigung

HNMPA-(AM)₃ (Hydroxy-2-naphthalenylmethyl phosphonic acid acetoxymethyl ester) ist eine Substanz, welche den Insulinrezeptor blockiert. Aufgrund dieser Eigenschaft kann man vermuten, dass bei der Behandlung von Hep-G2 Zellen mit Insulin und HNMPA-(AM)₃ die Insulin-induzierte DNA-Schädigung verringert wird. In Abbildung 16 ist der Durchschnitt von drei unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichung dargestellt. Die Behandlung der Hep- G2 Zellen mit 100nM Insulin zeigt einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung. Werden die Zellen mit 100µM HNMPA-(AM)₃ behandelt, kann kein Anstieg der DNA-Schädigung gegenüber der Kontrolle ausgemacht werden. Bei Behandlung mit 100nM Insulin und 100µM HNMP-

(AM)₃ ist eine deutliche Verminderung der DNA-Schädigung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Insulin auszumachen. Es handelt sich hierbei um eine signifikante Reduktion der Schädigung.

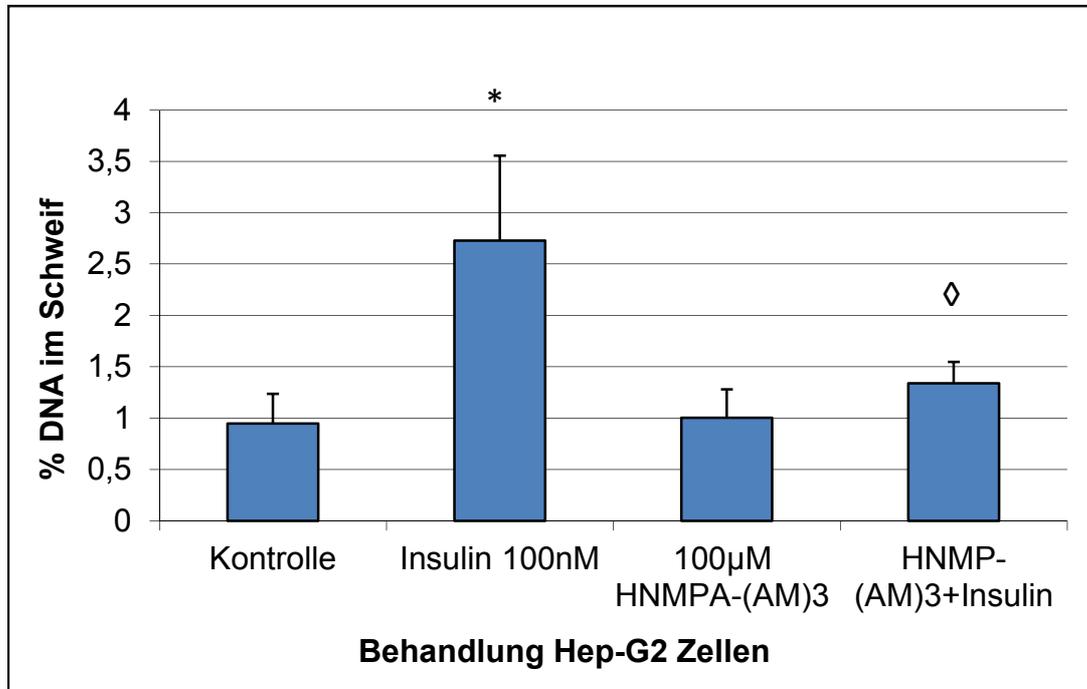


Abb.16: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des Insulinrezeptors

Abb.16 zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichung. Die DNA-Schädigung ist angegeben als Prozentsatz, der DNA, der sich im Schweif des Kometen befand. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 100µM HNMPA-(AM)₃ behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert ≤ 0,05 wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit ◊ markiert, nicht signifikante mit ×.

Der Tabelle 9 kann man die Vitalität der Hep-G2 Zellen entnehmen, welche zuvor zwei Stunden mit 100nM Insulin und 100µM HNMPA-(AM)₃ behandelt wurden. Die alleinige Behandlung der Zellen mit Insulin zeigt keine signifikante Verringerung der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert > 0,05). Die Behandlungen der Zellen mit HNMPA-(AM)₃, sowie die Kombinationsbehandlung von HNMPA-(AM)₃ und Insulin zeigt eine signifikante Verringerung der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert ≤ 0,05). Da jedoch alle Werte deutlich über 90% liegen kann man nicht von einer zytotoxischen Wirkung ausgehen.

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	99,50±0,50
Insulin 100nM	98,83±0,29
100µM HNMP-(AM) ₃	95,50±3,04
HNMP-(AM) ₃ +Insulin	95,83±1,53

Tab.9: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und HNMP-(AM)₃

4.1.1.9. Die Blockierung des IGF1-Rezeptors senkt die durch Insulin induzierte DNA-Schädigung

Insulin bindet mit hoher Affinität an den Insulinrezeptor. Mit wesentlich geringerer Affinität bindet Insulin auch an den IGF1-Rezeptor (insulin-like-growth factor 1 receptor). Liegen pathophysiologisch erhöhte Insulinlevel vor, kommt es auch zu dieser Bindung an den IGF1-Rezeptor [13]. Durch Blockierung dieses Rezeptors soll ermittelt werden, ob auch so eine Senkung der DNA-Schädigung erreicht werden kann. Bei dem genutzten Inhibitor handelt es sich um Picropodophyllin (PPP), welcher den IGF1-Rezeptor blockiert, den Insulinrezeptor aber nicht beeinflusst [35]. Im Comet Assay (Abb.17) wurden Hep-G2 Zellen für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 50nM PPP behandelt. Dargestellt ist der Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Insulin löst auch in dieser Testreihe einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung aus. Durch Blockierung des IGF1-Rezeptors durch PPP ist die durch Insulin ausgelöste Schädigung signifikant verringert.

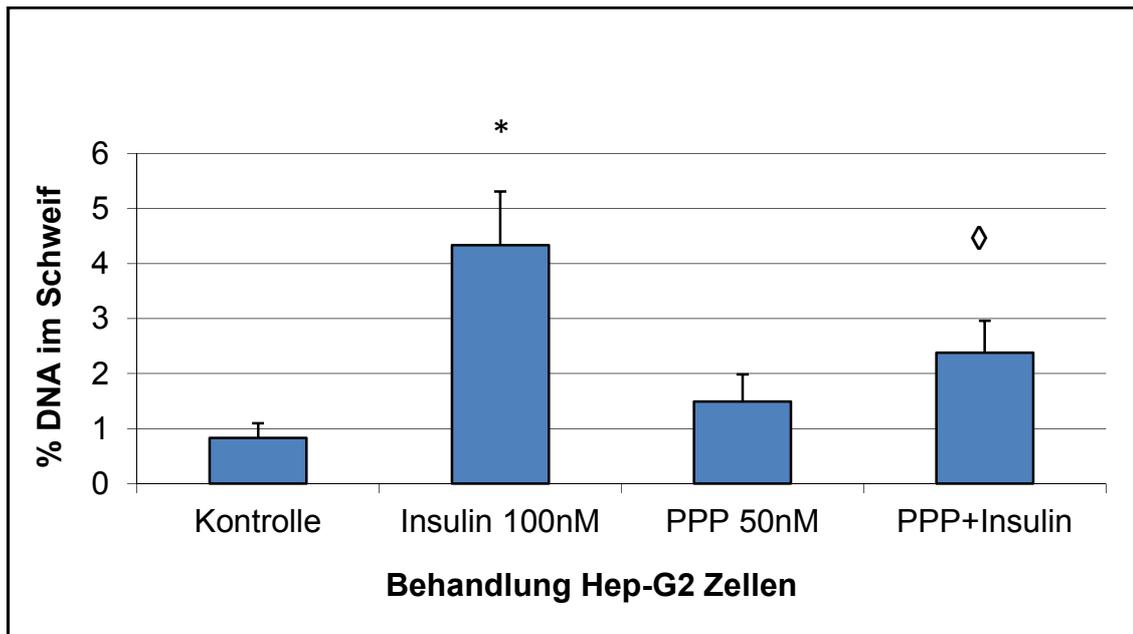


Abb.17: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des IGF1-Rezeptors in Hep-G2 Zellen

Abb. 17 zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichung. Die DNA-Schädigung ist angegeben als Prozentsatz, der DNA, der sich im Schweif des Kometen befand. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 50nM PPP behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulin-behandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

Der Vitalitätstest in Tabelle 10 zeigt keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert $> 0,05$). Von der 2 stündigen Behandlung der Zellen mit 100nM Insulin und 50nM PPP geht also kein zytotoxischer Effekt aus.

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	98,17 \pm 1,76
Insulin 100nM	99,0 \pm 1,73
PPP 50nM	97,17 \pm 0,76
PPP + Insulin	95,50 \pm 3,77

Tab.10: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit Insulin und PPP

4.1.1.10. Der mitochondriale Inhibitor Rotenone vermindert die Insulin-induzierte DNA-Schädigung

Durch die nicht kompetitive Hemmung des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette blockiert Rotenone die Entstehung von ROS. Mitochondrien tragen einen bedeutenden Teil zur Bildung von ROS bei [32]. Aufgrund dieser Tatsache sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob durch diese Inhibierung der schädliche Einfluss von Insulin auf die Zellen vermindert werden kann. Abbildung 18 zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichung. Hep-G2 Zellen wurden 2 Stunden mit 100nM Insulin und 10nm Rotenone behandelt. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Erhöhung der DNA-Schädigung durch Insulin. Rotenone selbst löst in der eingesetzten Konzentration keinen Anstieg der DNA-Schädigung aus. Werden die Zellen gleichzeitig mit Rotenone und Insulin behandelt, zeigt sich ein deutlicher Rückgang der DNA-Schädigung verglichen mit der alleinigen Insulinbehandlung.

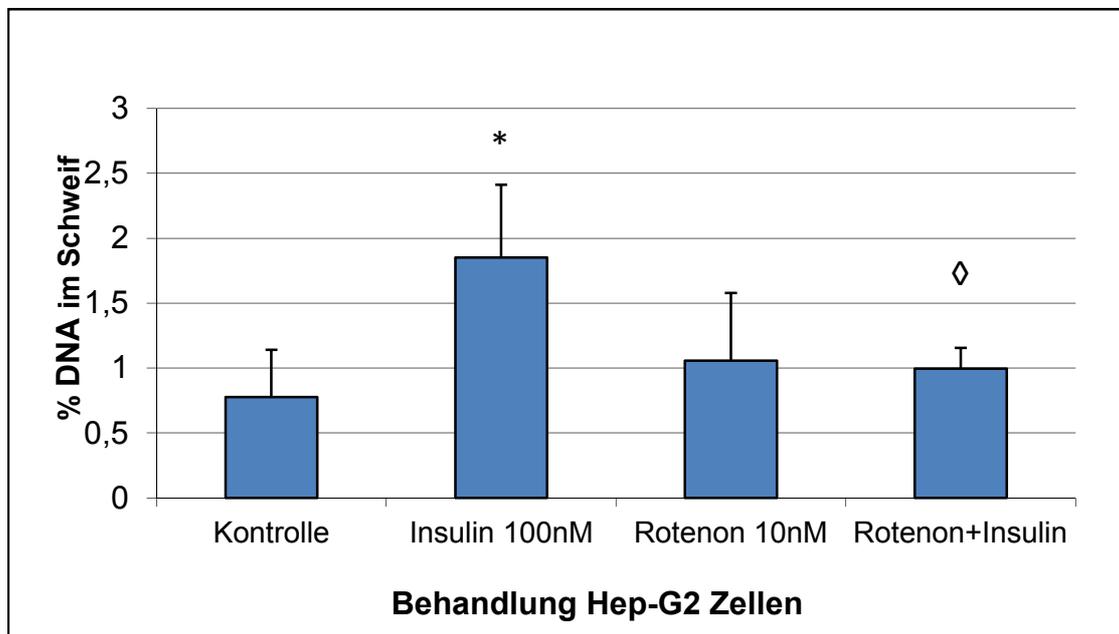


Abb. 18: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Zugabe von 10nm Rotenone

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichung. Die DNA-Schädigung ist angegeben als Prozentsatz, der DNA, der sich im Schweif des Kometen befand. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 10nM Rotenone behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als

signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit ◇ markiert, nicht signifikante mit ×.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Vitalitätstest. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 10nM Rotenone behandelt. Lediglich die Kombinationsbehandlung der Zellen mit Rotenone und Insulin zeigt eine signifikante Verringerung der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert ≤0,05). Jedoch liegt die Vitalität bei allen Behandlungen deutlich über 90% und somit kann man nicht von einem zytotoxischen Effekt ausgehen.

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	99,17±0,29
Insulin 100nM	98,33±2,47
Rotenone 10nm	99,0±1,0
Rotenone 10nm + Insulin	96,0±2,78

Tab.11: Vitalitätstest Hep-G2 Zellen nach 2 stündiger Behandlung mit 100nM Insulin und 10nM Rotenone

4.1.1.11. Plumbagin schützt vor Insulin-induzierten DNA-Schädigungen

Plumbagin zeichnet sich wie schon beschrieben durch eine Reihe positiver Effekte aus, unter anderem inhibiert es den Superoxid-generierenden Enzymkomplex NADPH-Oxidase (Isoform Nox4). Im Folgenden wurden Comet Assays zur Überprüfung der Genotoxizität durchgeführt. Für 2 Stunden wurden Hep-G2 Zellen mit 100nM Insulin und 100nM Plumbagin behandelt. Die Abbildung 19 zeigt den Durchschnitt von drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. Das Diagramm zeigt eine signifikant erhöhte DNA-Schädigung durch Insulin. Plumbagin alleine löst keine Erhöhung der Schädigung aus. In Kombination mit Insulin hat Plumbagin eine schützende Wirkung auf die Zellen. Man kann einen signifikanten Rückgang der Schädigung bis auf Höhe der Kontrolle beschreiben.

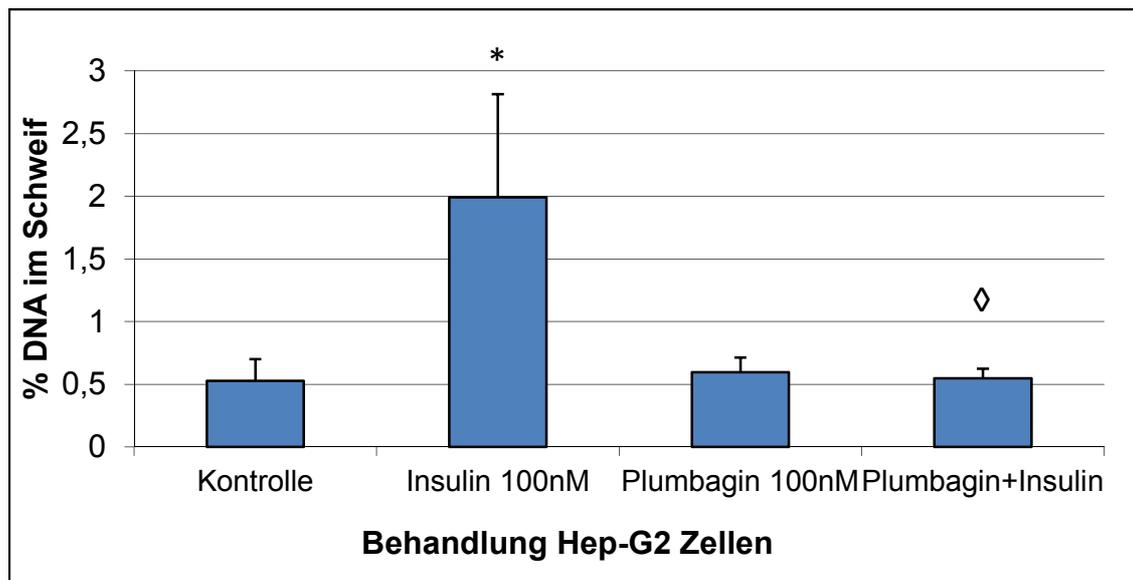


Abb. 19: Plumbagin schützt Hep-G2 Zellen vor Insulin-induzierter DNA-Schädigung

Abb. 19 zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichungen. Die DNA-Schädigung ist angegeben als Prozentsatz, der DNA, der sich im Schweif des Kometen befand. Hep-G2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 100nM Insulin und 100nM Plumbagin behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Alle Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

4.2. HT29-Zellen

4.2.1. Genotoxizitätstests

4.2.1.1. Genotoxizität von Insulin

Auch in der humanen Kolontumorzelllinie HT29 wurde die Genotoxizität von Insulin mithilfe von Comet Assay und Mikrokerntest getestet. Die in den Abbildungen 20d, 20e, 21 und 22 dargestellten Ergebnisse sind in gemeinsam mit Dr. Eman Othman Sholkamy durchgeführten Experimenten entstanden („In Vitro and In Vivo Analysis of Insulin-Induced Oxidative Stress and DNA Damage“, Dr. Eman Othman Sholkamy, Dissertationsschrift, 2013, [44]). Zunächst wurden

Experimente mit verschiedenen Insulinkonzentrationen (0,05 μ M, 0,1 μ M und 2 μ M) durchgeführt (Abb.20a und 20b). Beide Abbildungen zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der der DNA-Schädigung. Dieser Anstieg ist ab einer Konzentration von 0,05 μ M in Abbildung 20a, dem Comet Assay, als auch in Abbildung 20b, dem Mikrokerntest, signifikant. Gezeigt sind jeweils die Durchschnitte dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung.

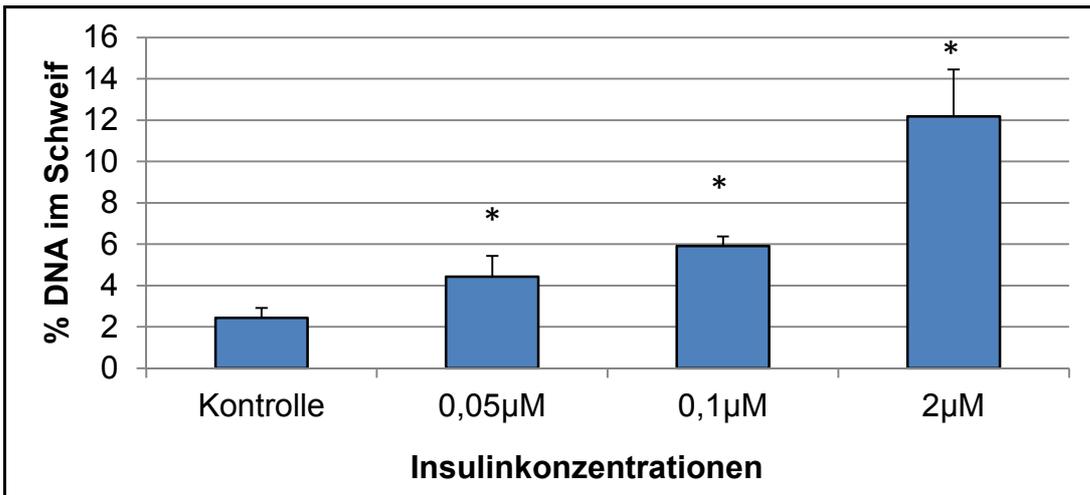


Abb.20a: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 2 Stunden mit 0,5 μ M, 0,1 μ M und 2 μ M Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif des Kometen, befand. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

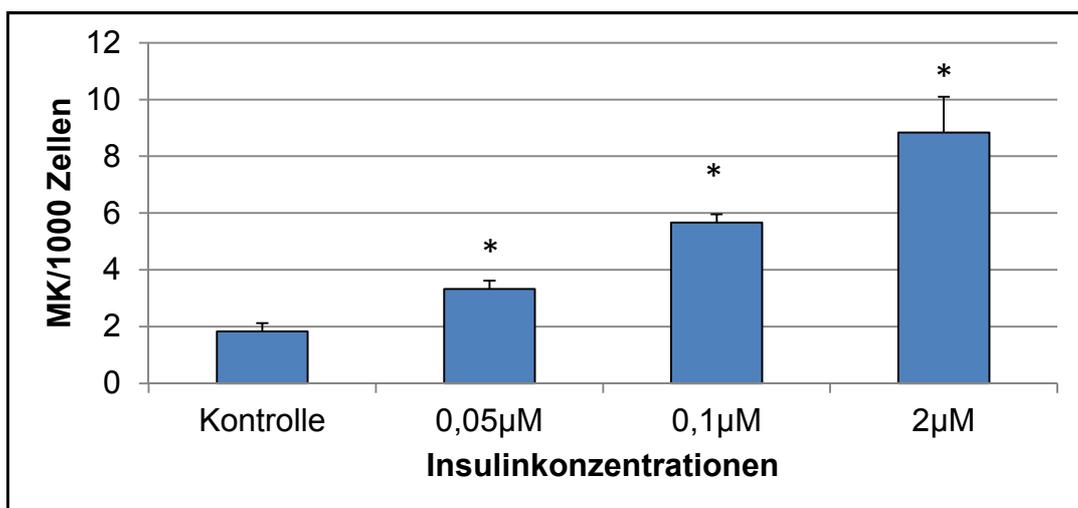


Abb.20b: Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Mikrokerntests und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden 4 Stunden mit 0,05µM, 0,1µM und 2µM Insulin behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden 3µg/ml Cytochalasin B zugegeben und nach 24 Stunde wurde der Test durchgeführt. Angegeben sind die Mikrokerne pro 1000 doppelkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant () markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.*

Anschließend wurden weitere Mikrokerntests und Comet Assays mit längeren Behandlungszeiten und geringeren Insulinkonzentrationen durchgeführt. Für den Mikrokerntest mit einer Behandlungszeit von 72 Stunden (Abb.20c) wurden Konzentrationen von 1nM, 10nM und 100nM Insulin genutzt. Schon bei 1nM Insulin ist ein Anstieg der Mikrokernzahl zu erkennen. Ab 10nM Insulin ist dieser Anstieg signifikant. In Abbildung 20d und 20e wurden weitere Experimente mit Insulinkonzentrationen von 0,5nM, 1nM und 10nM durchgeführt. Im Mikrokerntest (Abb.20d) wurden HT29 Zellen 5 Tage mit Insulin behandelt. Der Anstieg der DNA-Schädigung ist bei dieser längeren Behandlungszeit nun schon bei 0,5nM Insulin signifikant. Die Behandlungszeit des Comet Assays (Abb.20e) beträgt 6 Tage. Auch in dieser Abbildung sieht man einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Genotoxizität, der ab einer Konzentration von 0,5nM Insulin signifikant ist. Die folgenden Abbildungen zeigen alle den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente und deren Standardabweichung. Um HT29 Zellen über diese längeren Zeiträume mit Insulin zu behandeln, wurde täglich 50% des Mediums ausgetauscht und frisches Insulin zugefügt. So kommt es zu im Inkubationsverlauf ansteigenden Insulinkonzentrationen von 0,5-1nM, 1-2nM und 10-20nM.

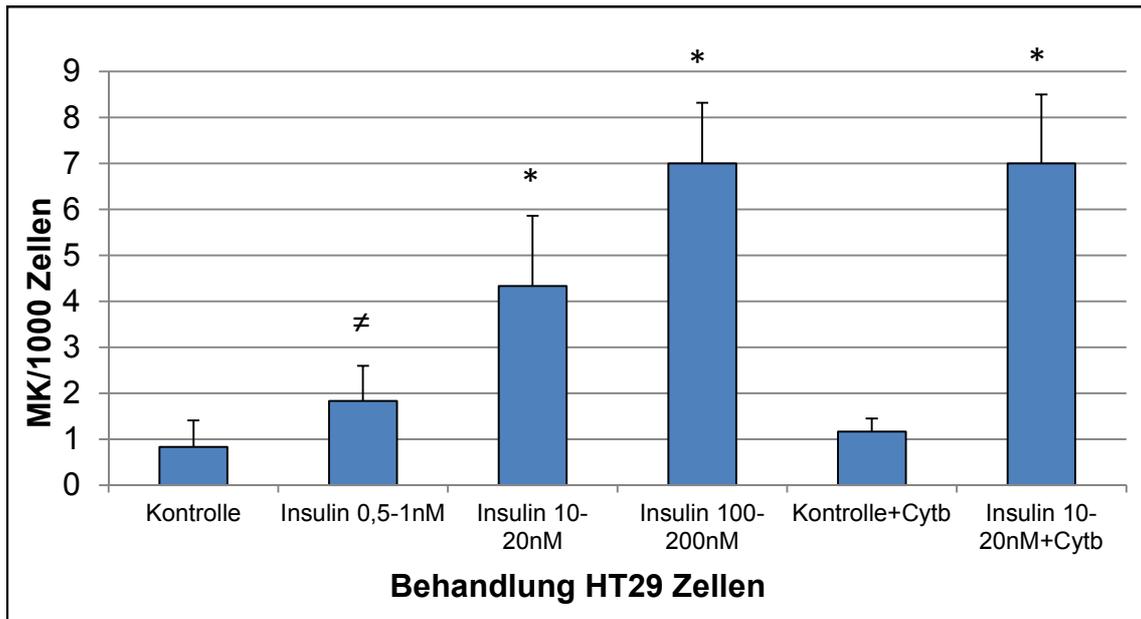


Abb.20c: Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Mikrokerntests und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5-1nM, 10-20nM und 100-200nM Insulin behandelt. Nach der Behandlungszeit wurde das Medium gewechselt und einer zweiten Kontrolle sowie einer zweiten Konzentration von 10-20nM Insulin, 3 µg/ml Cytochalasin B zugegeben und nach 24 Stunden wurde der Test durchgeführt. Angegeben sind die Mikrokerne pro 1000 einkernige bzw. doppelkernige (bei Zugabe von Cyt b) Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.

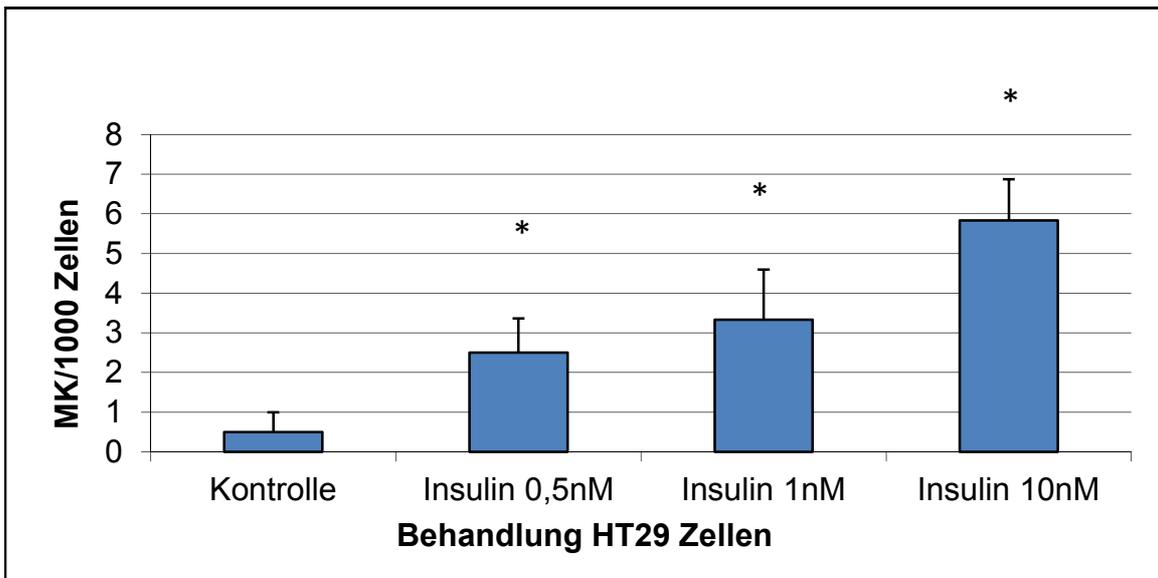


Abb.20d: Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Mikrokerntests und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 5 Tage mit 0,5-1nM, 1-2nM und 10-20nM Insulin behandelt. Angegeben sind die Mikrokerne pro 1000 einkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

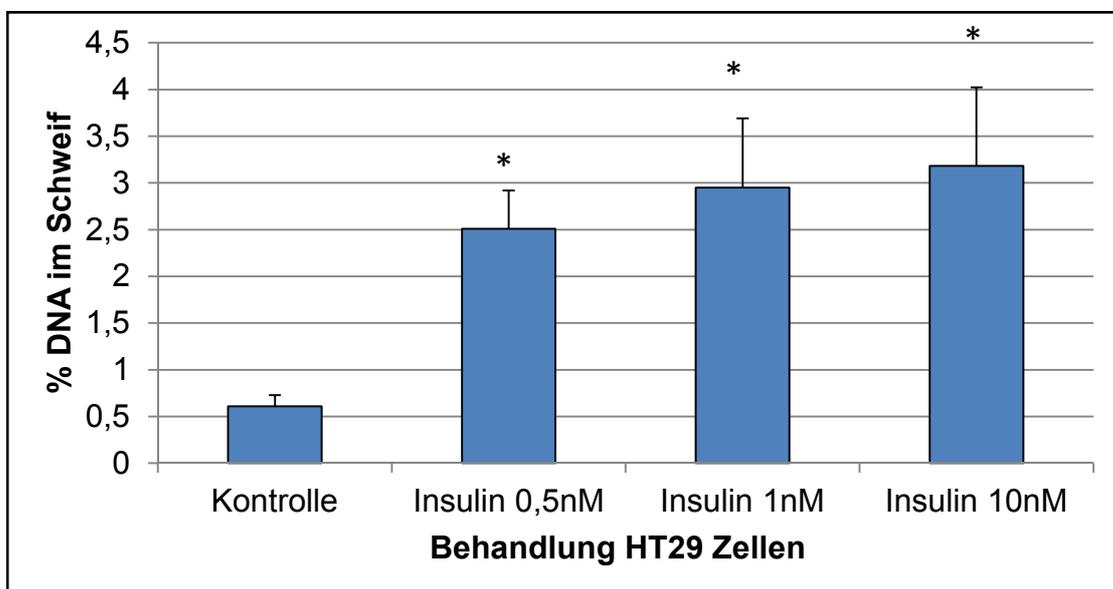


Abb. 20e: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 6 Tage mit 0,5-1nM, 1-2nM und 10-20nM Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif des Kometen, befand. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

Im nachfolgenden Comet Assay (Abb.20f) wurden HT29 Zellen für unterschiedliche Behandlungszeiten (2h, 4h, 8h und 16h) mit 10nM Insulin behandelt. Die DNA-Schädigung steigt mit Erhöhung der Behandlungszeit. Das Ergebnis ist ab 2 Stunden Behandlungszeit signifikant. Gezeigt werden die Durchschnitte dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung.

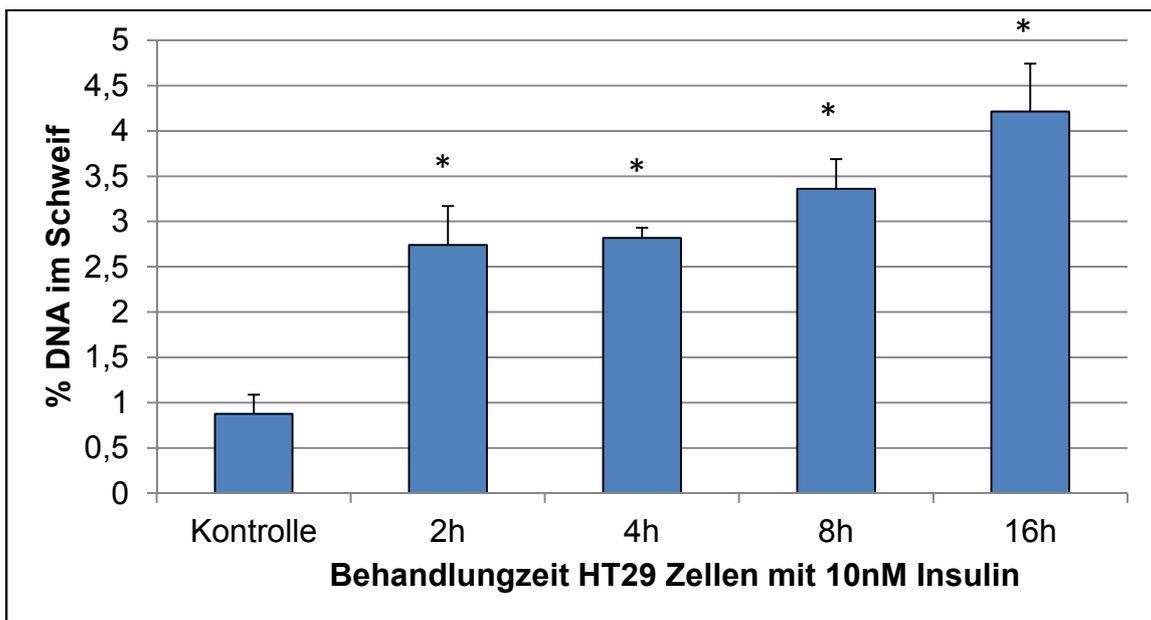


Abb.20f: Zeitabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung bei Behandlung von HT29 Zellen mit 10nM Insulin

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 2,4,8 und 16 Stunden mit 10nM Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif des Kometen, befand. Alle Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.

4.2.1.2. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin reduziert die Insulin-vermittelte DNA-Schädigung

Auch für HT29-Zellen wurden Tests mit Insulin und Wortmannin durchgeführt. In Abbildung 21 wurden HT29 Zellen für den Comet Assay 2 Stunden mit 10nM Insulin und 100nM Wortmannin behandelt. Insulin verursacht mit einer Konzentration von 10nM einen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens in den Zellen. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin selbst verursacht keine Schädigungen in den Zellen. Wurden die Zellen sowohl mit Insulin als auch mit Wortmannin behandelt, ist eine deutliche Reduktion der DNA-Schädigung verglichen mit der Insulinbehandlung zu erkennen. Diese kann jedoch nicht als signifikant beschrieben werden.

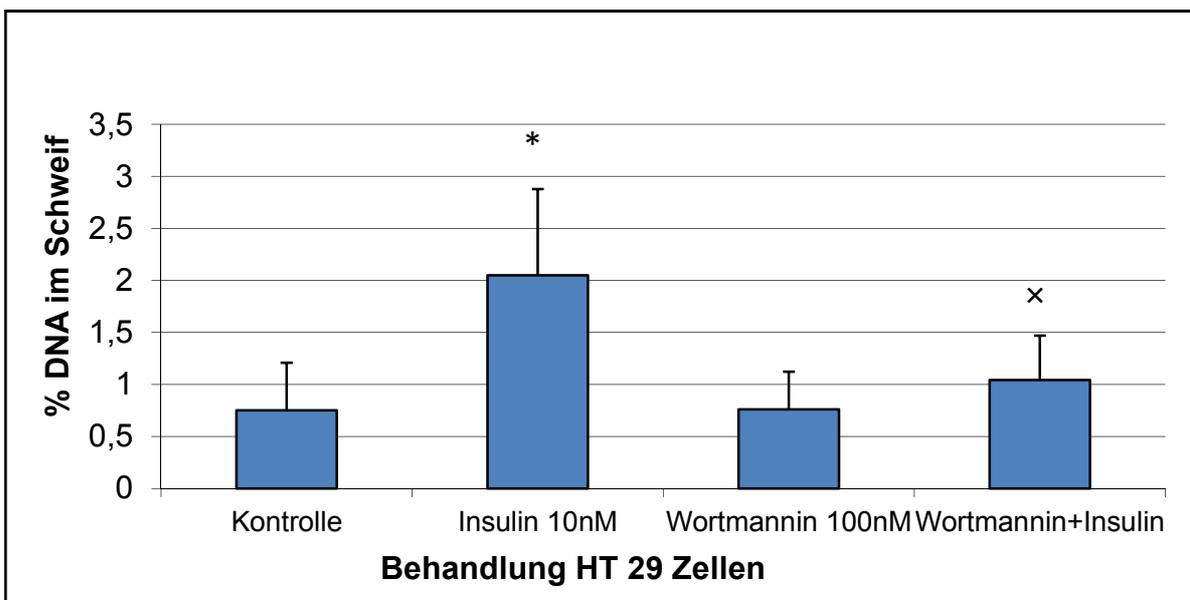


Abb.21: Reduktion der Genotoxizität von Insulin durch Zugabe von Wortmannin in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. HT29 Zellen wurden für 2 Stunden mit 10nM Insulin und 100nM Wortmannin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, in der Schweifregion des Kometen, befindet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit x markiert, nicht signifikante mit ×.

4.2.1.3. Die Blockierung des IGF1-Rezeptors senkt die durch Insulin induzierte DNA-Schädigung

Wie auch schon für Hep-G2 Zellen wurden auch für HT29 Zellen Comet Assays mit Insulin und Picropodophyllin (PPP) durchgeführt. Die durch PPP herbeigeführte Blockierung des IGF1-Rezeptors soll in den folgenden Tests die Insulin-induzierte DNA-Schädigung vermindern. In Abbildung 22 wurden HT29 Zellen für den Comet Assay 2 Stunden mit 10nM Insulin und 50nM PPP behandelt. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Insulin verursacht auch in dieser Testreihe eine signifikante Erhöhung der DNA-Schädigung. Durch die gemeinsame Behandlung der HT29 Zellen mit Insulin und PPP erhielten wir eine signifikante Reduktion der DNA-Schädigung.

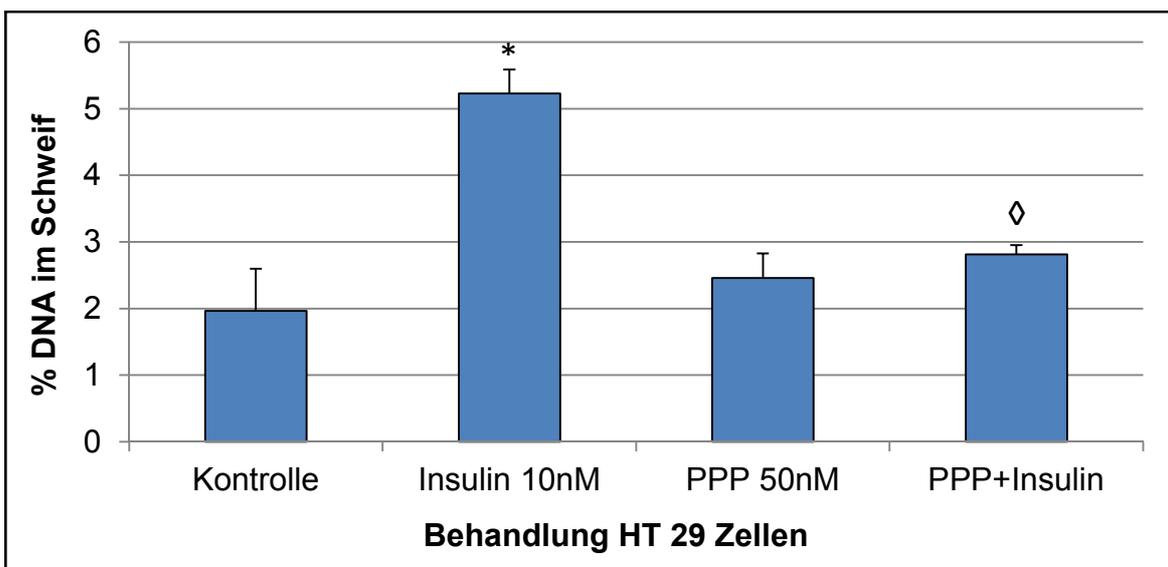


Abb.22: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Blockierung des IGF1-Rezeptors in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays und deren Standardabweichungen. Die DNA-Schädigung ist angegeben als Prozentsatz der DNA, der sich im Schweif des Kometen befindet. HT29 Zellen wurden für 2 Stunden mit 10nM Insulin und 50nM PPP behandelt. Nach Durchführung des Comet Assays wurden die DNA-Strangbrüche quantifiziert. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit ◊ markiert, nicht signifikante mit ×.

4.2.1.4. Der mitochondriale Inhibitor Rotenone mindert die Insulin-induzierte Genomschädigung

In Abbildung 23 ist der Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Mikrokerntests und deren Standardabweichung dargestellt. HT29 Zellen wurden für 4 Stunden mit 2 μ M Insulin und 10nM Rotenone behandelt. Nach 4 Stunden Behandlung erfolgte ein Mediumwechsel und Zugabe von 3 μ g/ml Cytochalasin b. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und es folgte der Cytospin. Wie auch in den vorherigen Experimenten löst Insulin eine signifikante Steigerung der DNA-Schädigung aus. Bei der kombinierten Behandlung von Rotenone und Insulin wird eine signifikante Reduktion der Schädigung erreicht.

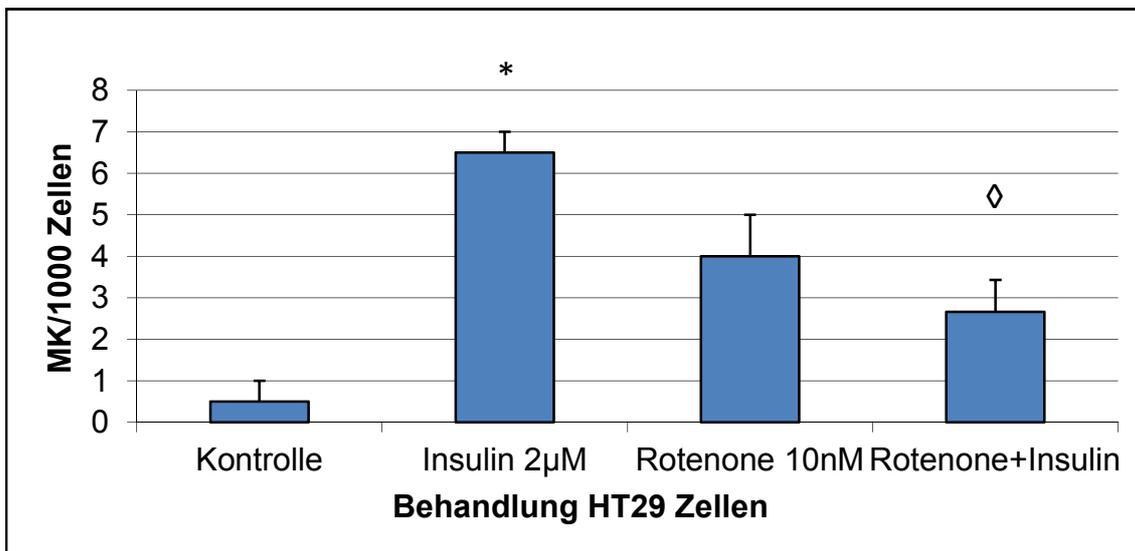


Abb.23: Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Zugabe von Rotenone in HT29 Zellen

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Mikrokerntests und deren Standardabweichung. Für den Mikrokerntest wurden HT29 Zellen für 4 Stunden mit 2 μ M Insulin und 10nM Rotenone behandelt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe von 3 μ g/ml Cytochalasin b. 24 Stunden später wurden die Zellen für den Test geerntet. Die DNA-Schädigung ist angegeben in Mikrokernen pro 1000 doppelkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) verglichen mit der Kontrolle markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante mit \times .

4.2.2. Oxidativer Stress

4.2.2.1. Insulin erhöht den oxidativen Stress in HT29 Zellen

Mithilfe der DHE-Färbung kann man unter dem Mikroskop den oxidativen Stress detektieren. Regt man die behandelten Zellen unter einem UV-Licht-Filter an, so erscheinen die Zellen der Kontrolle blau und die Zellen mit oxidativem Stress rot gefärbte DNA. In Abbildung 24a wurden HT29 Zellen für 30 Minuten mit der DHE-Färbelösung inkubiert. In den letzten 5 Minuten wurden 10nM Insulin zugegeben. Durch Auswertung der Grauwerte von 200 Zellen pro Konzentration mit Image J 1.40g erfolgte die Quantifizierung. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Ein signifikanter Anstieg des oxidativen Stresses gegenüber der Kontrolle ist deutlich sichtbar.

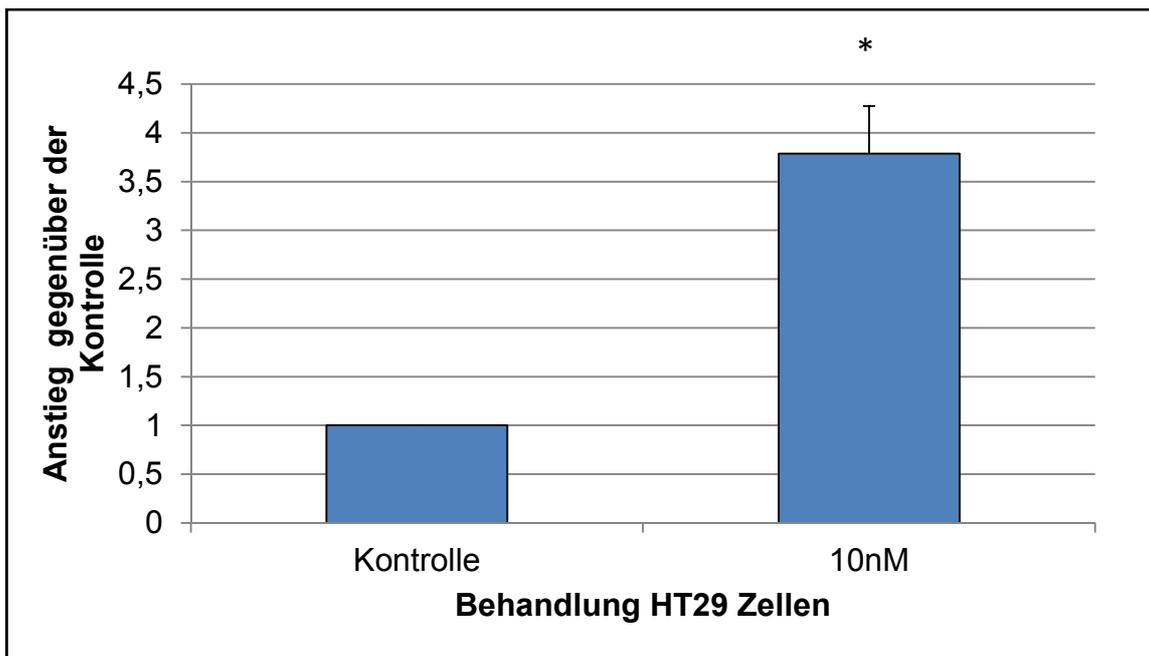


Abb. 24a: Superoxidproduktion in HT29 Zellen

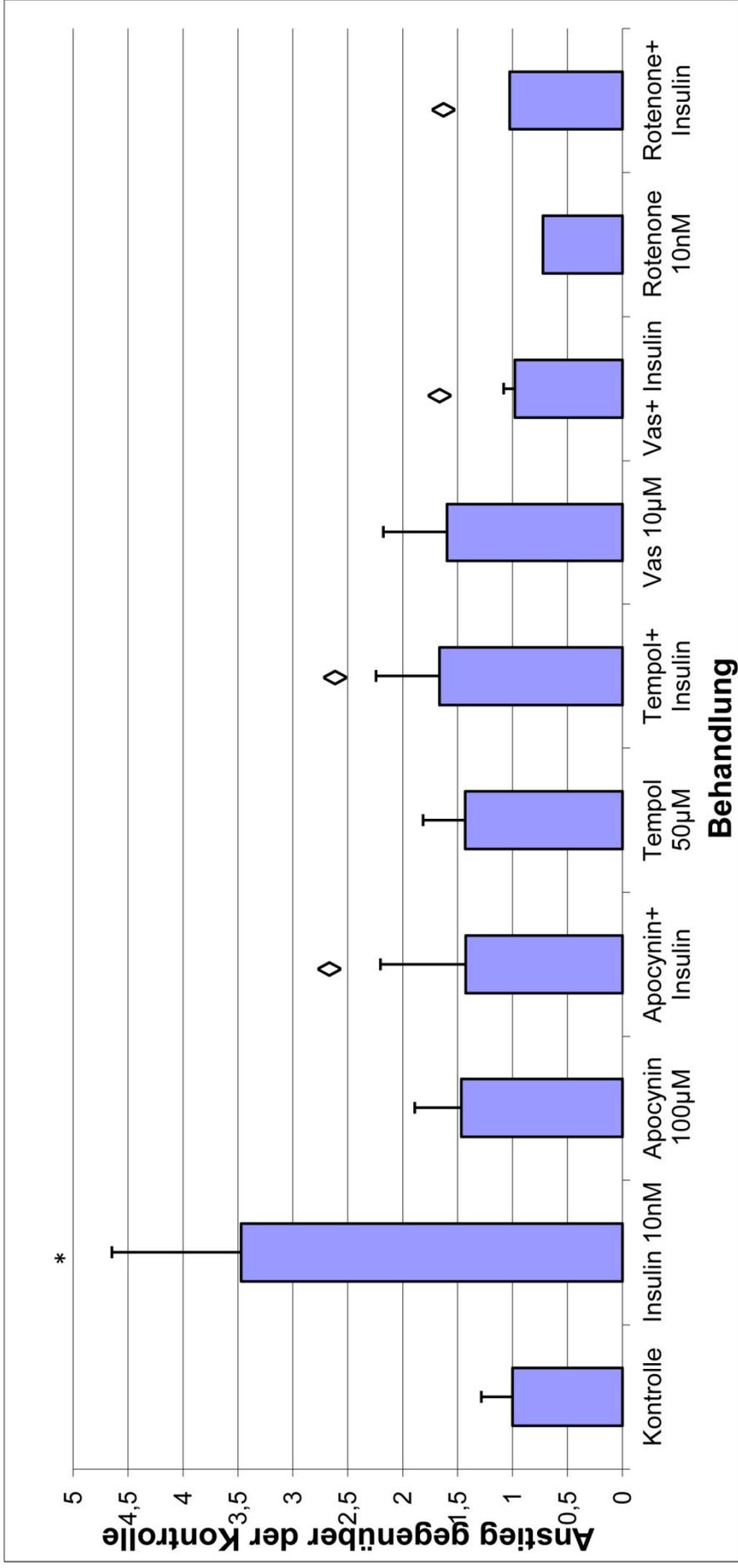
HT29 Zellen wurden für 30 Minuten mit DHE-Färbelösung inkubiert. In den letzten 5 Minuten vor dem Mikroskopieren wurden 10nM Insulin zugefügt. Der oxidative Stress wird als Anstieg gegenüber der Kontrolle angegeben. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Ergebnisse mit einem p -Wert $\leq 0,05$ werden als signifikant (*), nicht signifikante Ergebnisse mit \neq gegenüber der Kontrolle markiert.

4.2.2.2. Der oxidative Stress kann durch Inhibitoren gesenkt werden

Anschließend wurde getestet, ob sich der oxidative Stress durch Einsatz von Antioxidantien und Inhibitoren senken lässt (Abb.24b, S. 59). Hierzu wurden HT29 Zellen mit 10nM Insulin, 100µM Apocynin, 50µM Tempol, 10µM Vas und 10nM Rotenone behandelt. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Durch Auswertung der Grauwerte von 200 Zellen pro Konzentration mit Image J 1.40g erfolgte die Quantifizierung. Insulin alleine löst eine signifikante Erhöhung des oxidativen Stresses aus. Alle der aufgeführten Antioxidantien bzw. Inhibitoren reduzieren in Kombination mit Insulin die Superoxidproduktion signifikant.

Abb.24b: Reduktion der Superoxidproduktion in HT29 Zellen durch Zusatz von Antioxidantien und Inhibitoren

HT29 Zellen wurden für 30 Minuten mit DHE-Färbelösung inkubiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 10nM Insulin, 50nM Tempol, 100µM Apocynin, 1µM VAS und 10nM Rotenone. Der oxidative Stress wird als Anstieg gegenüber der Kontrolle angegeben. Die Abbildung zeigt den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente und deren Standardabweichung. Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ werden als signifikant (), nicht signifikante Ergebnisse mit \neq gegenüber der Kontrolle markiert. Nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Insulinbehandlung signifikante Ergebnisse wurden mit \diamond markiert, nicht signifikante Ergebnisse mit \times .*



4.3. Lymphozyten

4.3.1. Genotoxizitätstests

4.3.1.1. Genotoxizität von Insulin

Nach den Experimenten mit humanen Tumorzelllinien, sollen nun auch Primärzellen zur Bestätigung der These, hohe Insulinlevel lösen DNA-Schäden aus, dienen. Es ist möglich aus menschlichem Blut Lymphozyten zu isolieren und diese in Kultur zu bringen. Nach diesem Schritt wurden diese Zellen für 30 Minuten und 16 Stunden mit Insulin behandelt (10nM und 100nM). Es wurden Comet Assays und Mikrokerntests durchgeführt. Diese Experimente wurden gemeinsam mit Dr. Eman Othman Sholkamy durchgeführt [45]. Die Abbildungen 25a, 25b, und 25c zeigen jeweils den Durchschnitt dreier unabhängig voneinander durchgeführter Comet Assays bzw. Mikrokerntests und deren Standardabweichung. Sie zeigen konzentrationsabhängige Anstiege der DNA-Schädigung. In allen drei Abbildungen sind diese Anstiege signifikant.

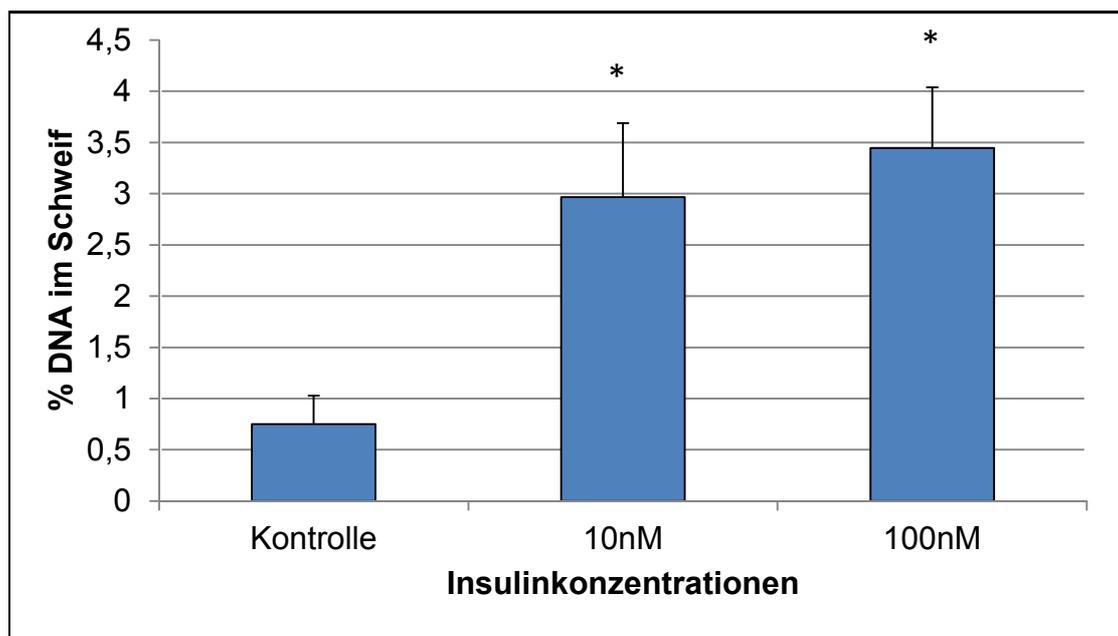


Abb. 25a: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in primären Lymphozyten nach 30 Minuten im Comet Assay

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. Primäre Lymphozyten wurden für 30 Minuten mit 10nM und 100nM Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif des Kometen, befindet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

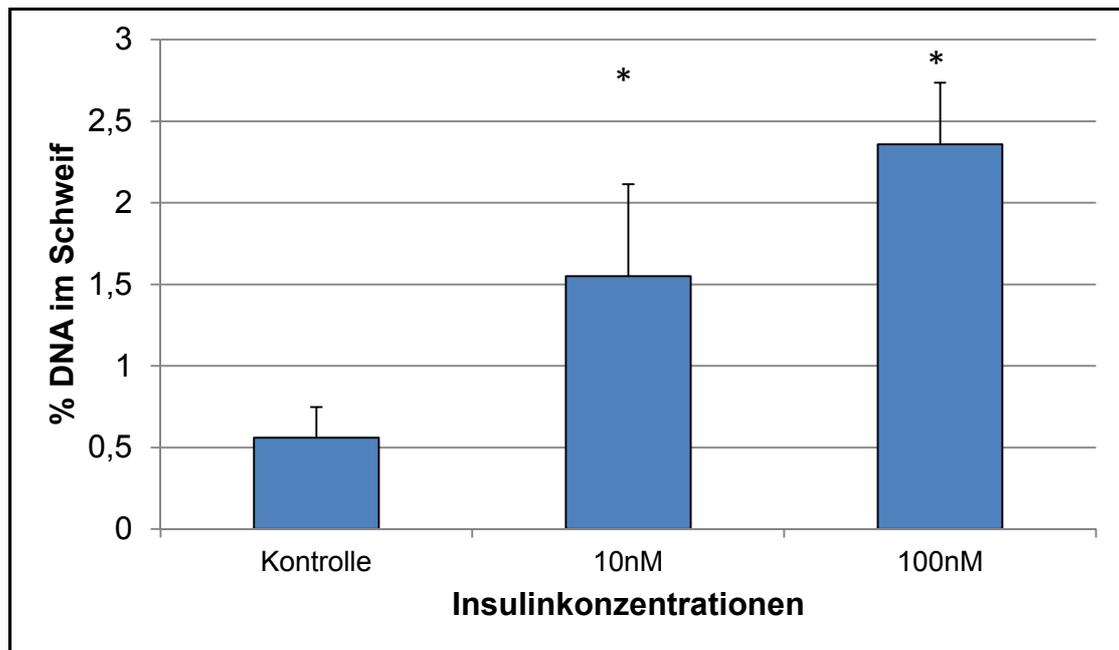


Abb.25b: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung durch Insulin in primären Lymphozyten nach 16 Stunden im Comet Assay

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Comet Assays und deren Standardabweichung. Primäre Lymphozyten wurden für 16 Stunden mit 10nM und 100nM Insulin behandelt. Anschließend wurde die DNA-Schädigung ermittelt. Sie ist angegeben als Prozentsatz der DNA, die sich außerhalb des Kerns, im Schweif des Kometen, befindet. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit \neq markiert.

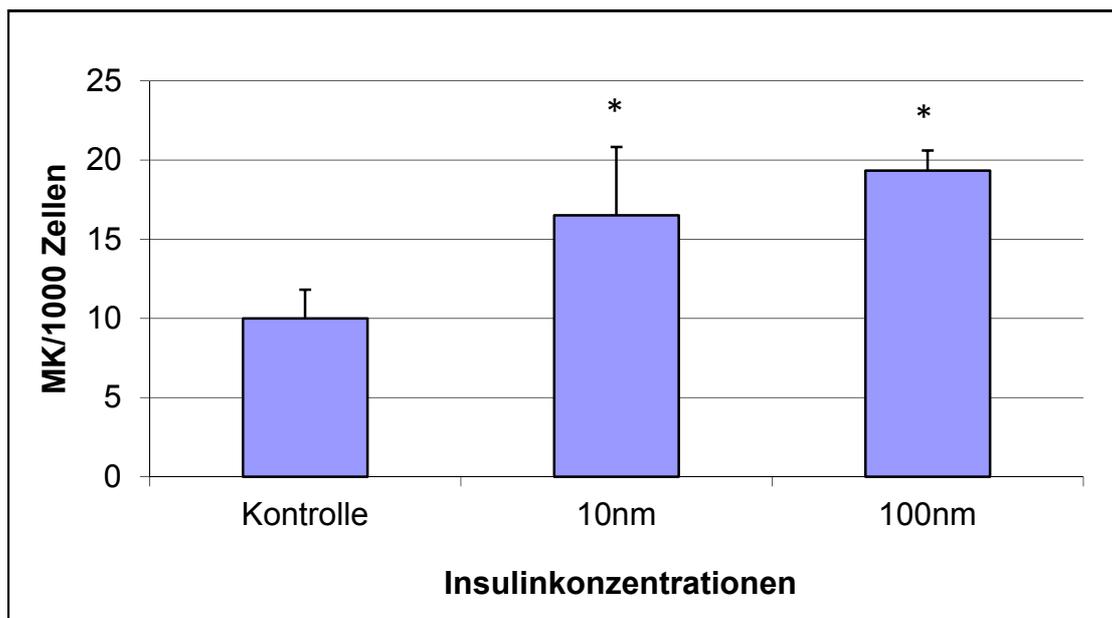


Abb.25c: Konzentrationsabhängige Chromatin-Schädigung durch Insulin in primären peripheren Lymphozyten im Mikrokerntest

Die Abbildung zeigt den Durchschnitt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und deren Standardabweichung. Primäre Lymphozyten wurden 16 Stunden mit 10nM und 100nM Insulin behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden 3µg/ml Cytochalasin b zugegeben und nach 24 Stunde wurde der Test durchgeführt. Angegeben sind die Mikrokerne pro 1000 doppelkernige Zellen. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant (*) markiert. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Ergebnisse wurden mit ≠ markiert.

Den Tabellen 12 und 13 kann man die Vitalität der primären Lymphozyten entnehmen nachdem sie zuvor mit 10nM und 100nM Insulin behandelt wurden. In Tabelle 12 wurden die Lymphozyten 30 Minuten mit Insulin behandelt, in Tabelle 13 für 16 Stunden. Die Behandlungen zeigen keinen signifikanten Abfall der Vitalität verglichen zur Kontrolle (p-Wert $> 0,05$).

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	80,67±8,39
Insulin 10nM	83±8,51
Insulin 100nM	87,5±3,06

Tab.12: Vitalitätstest primärer Lymphozyten nach 30 minütiger Behandlung mit Insulin

Behandlung	Vitalität in %
Kontrolle	89,50±8,32
Insulin 10nM	90,17±3,69
Insulin 100nM	89,50±2,78

Tab.13: Vitalitätstest primärer Lymphozyten nach 16 stündiger Behandlung mit Insulin

5. Diskussion

Die Assoziation von Hyperinsulinämie und Kolonkarzinogenese wurde bereits 1996 im Rattenmodell belegt. Die Ergebnisse der Studie von Tran et al. demonstrierten, dass Insulin ein direkter Promoter der Kolonkarzinogenese ist [46]. Auch humane epidemiologische Studien zeigen diesen Zusammenhang deutlich. Ma et al. beschrieben für Männer mit einem hohen Level an C-Peptid (Indikator für die Insulinproduktion im Körper) ein 2,7-fach erhöhtes Risiko an kolorektalen Karzinomen zu erkranken [47]. 2004 beschrieben Yang et al. in einer Studie, dass Patienten mit der Diagnose eines Typ 2 Diabetes mellitus und chronischer Insulintherapie ein signifikant erhöhtes Risiko haben kolorektale Tumoren zu entwickeln [48]. Mit dem Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und der Entstehung von Leberzellkarzinomen befassten sich Fujino, et al. In dieser Studie wird für Patienten mit Diabetes mellitus ein 1,35-fach erhöhtes Risiko angegeben an Leberzellkarzinomen zu erkranken [49].

Es sind wahrscheinlich viele verschiedene Mechanismen, die zur Entstehung von Kolon- bzw. Leberzellkarzinomen beitragen. Mein Ziel war es zu erforschen, ob hohe Insulinlevel in der Lage sind DNA-Schäden in humanen Kolon- und Leberzellen, sowie in primären humanen peripheren Lymphozyten in vitro auslösen zu können und auf diesem Weg möglicherweise einen Beitrag zu diesem erhöhten Krebsrisiko liefern können. Hep-G2 Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung ab einer Konzentration von 5nM Insulin bei einer Behandlungszeit von 2 Stunden. Im Comet Assay wurden Hep-G2 Zellen mit 100nM Insulin für 5, 15 und 30 Minuten, sowie 2, 4 und 16 Stunden behandelt. Schon ab 5 minütiger Behandlungszeit erhielt man einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung. In HT29 Zellen erhielten wir ab 10nM Insulin ein signifikantes Ergebnis bei 2 stündiger Inkubationszeit. Die geringste genutzte Konzentration für die Behandlung der primären peripheren Lymphozyten betrug 10nM Insulin und auch für diese Zellen ergab sich eine signifikante Erhöhung der DNA-Schädigung. Diese Behandlung der primären Lymphozyten unterstützte umso mehr die Relevanz unserer Hypothesen für primäre Gewebe, denn es handelt sich hierbei im Gegensatz zu Hep-G2 und HT29 Zellen um keine mehr

oder weniger transformierte Zelllinie. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass stark erhöhte Insulinlevel in der Lage sind Genomschäden zu verursachen.

Weiterhin wurde mit 10nM Insulin die Indizierung von oxidativem Stress in HT29 Zellen getestet. Dieses Ergebnis zeigte eine signifikante Erhöhung von ROS. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beschrieben auch Mahadev et al. und andere Autoren in verschiedenen Studien, dass Insulin die ROS-Produktion stimuliert [50,51].

Um den pathophysiologischen Insulinlevels bei Patienten mit Hyperinsulinämie möglichst nah zu kommen, testeten wir HT29 Zellen nach chronischer Insulinexposition von 6 Tagen mit 0,5nM Insulin. Nach dieser Zeit erhielten wir auch für 0,5nM Insulin einen signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung. Pathophysiologische Levels erreichen bei Patienten mit Hyperinsulinämie nach Mahlzeiten ca. 1nM, somit bestätigten wir in vitro, dass auch schon diese Konzentrationen an Insulin Genomschädigungen auslösen können. Natürlich werden weitere Untersuchungen auch in vivo erforderlich sein um die Hypothese, dass solche Schäden auch im Patienten entstehen können, weiterhin zu unterstützen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob bestimmte Antioxidantien und Inhibitoren in der Lage sind Insulin-induzierte Schäden zu reduzieren. Zunächst wurde die schützende Wirkung des Antioxidans Tempol in Hep-G2 Zellen untersucht. Sowohl im Comet Assay als auch im Mikrokerntest löste die alleinige Behandlung der Zellen mit 50µM Tempol einen Anstieg der DNA-Schädigung aus. Nur im Mikrokerntest war die Reduktion der Insulin-vermittelten DNA-Schädigung durch Tempol signifikant. Trotzdem kann man auch im Comet Assay von einem möglicherweise protektiven Effekt durch Tempol ausgehen wenn man annimmt, dass bei kombinierter Behandlung von Insulin und Tempol eine Summierung der Einzelschädigungen stattfinden müsste. Das Ergebnis zeigte jedoch keine Aufsummierung. Eine mögliche Ursache für das schädigende Potential von Tempol auf Hep-G2 Zellen könnte eine zu hoch gewählte Konzentration an Tempol gewesen sein.

HT29 Zellen zeigten auf, dass Tempol signifikant den durch Insulin vermittelten oxidativen Stress reduzieren kann. Der protektive Effekt von Tempol gegen Insulin-induzierte DNA-Schädigung und die Formation eines superoxid-spezifischen Produkts nach der Oxidation des Färbemittels DHE zeigte, dass die Genotoxizität von Insulin durch oxidativen Stress ausgelöst wurde und hauptsächlich Superoxid-vermittelt war.

Anschließend wurden Hep-G2 Zellen mit Insulin und 15mM bzw. 30mM Glucose behandelt. In dieser Testreihe reduzierten 15mM Glucose im Mikrokerntest die Insulin-vermittelte DNA-Schädigung signifikant. Alle anderen Tests mit Glucose zeigten keine signifikante Verminderung der Genom-schädigung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch hier die Konzentration von 30mM Glucose für Hep-G2 Zellen zu hoch gewählt war und daher auch die alleinige Behandlung mit dieser hohen Konzentration Schäden auslöste.

Eine wichtige Quelle für die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies ist die NADPH-Oxidase. Um diese Quelle zu inhibieren wurden Hep-G2 Zellen zusätzlich mit dem Antioxidans und NADPH-Oxidase Inhibitor Apocynin und VAS2870 behandelt [34,52]. Vas2870 zeigte einen signifikanten Rückgang der DNA-Schädigung sowohl im Mikrokerntest, als auch im Comet Assay. Der Comet Assay mit Apocynin zeigte auch einen signifikanten Rückgang der Schädigung, während im Mikrokerntest keine signifikante Verminderung der Schädigung zu beobachten war. In dieser Testreihe löste Apocynin als alleinige Zugabe zu Hep-G2 Zellen eine Erhöhung der Schädigung aus. Auch hier könnte eine zu hoch gewählte Konzentration Ursache für dieses Ergebnis sein.

Der durch Insulin induzierte oxidative Stress bzw. dessen Reduktion durch Apocynin und VAS2870 wurde in HT29 Zellen nachgewiesen. Hier zeigen beide Substanzen eine signifikante Reduktion des superoxidspezifischen Produktes. Dies bestätigte, dass ein wesentlicher Teil der Reaktiven Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase gebildet wird und sie wesentlich an der durch Insulin hervorgerufenen Überproduktion von ROS beteiligt war. Durch Inhibierung dieses Enzyms mit Apocynin und Vas2970 ließ sich die Insulin-vermittelte Schädigung deutlich reduzieren.

Eine weitere sehr wichtige Quelle für die Bildung von ROS sind Mitochondrien. Um diese Quelle zu inhibieren wurde Rotenone verwendet. Rotenone inhibiert nicht-kompetitiv den mitochondrialen Komplex I der Atmungskette [32,33]. Sowohl in Hep-G2 Zellen, als auch in HT29 Zellen senkten 10nM Rotenone die Insulin-induzierte DNA-Schädigung signifikant. Auch den durch Insulin ausgelösten oxidativen Stress in HT29 Zellen senkte Rotenone signifikant. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein weiterer wesentlicher Teil der ROS von den Mitochondrien gebildet werden und die Substanz Rotenone in der Lage ist diese Schädigung deutlich zu reduzieren.

Anschließend wurde Wortmannin eingesetzt, ein pharmakologischer Inhibitor der PI3-Kinase, um den Insulinsignalweg zu hemmen [7]. Sowohl im Comet Assay der Lebertumorzelllinie, als auch der Kolontumorzelllinie reduzierten 100nM Wortmannin signifikant die Insulin-vermittelte DNA-Schädigung. Der Mikrokerntest mit Hep-G2 Zellen zeigte auch eine Reduktion der Chromatidschädigung, die allerdings nicht signifikant war. Durch die Hemmung des Insulinweges ist es also auch möglich eine Reduktion der Schädigung zu bewirken. Weiterhin wurde HNMPA-(AM)₃ genutzt um den Signalweg von Insulin zu blockieren. Der Antagonist des Insulinrezeptors bindet an diesen und blockiert ihn so für die Bindung mit Insulin [16]. Das Ergebnis der Tests in denen Hep-G2 Zellen mit 100µM HNMPA-(AM)₃ und Insulin behandelt wurden, zeigte genau die zu erwartende signifikante Reduktion der DNA-Schädigung. Eine weitere für Insulin mögliche Bindungsstelle ist der IGF1 Rezeptor. Liegen stark erhöhte Levels an Insulin vor, so ist auch eine Bindung mit diesem Rezeptor möglich. Durch die Verwendung von 50nM PPP, einem Inhibitor des IGF1 Rezeptors, sollte diese Möglichkeit der Insulinbindung unterbunden werden [35,36]. Und auch mit diesem Inhibitor zeigte sich eine signifikante Reduktion der DNA-Schädigung in Hep-G2 Zellen und HT29 Zellen. Man kann also davon ausgehen, dass Insulin in diesem Konzentrationsbereich in vitro an beide Rezeptoren bindet und auch beide Rezeptoren für die Induktion von DNA-Schäden verantwortlich sind.

Zusätzlich wurde eine Testreihe mit Hep-G2 Zellen und 100nM Plumbagin durchgeführt. Diese Substanz ist bekannt für ihre präventiven, antiproliferativen und apoptotischen Effekte gegenüber dem Wachstum von Krebszellen [30].

Zudem ist sie ein Inhibitor der NOX4-Isoform der NADPH-Oxidase. Auch die Ergebnisse dieser Testreihe zeigten eine signifikante Reduktion der Insulin-induzierten DNA-Schädigung durch Zugabe von Plumbagin.

Der Hauptteil dieser Arbeit zeigt auf, dass die Behandlung von Kolon-, Leberzellen, sowie peripheren humanen Lymphozyten mit Insulin in vitro Genomschädigungen induziert. Gleiche Effekte beschreibt auch Othman et al. für andere Zelltypen [16]. Die geringste genutzte Konzentration in vitro war 1nM für kurze und 0,5nM für eine lange Expositionszeit von 6 Tagen. Für beide Konzentrationen kann man anhand der oben aufgeführten Ergebnisse signifikante Anstiege der Genomschädigung nachweisen. Pathophysiologische Insulinlevel bei Patienten mit Hyperinsulinämie erreichen nach dem Essen ca. 1nM. Somit zeigt diese Arbeit relevante Ergebnisse auf, die deutlich darauf hinweisen, dass Patienten mit Hyperinsulinämie ein erhöhtes Risiko für Genomschädigungen aufweisen könnten. Ob diese beobachteten Effekte auch in vivo auftreten und ob sie tatsächlich die Entstehung von Tumoren initiieren oder deren Entstehung und Progression fördern, muss weiterführend geklärt werden. Sollte sich die These, dass hohe Insulinlevels DNA-Schäden hervorrufen können auch in vivo bestätigen, sind die Ergebnisse mit den Inhibitoren und Antioxidantien von besonderer Bedeutung. Sie könnten auch nach Bestätigung der Effekte in vivo eine Möglichkeit der pharmakologischen Intervention bei Hyperinsulinämie aufzeigen. Ein wichtiges Ziel muss es sein die Menge an Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei Hyperinsulinämie zu vermindern, so dass wieder nur noch physiologische Levels an ROS vorliegen. ROS sind notwendig für die physiologische Signaltransduktion. Sie dienen als Signalmoleküle und sind Bestandteil der Immunabwehr. Allerdings sollten pathophysiologische ROS-Level vermieden werden um Genomschädigungen und eventuell daraus resultierende Mutationen, welche mit der Entstehung von Karzinomen assoziiert sind, zu verhindern.

6. Zusammenfassung

Insulin ist ein essentielles Hormon im menschlichen Körper, welches für die Senkung der Blutglukosekonzentration, die Bildung von Energiespeichern und das Zellwachstum verantwortlich ist. Eine mit der Fehlregulation der Insulinproduktion einhergehenden Krankheit ist der Diabetes mellitus. Für diese Arbeit spielt der Typ 2 dieser Erkrankung eine wichtige Rolle. Es entwickelt sich bei Patienten mit diesem Typ des Diabetes mellitus langsam eine Insulinresistenz, die zunächst durch eine kompensatorische Überproduktion von Insulin charakterisiert ist. Dieser Zustand der Hyperinsulinämie kann Jahre bis Jahrzehnte andauern, ehe es zu einem Versagen der β -Zellen des Pankreas und somit zu einer Hypoinsulinämie kommt. In dieser Arbeit war es Ziel herauszufinden, ob diese lange Zeit herrschende Hyperinsulinämie einen Einfluss auf die menschliche DNA hat. Die Genotoxizität von hohen Insulinkonzentrationen wurde in Hep-G2 Zellen, HT29 Zellen, sowie primären humanen peripheren Lymphozyten mithilfe des Comet Assays und des Mikrokerntests nachgewiesen. Oxidativer Stress bzw. dessen Reduzierung durch Antioxidantien und Inhibitoren wurde in HT29 Zellen mithilfe der DHE-Färbung detektiert. Diese Arbeit belegt dass sich Insulin schädigend auf das menschliche Genom in vitro auswirken kann. Eine besondere Relevanz haben die durchgeführten Experimente mit primären menschlichen Lymphozyten. Denn bei ihnen handelt es sich um Zellen, die im Gegensatz zu der auch genutzten humanen Leberkarzinomzelllinie Hep-G2 und der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 nicht transformiert sind. Eine weitere wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass schon pathophysiologisch vorliegende Insulinkonzentrationen in der Lage sind Genomschädigungen in vitro zu induzieren. HT29 Zellen zeigten bei Kurzzeitbehandlung mit nur 1nM Insulin eine signifikante Erhöhung der DNA-Schädigung. Bei Langzeitexposition von 6 Tagen konnten schon 0,5nM signifikante DNA-Schäden hervorrufen. Diese durch Insulin hervorgerufenen Schäden könnten, falls sie so auch in vivo entstehen, bei Versagen von Reparaturmechanismen zur Entstehung von Mutationen und sich daraus entwickelnden Karzinomen beitragen. Aus diesem Grund war ein

weiteres Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob bestimmte Antioxidantien oder Inhibitoren in der Lage sind die Insulin-induzierten Genomschädigungen zu verringern. Hierfür wurde Tempol, Apocynin, Plumbagin, VAS2870, Rotenone, PPP, HNMPA-(AM)₃ und Wortmannin genutzt. Tatsächlich sind diese Substanzen in der Lage die durch Insulin hervorgerufene Schädigung zu reduzieren. Die positiven Ergebnisse dieser Arbeit könnten einen ersten Hinweis auf eine mögliche pharmakologische Intervention bei Hyperinsulinämie mit dem Ziel der Senkung des erhöhten Krebsrisikos geben. Eine wichtige Erkenntnis aus den Ergebnissen meiner Arbeit ist, dass die Reduzierung des oxidativen Stresses eine Reduzierung der Genomschädigung bewirkt. Die genutzten Substanzen Apocynin, Tempol, VAS2870 und Rotenone bewirkten in HT29 Zellen eine signifikante Reduzierung des durch Insulin ausgelösten oxidativen Stresses. Um aber genauere Aussagen über Möglichkeiten der Therapie bei Hyperinsulinämie zu treffen, sollten Folgestudien auch in vivo folgen, welche die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte bestätigen.

7. Literaturverzeichnis

1. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. Thieme; 2.Auflage: 655
2. Chang L, Chiang S, Saltiel AR. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Molecular Medicine* 2004; 10 (7-12): 65-70
3. Derewenda U, Derewenda Z, Dodson GG, et al. Molecular structure of insulin: The insulin monomer and its assembly. *Br Med Bull* 1989; 45(1): 4-18
4. <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Insulin>
5. Rhodes CJ. Diabetes mellitus: A Fundamental and Clinical Text. 3rd Edition, 2004; 27-50
6. Vigneri R, Squatrito S, Sciacca L. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors. *Acta Diabetol* 2010; 47: 271-278
7. Li C, Zhang BB. Insulin signaling and action: glucose, lipids, protein. Chapter 2, 2007
8. White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: 2-17
9. Hooper C. Insulin Signaling Pathways. abcam discover more, <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10602&pid=7>
10. Goldstein BJ, Mahadev K, et al. Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. *Antioxid Redox Signal* 2005, 7(7-8): 1021-1031
11. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(24): 21938-21942
12. Yang X, Nath A, Opperman MJ, Chan C. The Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase Differentially Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 in HepG2 Cells. *Molecular Biology of the Cell* 2010; 21: 3449-3458
13. Giovannucci E. Insulin and colon cancer: *Cancer Causes Control*. 1995; 6: 164-179

14. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am. J. Clin Nutr* 2007; 86: 836-842
15. Calle EE, Kaaks R. Overweight, Obesity and Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Nature Reviews* 2004; 4: 579-590
16. Othman E, et al. Insulin-Mediated Oxidative Stress and DNA Damage in LLC-PK1 Pig Kidney Cell Line, Female Rat Primary Kidney Cells, and Male ZDF Rat Kidneys in Vivo. *Endocrinology* 2013; 1-10
17. Cordain L. et al. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *CBP Part A* 137 2003; 95-112
18. Komninou D, et al. Insulin Resistance and its Contribution to Colon Carcinogenesis. *EBM* 2003; 396-405
19. Gurav AN. Periodontitis and Insulin Resistance: Casual or Causal Relationship?, *Diabetes & Metabolism Journal* 2012; 36: 404-411
20. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension. Journal of the American Heart Association* 2003; 42: 1075-1081
21. Verbon EH, Post JA, Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2012; 511: 1-6
22. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 337: 1-13
23. Valko M, Leibfritz D, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44-84
24. Vigneri P, Frasca F, et al. Diabetes and Cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2009, 16: 1103-1123
25. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Diabetes and Colorectal Cancer Incidence in the Cohort of Swedish Men. *Diabetes Care* 2005; 28 (7): 1805-1807
26. Neale RE, et al. Does type 2 diabetes influence the risk of oesophageal adenocarcinoma?, *British Journal of Cancer* 2009; 100: 795-798
27. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity and cancer risk. *The Lancet oncology* 2002; 3: 565-574

28. Quan H, Kang K, Sohn Y, Li M. Tempol reduces injury area in rat model of spinal cord contusion injury through suppression of iNOS and COX-2 expression. *Neurol Sci* 2013; 34: 1621-1628
29. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and other Nitroxides. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 418-469
30. Shih Y, et al. Plumbagin inhibits invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by decreasing products of matrix metalloproteinase-2 and urokinase-plasminogen activator. *The Japan Society of Hepatology* 2009; 39: 998-1009
31. Meng R, et al. Apocynin Improves Insulin Resistance through Suppressing Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Mediators of Inflammation* 2010:858735
32. Kimura R, Ma L, Wu C, et al. Acute Exposure to the Mitochondrial Complex I Toxin Rotenone Impairs Synaptic Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal Slices. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2012; 18: 641-646
33. Cabezas R, et al. Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neuroscience Research* 2012; 74: 80-90
34. Sancho P, Fabregat I. The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF- β -induced apoptosis of liver tumor cells. *Biochemical Pharmacology* 2011; 81: 917-924
35. Doghman M, Axelson M, Lalli E. Potent inhibitory effect of the cyclolignan picropodophyllin (PPP) on human adrenocortical carcinoma cells proliferation. *Am J Cancer Res* 2011; 1(3): 356-361
36. Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocrine-Related Cancer* 2006, 13: 33-43
37. Singh NP, et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 1988; 176: 184-191
38. Tice RR, et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 206-221
39. Fenech M, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic

- bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 125-132
40. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000, 455: 81-95
 41. Welge P, et al. Test auf Genotoxizität in vivo für den Einsatz in Feldstudien am BGFA standardisiert. *BGFA-Info* 2006; 02-06: 14-15
 42. Robinson KM, Janes MS, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *PNAS* 2006; 103(41): 15038-15043
 43. Zhao H, Kalivendi S, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34(11): 1359-1368
 44. Dr. Eman Othman Sholkamy, Dissertationsschrift, In Vitro and In Vivo Analysis of Insulin-Induced Oxidative Stress and DNA Damage, 2013
 45. Othman EM, Leyh A, Stopper H. Insulin mediated DNA damage in mammalian colon cells and human lymphocytes in vitro. *Mutation Research* 2013; 1-6
 46. Tran TT, Medline A, Bruce WR. Insulin promotion of colon tumors in rats. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1996; 5: 1013-1015
 47. Ma J, et al. A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96(7): 546-553
 48. Yang Y, Hennessy S, Lewis JD. Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology* 2004; 127: 1044-1050
 49. Fujino Y, Mizoue T, Tokui N, Yoshimura T. Prospective study of diabetes mellitus and liver cancer in Japan. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2001; 17: 374-379
 50. San José G, Bidegain J, et al. Insulin-induced NADPH oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes/macrophages. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 46: 1058-1067
 51. Mahadev K, Wu X, Zilbering A, et al. Hydrogen Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin

- Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(52): 48662-48669
52. Stolk J, Hiltermann TJN, et al. Characteristics of the Inhibition of NADPH Oxidase Activation in Neutrophils by Apocynin, a Methoxy-substituted Catechol. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1994; 11: 95-102
 53. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249-261
 54. Rojas E, et al. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B* 1999; 722: 225-254
 55. Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 23-29
 56. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives Supplements* 1993; 101(3): 101-107
 57. Murgia E, et al. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res* 2008; 639: 27-34.
 58. Fenech M, et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res* 2003; 534: 45-64.
 59. Yang H, et al. In situ assessment of cell viability. *Cell Transplant* 1998; 7(5): 443-451.
 60. Bartosz G, et al. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 53-76
 61. Rotman B, Papermaster BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. N. A. S.* 1966; 55: 134-141
 62. Iyer VV, Yang H, et al. Effects of Glucose and Insulin on HepG2-C3A Cell Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* 2010; 1-9
 63. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 1996; 74: 297-312

64. Heumüller S, Wind S, et al. Apocynin Is Not an inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. *Hypertension Journal of the American Heart Association* 2008; 51: 211-217
65. Marwaha A, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress and restores renal dopamine D1-like receptor-G protein coupling and function in hyperglycemic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: 58-66
66. Espinosa A, Garcia A, et al. NADPH Oxidase and Hydrogen Peroxide Mediate Insulin-induced Calcium Increase in Skeletal Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(4): 2568-2575
67. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Insulin Action Is Facilitated by Insulin-Stimulated Reactive Oxygen Species With Multiple Potential Signaling Targets. *Diabetes* 2005; 54: 311-318
68. Wu X, Zhu L, Zilbering A, et al. Hyperglycemia Potentiates H₂O₂ Production in Adipocytes and Enhances Insulin Signal Transduction: Potential Role for Oxidative Inhibition of Thiol-Sensitive Protein-Tyrosine Phosphatases. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 7(5/6): 526-536
69. Krieger-Brauer HI, Medda PK, Kather H, Insulin-induced Activation of NADPH-dependent H₂O₂ Generation in Human Adipocyte Plasma Membranes Is Mediated by Gai2. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(15): 10135-10143
70. El-Atat FA, et al. The Relationship between Hyperinsulinemia, Hypertension and Progressive Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15: 2816-2827
71. Burchfiel CM, Sharp DS, et al. Hyperinsulinemia and Cardiovascular Disease in Elderly Men: The Honolulu Heart Program. *Journal of the American Heart Association* 1998; 450-457
72. Vd Kallen CJH, v Greevenbroek MMJ, et al. Endoplasmatic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver?. *Diabetes and Apoptosis* 2009; 14: 1424-1434
73. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The Role for Endoplasmatic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews* 2008; 29: 42-61
74. Duronio V. Insulin receptor is phosphorylated in response to treatment of HepG2 cells with insulin-like growth factor I. *Biochem. J.* 1990; 270: 27-32

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Helga Stopper, die mir durch die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglichte und mir immer mit gutem Rat zur Seite stand.

Ich möchte auch ganz besonders Eman Othman Sholkamy danken, die mich in die Thematik eingearbeitet hat. Ihre Erfahrung und Fähigkeiten trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei. Sehr gerne habe ich mit ihr zusammen gearbeitet.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Toxikologie der Universität Würzburg danke ich für die Unterstützung und Kooperation.

Vielen Dank auch meiner lieben Familie und Manuel, die mich während des Studiums und der Promotionszeit unterstützt haben und stets ein offenes Ohr hatten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Annekathrin Leyh

*22.09.1987 in Schmalkalden, Deutschland

Schulische Ausbildung

09/1994 – 08/1998	Staatliche Grundschule Brotterode
09/1998 – 08/2005	Werratalgymnasium Schwallungen
09/2005 – 06/2006	Philipp-Melanchthon-Gymnasium Schmalkalden, Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

10/2006 – 09/2009	Vorklinischer Studienabschnitt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Abschluss Physikum
10/2009 – 06/2012	Klinischer Studienabschnitt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Abschluss Staatsexamen

Assistenzzeit

05/2013 – 09/2013	Zahnarztpraxis Dr. Leyh-Schlemmer, Brotterode-Trusetal
Seit 09/2013	Zahnarztpraxis Dr. Richter und Dr. Retzbach, Unterpleichfeld

Veröffentlichung

Othman EM, Leyh A, Stopper H. Insulin mediated DNA damage in mammalian colon cells and human lymphocytes in vitro. Mutation Research 2013; 1-6