(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 313 T2** 2006.03.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 723 398 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 313.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/11558**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 930 729.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/010185**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.10.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.04.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **23.03.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.03.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A01N 43/36*** (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/41 (2006.01)
C07D 487/22 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
136207 **15.10.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Duke University, Durham, N.C., US; University of Alabama, Birmingham Research Foundation, Birmingham, Ala., US

(72) Erfinder:
CRAPO, D., James, Durham, US; FRIDOVICH, Irwin, Durham, US; OURY, Tim, Durham, US; DAY, Brian J., Durham, US; FOLZ, J., Rodney, Durham, US; FREEMAN, A., Bruce, Birmingham, US

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(54) Bezeichnung: **SUPEROXIDDISMUTASE MEMETIKA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren zur Modulierung physiologischer und pathologischer Prozesse, und, insbesondere, ein Verfahren zur Modulierung intra- und extrazellulärer Niveaus von Superoxidradikalen und damit Prozesse, an denen solche Radikale beteiligt sind.

Hintergrund

[0002] Freie Sauerstoffradikale werden als Teil des normalen Stoffwechsels aller Zellen produziert, sind jedoch auch ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese bei vielen Krankheitsprozessen. Beispielsweise sind freie Sauerstoffradikale kritische Elemente bei der Pathogenese von Erkrankungen der Lunge, des zentralen Nervensystems und des Skelettmuskels. Freie Sauerstoffradikale spielen auch eine Rolle beim Modulieren der Wirkungen von Stickstoffmonoxid (NO·). In diesem Zusammenhang tragen sie bei zur Pathogenese von Gefäßerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und dem Alterungsprozess.

[0003] Ein kritisches Gleichgewicht von Abwehrenzymen gegen Sauerstoffradikale wird benötigt, um die normale Funktion von Zellen und Organen aufrecht zu erhalten. Superoxiddismutasen (SODs), eine Familie von Metalloenzymen, die die intra- und extrazelluläre Umwandlung von O_2^- in H_2O_2 plus O_2 katalysieren, bilden eine erste Abwehrlinie gegen die schädigenden Wirkungen von Superoxidradikalen. Säuger produzieren drei verschiedene SODs. Eines davon ist ein dimeres, Kupfer und Zink enthaltendes Enzym (CuZn SOD), das im Zytosol aller Zellen zu finden ist. Ein zweites ist eine tetramere Mangan-enthaltende SOD (Mn SOD), die in Mitochondrien zu finden ist, und das dritte Enzym ist ein tetrameres, glykosyliertes, Kupfer und Zink enthaltendes Enzym (EC-SOD), das sich in den extrazellulären Flüssigkeiten und gebunden an die extrazelluläre Matrix findet. Bekannter Maßen gibt es in Zellen mehrere andere wichtige antioxidative Enzyme, einschließlich Katalase und Glutathionperoxidase. Während Extrazellulärflüssigkeiten und die extrazelluläre Matrix nur geringe Mengen dieser Enzyme enthalten, ist die Existenz weiterer, extrazellulärer Antioxidantien bekannt, einschließlich Radikalfängern und Inhibitoren der Lipidperoxidation, wie etwa Ascorbinsäure, Harnsäure und α-Tocopherol (Halliwell et al, Arch. Biochem. Biophys. 280: 1 (1990)). Der relative Mangel an extrazellulären antioxidativen Enzymen könnte die mögliche Funktion extrazellulärer reaktiver Sauerstoff-Spezies als Bioeffektormoleküle widerspiegeln (Halliwell et al, Arch. Biochem. Biophys. 280: 1 (1990)). Der relative Mangel an solchen Enzymen kann auch in einer größeren Empfindlichkeit auf extrazellulären oxidativen Stress resultieren.

[0004] Das Enzym EC-SOD kommt an vielen extrazellulären Orten nur in geringen Konzentrationen vor. Obwohl seine physiologische Funktion in vivo an vielen extrazellulären Orten noch definiert werden muss, nimmt man nicht an, dass EC-SOD als Massen-Fänger von O_2^- fungiert. Wie oben angegeben, ist EC-SOD ein tetrameres, Cu/Zn-enthaltendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von 30.000 (Marklund, Proc. Natl. Acad Sci. USA 79: 7634 (1982); Tibell et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6634 (1987); siehe auch US-Patent 5,130,245 und WO 91/04315). Biochemische Daten deuten darauf hin, dass EC-SOD an Heparansulfat-Proteoglykane auf endothelialen Zellen bindet, wo es – wie vermutet wird – als „schützende Hülle" fungiert (Marklund, J. Clin. Invest. 74: 1398 (1984); Karlsson et al, Biochem. J. 255: 223 (1988)). Endotheliale Zellen sekretieren sowohl O_2^- (Halliwell, Free Radical Res. Commun. 5: 315 (1989)) als auch Endothel-abgeleiteten Relaxierenden Faktor, mutmaßlich identifiziert als Stickstoffmonoxid (NO·) (Noak und Murphy, in: Oxidative Stress Oxidants and Antioxidants, Herausgeber Sies, H. (Academic, San Diego) S. 445–489 (1991)). NO· fungiert als Vasoregulator und als Regulator der Neurotransmission (Schuman und Madison, Science 254: 1503 (1991)). NO· kann jedoch in bestimmten Situationen toxisch gegenüber Neuronen sein (Dawson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6368 (1991)). Es ist bekannt, dass O_2^- die von NO· induzierte Vasorelaxation inaktiviert (Gryglewski et al, Nature 320: 454 (1986); Rubanyi und Vanhoutte, Am. J. Physiol. 250: H822 (1986); Rubanyi und Vanhoutte, Am. J. Physiol. 250: H815 (1986); Bult et al, Br. J. Pharmacol. 95: 1308 (1988); Nucci et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 2334 (1988)). Somit besteht eine mögliche Funktion von EC-SOD darin, das von Zellen freigesetzte NO· vor der O_2^--vermittelten Inaktivierung zu schützen.

[0005] Es ist außerdem bekannt, dass die Reaktion von O_2^- mit NO· ein potentiell toxisches Zwischenprodukt in Form des Peroxynitritanions ($ONOO^-$) erzeugt (Beckmann et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1620 (1990); Mulligan et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6338 (1991); Hogg et al, Biochem. J. 281: 419 (1992); Matheis et al, Am. J. Physiol. 262: H616 (1992)). Somit könnte EC-SOD auch die Funktion haben, die Bildung von $ONOO^-$ zu verhindern.

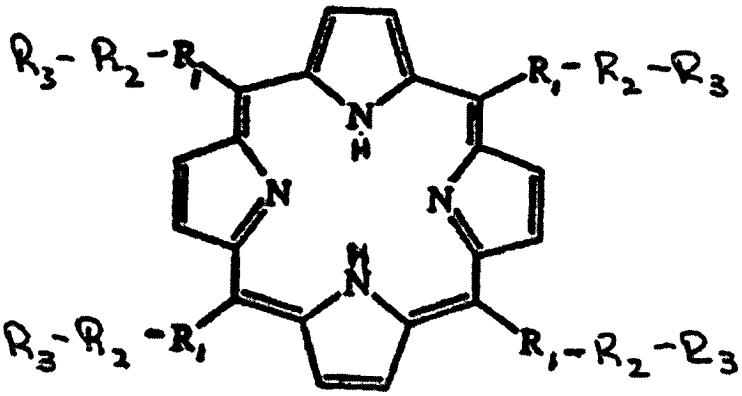
[0006] Überraschender Weise ist herausgefunden worden, dass EC-SOD die O_2-Toxizität auf das zentrale

Nervensystem eher erhöht als vermindert und dass dieser Effekt von EC-SOD über die Modulation von NO· erfolgt. Dieses Ergebnis impliziert, dass NO· ein wichtiger Mediator der O_2-Toxizität ist. Die Erfindung betrifft somit Verfahren zur Manipulation der Stickstoffmonoxidfunktion, die die Verwendung extrazellulärer Antioxidantien einbeziehen. Diese Verfahren finden Anwendung bei verschiedenen Krankheiten und nicht-pathologischen Zuständen, bei denen oxidativer Stress eine Rolle spielt, einschließlich Entzündung. In einem weiteren Sinn betrifft die Erfindung allgemein Verfahren der Modulation intra- und extrazellulärer Prozesse, an denen $O2^-$ beteiligt ist.

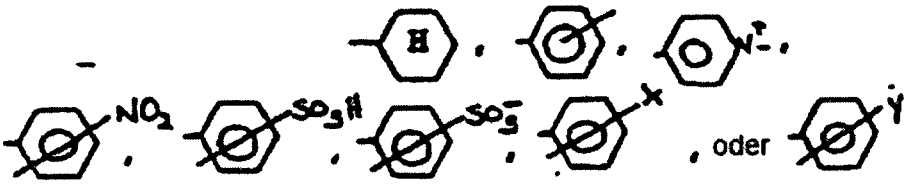
Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modulation intra- oder extrazellulärer Spiegel an Superoxidradikalen. Spezifischer ausgedrückt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Modulation normaler oder pathologischer Prozesse, an denen Superoxidradikale beteiligt sind, unter Verwendung z.B. niedermolekularer Mimetika von SOD.

[0008] In einem Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines Mimetikums von Superoxiddismutase mit der Formel



oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon bereit,
wobei
R_1 eine Bindung,



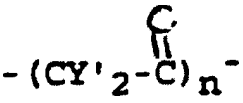
ist,
wobei X ein Halogen ist und Y eine Alkylgruppe ist und
wobei



eine Bindung an R_2 an irgendeiner Position bezeichnet und



eine Bindung an R_2 und den Substituenten an irgendeiner Position bezeichnet und
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2-CY'=CY')_n^-$, $-(CY'_2-CY'_2-CH=CH)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder

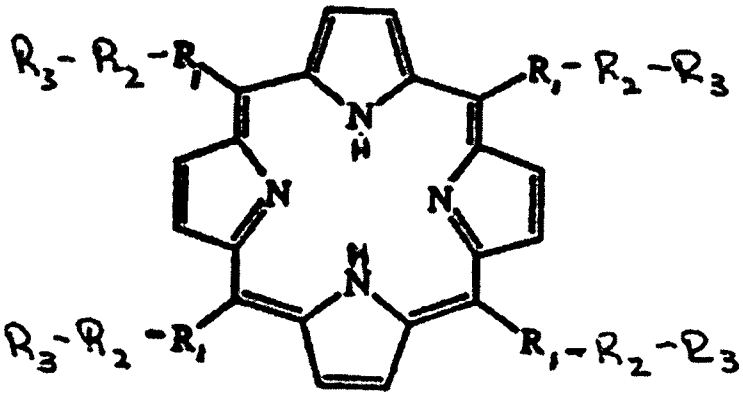


ist,

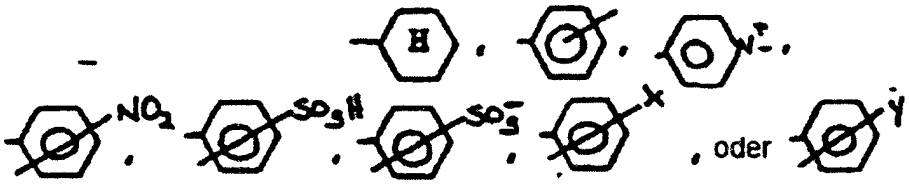
wobei Y' Wasserstoff oder eine Alkylgruppe ist und n 1 bis 8 ist und
R_3 -Y", -OH, $-NH_2$, $-N^+(Y")_3$, -COOH, -COO-, $-SO_3H$, $-SO_3$-, $-CH_2-PO_3H_2$ oder $-CH_2-PO_3H$- ist, wobei
Y" eine Alkylgruppe ist, komplexiert mit Mangan,
bei der Herstellung eines Medikaments zum Schutz von Zellen vor durch Superoxidradikal induzierter Toxizität in einer oder mehreren der folgenden Anwendungen:

1. dem Schutz gegen ischämische Reperfusionsverletzungen, die mit Myokardinfarkt, Schlaganfall, akutem Kopftrauma, Organreperfusion nach Transplantation, Darmischämie, Lungeninfarkt, chirurgischer Okklusion des Blutstroms oder Weichgewebeverletzung einhergehen,
2. dem Schutz gegen Skelettreperfusionsverletzungen,
3. dem Schutz gegen Schädigung von Haut und Augen durch Sonnenstrahlung,
4. dem Schutz gegen Schädigung der Augen durch Glaukom oder Makuladegeneration,
5. dem Schutz gegen Knochenerkrankung,
6. dem Schutz gegen Bindegewebsstörungen, die mit Störungen der Kollagensynthese oder Degradation einhergehen,
7. der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems,
8. der Behandlung von Erkrankungen der Muskulatur,
9. der Behandlung von neurologischen Störungen,
10. der Behandlung von Arthritis, systemischem Bluthochdruck, Arteriosklerose, Ödem, septischem Schock, pulmonalem Hochdruck, Impotenz, Unfruchtbarkeit, Endometriose, vorzeitigen Gebärmutterkontraktionen, Gedächtnisstörungen, Mikrobeninfektionen und/oder Gicht,
11. der Behandlung von Entzündungen und
12. der Behandlung von chronischer Sinusitis und/oder Autoimmunerkrankungen.

[0009] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Schutz von Pflanzenzellen vor Superoxidradikal-induzierter Toxizität bereit, umfassend das In-Kontakt-Bringen der Zellen mit einer nicht-toxischen, für den Schutz hinreichenden Menge eines Mimetikums von Superoxiddismutase der folgenden Formel



oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon,
wobei
R_1 eine Bindung,



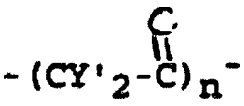
ist,
wobei X ein Halogen ist und Y eine Alkylgruppe ist und
wobei



eine Bindung an R_2 an irgendeiner Position bezeichnet und



eine Bindung an R_2 und den Substituenten an irgendeiner Position bezeichnet und
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2-CY'=CY')_n^-$, $-(CY'_2-CY'_2-CH=CH)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder



ist,
wobei Y' Wasserstoff oder eine Alkylgruppe ist und n 1 bis 8 ist und
R_3 -Y'', -OH, $-NH_2$, $-N^+(Y'')_3$, -COOH, $-COO^-$, $-SO_3H$, $-SO_3^-$, $-CH_2-PO_3H_2$ oder $-CH_2-PO_3H^-$ ist, wobei
Y'' eine Alkylgruppe ist, komplexiert mit Mangan.

[0010] Aufgaben und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der nun folgenden Beschreibung klar werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] Fig. 1 zeigt den EC-SOD-Expressionsvektor, der verwendet wird, um transgene Mäuse herzustellen. Die transgenen Mäuse waren

[0012] Fig. 2 zeigt die Northern-Analyse von Geweben der transgenen Mäuse. Zwanzig µg Gesamt-RNA aus den Geweben transgener Mäuse wurden mit Gloxal denaturiert, einer Elektrophorese auf einem 1,2%igen Agarosegel unterzogen und auf Nitrozellulose geblottet. Die Sondenmarkierung des Filters erfolgte mit der cDNA von vollständiger humaner EC-SOD. Die 2,5 kb-Bande entspricht der mRNA des humanen EC-SOD-Transgens, das die 1 kb große zwischengeschaltete Sequenz enthält (siehe Fig. 1). Die 1,5 kb große Bande entspricht der vollständig prozessierten mRNA des humanen EC-SOD-Transgens.

[0013] Fig. 3 zeigt das prozentuale Überleben transgener und nicht-transgener Mäuse, die für 25 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt wurden. Den Mäusen wurde 10 Minuten vor der Druckbehandlung i.p. Saline injiziert, oder sie erhielten i.p. 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA). 400 mg/kg an Diethyldithiocarbamat (DDC) in Saline wurden 55 Minuten vor der Druckbehandlung i.p. injiziert. *$p < 0,017$, getestet durch χ^2 mit Bonferroni-Korrektur im Vergleich zu transgenen, mit Saline behandelten Mäusen.

[0014] Fig. 4 zeigt die Zeit bis zum Einsetzen des ersten Anfalls bei transgenen und nicht-transgenen Mäusen, die 6 ATA an Sauerstoff ausgesetzt wurden. Den Mäusen wurde 10 Minuten vor Beginn der Druckbehandlung i.p. Saline injiziert, oder sie erhielten i.p. 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA). 400 mg/kg an Diethyldithiocarbamat (DDC) wurden 55 Minuten vor der Druckbehandlung i.p. injiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung der Zeit bis zum ersten Anfall, wobei die Zeit Null angesetzt wurde, als die Kammer 6 ATA erreicht hatte. *$p < 0,05$, getestet durch Analyse der Varianz mittels des Scheffe F-Tests im Vergleich zu nicht-transgenen, mit Saline behandelten Mäusen.

[0015] Fig. 5 zeigt die Wirkung von Diethyldithiocarbamat und β-Mercaptoethanol auf das Überleben in 6 ATA Sauerstoff für 30 Minuten. (C57BL/6 × C3H)F1-Mäuse erhielten 55 Minuten vor der Druckbehandlung durch i.p.-Injektion Saline, 180 mg/kg β-Mercaptoethanol (2-ME) oder 400 mg/kg an Diethyldithiocarbamat (DDC) in Saline. *$p < 0,025$, getestet durch χ^2 mit Bonferroni-Korrektur im Vergleich zu mit Saline behandelten Mäusen.

[0016] Fig. 6 zeigt die Anfalls-Latenzzeit bei wildtypischen Mäusen, die 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt wurden, nachdem sie mit Saline oder 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA) oder 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin plus 50 mg/kg L-Arginin (LNNA + L-Arg) behandelt worden waren. *$p < 0,05$, getestet durch Analyse der Varianz mittels eines gepaarten Student T-Tests im Vergleich zu mit Saline behandelten Mäusen.

[0017] Fig. 7 zeigt das prozentuale Überleben bei wildtypischen Mäusen, die 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt wurden. Die Mäuse erhielten 15 Minuten vor der Druckbehandlung eine i.p.-Injektion mit normaler Saline (0,008 cc/g) oder mit 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA) (0,008 cc/g). Die Mäuse wurden 6 ATA an Sauerstoff ausgesetzt, und zwar für 20 Minuten (n = 10, nur Saline), 25 Minuten (n = 10, beide Gruppen), 30 Minuten (n = 10, nur Saline), 50 Minuten (n = 6, nur LNNA), 75 Minuten (n = 12, nur LNNA), 90 Minuten (n = 14, nur LNNA), 105 Minuten (n = 6, nur LNNA) und 120 Minuten (n = 6, nur LNNA). Dabei wurde das prozentuale Überleben für jede Gruppe gemessen.

[0018] Fig. 8 zeigt die Überlebens/Dosisantwort-Kurve für N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA). Wildtypische Mäuse erhielten eine i.p.-Injektion mit normaler Saline (0,008 cc/g) oder 0, 2, 10, 20 oder 30 mg/kg an LNNA (0,008

cc/g) 15 Minuten vor der Druckbehandlung und wurden dann 75 Minuten lang 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt. Das prozentuale Überleben wurde für jede Behandlungsgruppe berechnet.

[0019] Fig. 9 zeigt das prozentuale Überleben bei Wildtyp-Mäusen, die einer Vorbehandlung mit Saline, 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA) oder 20 mg/kg an N-ϖ-Nitro-L-Arginin plus 50 mg/kg an L-Arginin (LNNA + L-Arg) unterzogen und dann für 75 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt wurden. *p < 0,05, getestet durch χ-Quadrat-Test mit Bonferroni-Korrektur.

[0020] Fig. 10 zeigt das prozentuale Überleben bei transgenen und nicht-transgenen Mäusen, die für 75 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt wurden. Die Mäuse erhielten 10 Minuten vor der Druckbehandlung i.p.-Injektionen mit Saline oder 20 mg/kg N-ϖ-Nitro-L-Arginin (LNNA). *p < 0,05, getestet durch χ^2 im Vergleich zu nicht-transgenen, mit Saline behandelten Mäusen. + p < 0,05, getestet durch χ^2 im Vergleich zu transgenen, mit Saline behandelten Mäusen.

[0021] Fig. 11 zeigt den Vergleich der Ödem-Bildung bei transgenen EC-SOD-Mäusen mit der Ödembildung bei nicht-transgenen Geschwistertieren nach Kälte-induzierter Verletzung an der rechten Gehimhemisphäre sowie bei nicht verletzten Mäusen. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. *p < 0,05 im Vergleich zum Ödem-Index der jeweiligen nicht-transgenen Kontrollen unter Verwendung eines gepaarten Student-T-Tests.

[0022] Fig. 12 zeigt die Wirkung erhöhter Niveaus an EC-SOD auf Veränderungen der Gefäßdurchlässigkeit nach Kälte-induzierter Gehirnverletzung. Die Gefäßdurchlässigkeit wird anhand des Austretens von Evan's Blau in der verletzten rechten Gehimhemisphäre bei nichttransgenen (Kontroll-)mäusen und transgenen EC-SOD-Mäusen gezeigt.

[0023] Fig. 13 zeigt eine Western Blot-Analyse von rh-EC-SOD und einem humanen Lungenhomogenisat zum Nachweis der Antikörper-Spezifität. Die Proteine wurden auf einem 10% 0,75 mm SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die Proteine wurden mit dem Antikörper gegen rekombinante humane EC-SOD (4,3 µg/ml) hybridisiert, und der Antikörper wurde durch Hybridisierung mit ^{125}I-Protein-A, gefolgt von Autoradiographie, detektiert. Die EC-SOD-Spur enthielt 0,05 µg an reinem, rekombinantem humanem Typ C EC-SOD-Protein. Die Lungen-Spur enthielt 10 µg eines 20.000 × g-Überstandes eines humanen Lungenhomogenisats.

[0024] Die Fig. 14A–Fig. 14C zeigen die lichtmikroskopische immunhistochemische Lokalisierung von EC-SOD in der menschlichen Lunge. Das Gewebe wurde unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (5,4 mg/ml; anti-EC-SOD) markiert, oder mittels des entsprechenden Antikörperansatzes, bei dem der anti-EC-SOD IgG unter Verwendung von gereinigter rekombinanter EC-SOD, angeheftet an CNBr-Sepharose (absorbierte EC-SOD), herausgezogen worden war. Die Detektion des Antikörpers erfolgte unter Verwendung einer Markierungstechnik mittels Biotin/Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. A: große elastische Lungenarterie, markiert mit anti-EC-SOD. Zu beachten ist die Markierung um die glatten Muskelzellen unterhalb des Endothels und unterhalb der elastischen Schicht des Gefäßes (kurzer Pfeil), sowie das Fehlen einer Markierung für EC-SOD an der Oberfläche der Endothelzellen (offener Pfeil) und an Elastin (langer Pfeil). B: Muskuläre Lungenarterie, markiert mit anti-EC-SOD. Zu beachten ist ein hohes Maß an Markierung in der das Gefäß umgebenden Bindegewebsmatrix und im Lymphgewebe (langer Pfeil), in der die glatten Muskelzellen umgebenden Matrix (kurzer Pfeil), sowie das Fehlen von Markierung an der Oberfläche der endothelialen Zellen (offener Pfeil). C: Muskuläre Lungenarterie, markiert mit an EC-SOD absorbierten Antiseren. Die Absorption von anti-EC-SOD IgG hebt die gesamte Markierung in dem muskulären Gefäß auf (Balken = 50 µm).

[0025] Die Fig. 15A–Fig. 15C zeigen die immunhistochemische Lokalisierung von EC-SOD in der menschlichen Lunge. Die Gewebe wurden unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (5,4 mg/ml; anti-EC-SOD) markiert. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mittels einer Biotin/Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Markierungstechnik. A: Großer knorpeliger Luftweg, markiert mit anti-EC-SOD. Zu beachten ist die intensive Markierung für EC-SOD in der Matrix um die glatten Muskelzellen (kurzer Pfeil), zwischen den epithelialen Zellen (langer Pfeil) und das Fehlen von Markierung an der Oberfläche der epithelialen Zellen (offener Pfeil), sowie in der Knorpelmatrix (Sternchen). B: Nicht-knorpeliger Luftweg, markiert mit anti-EC-SOD. Zu beachten ist die intensive Markierung für EC-SOD über die gesamte Matrix unterhalb des Epithels (kurzer Pfeil) und das Fehlen von Markierung an der Oberfläche des Epithels (offener Pfeil). C: Lungenparenchym, markiert mit anti-EC-SOD. Die EC-SOD-Markierung findet sich hauptsächlich an den septalen alveolaren Spitzen (kurzer Pfeil) und in der die kleinen Gefäße umgebenden Matrix (langer Pfeil). Es wurde keine Markierung für EC-SOD an der Oberfläche der alveolaren Epithelzellen (offener Pfeil) beobachtet. (Balken =

50 µm).

[0026] Die Fig. 16A–Fig. 16C zeigen die elektronenmikroskopische Immunlokalisierung von EC-SOD in vaskulärem Bindegewebe. Die Gewebe wurden unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (40 µg/ml; anti-EC-SOD) markiert oder mittels des entsprechenden Antikörperansatzes, nachdem der anti-EC-SOD IgG unter Verwendung von gereinigter rekombinanter EC-SOD, angeheftet an CNBr-Sepharose (absorbierte EC-SOD), herausgezogen worden war. Der Antikörper wurde unter Verwendung von 10 nm Protein-A-Gold detektiert. A: vaskuläres Collagen, markiert mit anti-EC-SOD. B: Vaskuläres Elastin, markiert mit anti-EC-SOD. C: Vaskuläres Collagen, markiert mit an EC-SOD absorbierten Antiseren. Zu beachten ist die intensive Markierung von EC-SOD in Verbindung mit Typ I-Collagen und das Fehlen von Markierung in Zusammenhang mit Elastin (E). Des weiteren hebt die Absorption des anti-EC-SOD-Antikörpers die gesamte Markierung für EC-SOD in Zusammenhang mit Typ I-Collagen auf. (Balken = 200 nm).

[0027] Fig. 17 zeigt die elektronenmikroskopische Immunlokalisierung von EC-SOD um den vaskulären glatten Muskel. Die Gewebe wurden unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (40 µg/ml) markiert. Der Antikörper wurde unter Verwendung von 10 nm Protein-A-Gold detektiert. Es zeigt sich ein hohes Maß an Markierung in der Bindegewebsmatrix um die vaskuläre glatte Muskelzelle (S) in Zusammenhang mit Typ I-Collagen (kurzer Pfeil), sowie bei anderen, nicht identifizierten Matrix-Elementen (langer Pfeil). (Balken = 200 nm).

[0028] Die Fig. 18A–Fig. 18B zeigen die elektronenmikroskopische Immunlokalisation von EC-SOD an der Oberfläche von Lungenendothelzellen. Die Gewebe wurden unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (40 µg/ml) markiert. Der Antikörper wurde unter Verwendung von 10 nm Protein-A-Gold detektiert. A: Endotheliale Zelle aus einer kleinen muskulären Lungenarterie. B: Endotheliale Zelle aus einer Lungenkapillare. Es fand sich keine Markierung für EC-SOD an der Oberfläche der endothelialen Zellen (kurze Pfeile). EC-SOD ist im Plasma (P) zu beobachten und ist mit Proteinen der extrazellulären Matrix unterhalb des Endothels assoziiert (lange Pfeile). (Balken = 200 nm).

[0029] Fig. 19 zeigt die elektronenmikroskopische Immunlokalisierung von EC-SOD um bronchiale Epithelzellen. Die Gewebe wurden unter Verwendung des Antikörpers gegen rekombinante humane EC-SOD (40 µg/ml) markiert. Der Antikörper wurde unter Verwendung von 10 nm Protein-A-Gold detektiert. EC-SOD wurde im Verbindungsbereich zwischen den Epithelzellen gefunden (Pfeil), und es wurde auch in einem gewissen Maße im Inneren der Zellen beobachtet. (Balken = 200 nm).

[0030] Die Fig. 20A–Fig. 20D zeigen eine partielle Restriktionskarte, die Sequenzierstrategie, die genomische Struktur und die Proteinstruktur von humaner EC-SOD, Klon #7. Fig. 20A: partielle Restriktionskarte des humanen, genomischen EC-SOD-Klons #7, dargestellt in 5'→3'-Orientierung. Ein 1 kb-Größenmarker ist angezeigt. B: BamHI; H: HindIII; P: PstI; S: SalI; K: KpnI; E: EcoRI. In Fig. 20B ist die Subklonierung und Sequenzierstrategie dargestellt. Überlappende Restriktionsfragmente verschiedener Größe wurden für die nachfolgende DNA-Sequenzanalyse in den Plasmidvektor pGEM3Zf(+) subkloniert. Die gesamte DNA wurde für beide Stränge unter Verwendung von Sequenase (USB) und einer doppelsträngigen DNA-Matrize sequenziert, außer ~2kb des 3'-7K36-Fragments, bei dem nur eine Orientierung sequenziert wurde. In Fig. 20C ist die Exon/Intron-Struktur des humanen EC-SOD-Gens dargestellt. Die Position der codierenden Region für präEC-SOD in Exon 3 ist durch die gestrichelten Linien dargestellt. In Fig. 20D sind die vier strukturellen Domänen von humanem EC-SOD-Protein schematisch dargestellt. Das Signalpeptid ist durch einen Pfeil angezeigt. Darauf folgt die reife, glykosylierte (CHO), amino-terminale Peptid-Domäne. Eine dritte Region besitzt eine sehr hohe Aminosäure-Sequenzhomologie zu humaner CuZn-SOD. Die carboxy-terminale Domäne weist zahlreiche geladene basische Reste (+) auf, die entscheidend wichtig für die Bindung von Heparin-Glycosaminoglycan sind.

[0031] Die Fig. 21A–Fig. 21B zeigen Northern-Blots der EC-SOD für mehrere humane Gewebe. Fig. 21A: zwei µg an Poly A(+)-mRNA aus acht verschiedenen humanen Geweben wurden einer Elektrophorese auf einem denaturierenden Agarosegel unterzogen, auf eine geladene Nylonmembran übertragen und mit [^{32}P]-markierter antisense-cRNA für humane EC-SOD sondenmarkiert. Molekulare RNA-Größenmarker (Kilobasen) sind zur Rechten dargestellt. Die quantitative Übertragung wurde mittels Ethidiumbromid-Färbung überwacht. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen acht untersuchten Geweben eine singuläre 1,4 kb große mRNA vorhanden ist. Interessanter Weise zeigt der Skelettmuskel eine zweite, größere mRNA von ~4,2 kb, während das Gehirn eine schwache, etwa 2,2 kb große Bande zeigt. In Fig. 21B wurden Banden, die der EC-SOD-mRNA entsprachen, mittels Laser-Densitometrieanalyse quantifiziert, gegenüber der 1,4 kb-Bande des Gehirns normalisiert und in relativen Extinktionseinheiten ausgedrückt.

[0032] Die Fig. 22A–Fig. 22B zeigen die Analyse der Transkriptionsinitiationsstelle. Die Technik der schnellen 5'-Amplifikation der cDNA-Enden (5'-RACE) wurde verwendet, um die Stelle der Transkriptionsinitiation bei dem humanen EC-SOD-Gen zu identifizieren. In Fig. 22A zeigt ein schematisches Diagramm die Hybridisierungsstellen (annealing sites) für die verschiedenen Oligonukleotide. Die dunkle Linie stellt zum ersten Strang gehörende, revers transkribierte cDNA von humaner Herz-poly A(+)-mRNA dar, wobei die Primerreaktion mit EC7 (einem für das EC-SOD-Gen spezifischen Primer) erfolgte und unter Verwendung von terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) ein Poly-C-Schwanz angehängt wurde. HEC1, HEC2, EC4 und EC7 sind 5'-ständige, für das humane EC-SOD-Gen spezifische Primer. Der Anker-Primer wird in dem 5'-RACE-Kit (GIBCO BRL) zur Verfügung gestellt und hybridisiert an den Poly-C-Schwanz. In Fig. 22B wurde die PCR verwendet, um Segmente der DNA zu amplifizieren, wobei [Anker + EC4] oder (HEC1 + EC7] als Primer und entweder mit Poly-C-Schwanz versehene cDNA (+TdT, Spuren 1 & 4) oder cDNA ohne Poly-C-Schwanz (–TdT, Spuren 2 & 5) als Matrize eingesetzt wurden. Spur 3 beinhaltet PCR-amplifizierte DNA bei Verwendung von [HEC1 + EC7] als Primer und einer humanen EC-SOD-cDNA voller Länge als Matrize. Die resultierenden amplifizierten DNAs wurden auf einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf geladene Nylonmembranen überführt und mit [^{32}P]-markiertem HEC2, einem 5'-ständigen, genspezifischen „Nested" Primer für EC-SOD sondenmarkiert. DNA-Molekulargewichtsmarker liefen zwischen den Spuren 2 und 3. Die erwartete Größe der PCR-amplifizierten Region in den Spuren 3, 4 und 5 beträgt 217 bp. In Spur 1 ist nur eine einzige Bande zu erkennen, mit einer molekularen Größe von etwa 185 bis 200 bp.

[0033] Fig. 23 zeigt eine genomische Southern Blot-Analyse des humanen EC-SOD-Gens. Zehn Mikrogramm humaner genomischer DNA wurden vollständig mit allen jeweils angezeigten Restriktionsenzymen verdaut, auf einem 1%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf geladene Nylonmembranen überführt. Die Blots wurden mit einer [^{32}P]-markierten EC-SOD-cRNA partieller Länge sondenmarkiert, die den ersten etwa 1050 Nukleotiden entsprach, und dann autoradiographiert. Die spezifische Restriktionsendonuklease ist an der Oberseite der jeweiligen Spur angegeben. DNA-Molekulargewichtsmarker (in Kilobasen) sind auf der rechten Seite zu sehen.

[0034] Fig. 24 zeigt die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen EC-SOD-Gens. Die vollständige Nukleotidsequenz des humanen Gens ist angegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Signalpeptids und des reifen Proteins ist unter Verwendung des Einbuchstabencodes der Aminosäuren angegeben.

[0035] Fig. 25 zeigt eine Lineweaver-Burk-Auftragung, die die nicht-kompetitive Inhibition von Xanthinoxidase durch MnTBAP zeigt.

[0036] Fig. 26 zeigt den Schutz der Endothelzellen der Lungenarterie vor Xanthinoxidase-induzierter Verletzung durch MnTBAP.
Kontrolle □; MNTBAP ◪.

[0037] Fig. 27 zeigt den Schutz der Lungenepithelzellen vor durch Paraquat induzierter Verletzung durch SOD-Mimetika.

[0038] Fig. 28 zeigt den Schutz der Endothelzellen der Lungenarterie vor durch Paraquat induzierte Verletzung durch MnTBAP.

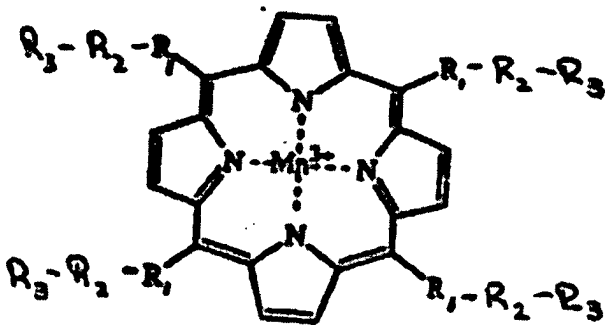
[0039] Fig. 29 zeigt den mangelnden Schutz der Endothelzellen der Lungenarterie vor durch Paraquat induzierte Verletzung durch ZnTBAP.

[0040] Fig. 30 zeigt die Schutzwirkung von MnTBAP gegenüber Paraquat-induzierter Verletzung der Lunge.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

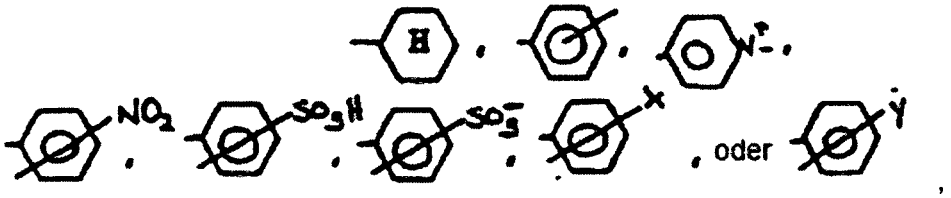
[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft den Schutz gegen die schädlichen Wirkungen von Superoxid-Radikalen und die Verhinderung und Behandlung von Krankheitszuständen, die oxidativen Stress beinhalten oder aus diesem resultieren. Die Erfindung betrifft außerdem das Modulieren biologischer Prozesse, an denen Superoxid-Radikale beteiligt sind.

[0042] Mimetika von SOD, die für die Verwendung bei den vorliegenden Verfahren geeignet sind, beinhalten Manganderivate von Methin-substituierten Porphinen oder pharmazeutisch akzeptable Salze hiervon. Bevorzugte Mimetika besitzen die Formel:

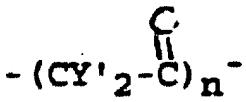


wobei R_1, R_2 und R_3 wie oben definiert sind.

[0043] Bei einer spezifischeren Ausführungsform ist
R_1 eine Bindung,

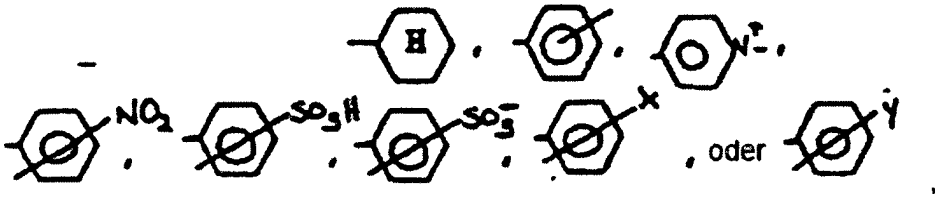


wobei X Cl oder Br ist und Y eine C_{1-4}-Alkylgruppe ist;
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2\text{-}CY'\text{=}CY')_n^-$, $-(CY'_2\text{-}CY'_2\text{-}CH\text{=}CH)_n^-$, $-(CY'\text{=}CY')_n^-$ oder

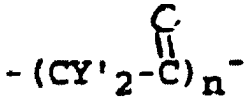


ist,
wobei Y' Wasserstoff oder eine C_{1-4}-Alkylgruppe ist und wobei n 1 bis 4 ist; und
R_3 -Y'', -OH, $-NH_2$, $-N^+(Y'')_3$, -COO-, $-COO^-$, $-SO_3$-, $-SO_3^-$, $-C\text{-}PO_3H$- oder $-C\text{-}PO_3H^-$ ist, wobei Y'' eine C_{1-4}-Alkylgruppe ist.

[0044] Bei einer weiteren spezifischen Ausführungsform ist
R_1 eine Bindung,

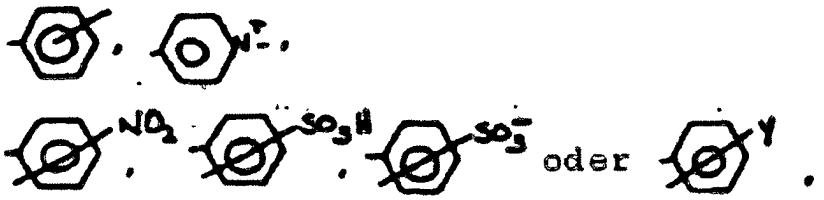


wobei X Cl oder Br ist und Y Methyl oder Ethyl ist, und
R_2 ist eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2\text{-}CY'\text{=}CY')_n^-$, $-(CY'_2\text{-}CY'_2\text{-}CH\text{=}CH)_n^-$, $-(CY'\text{=}CY')_n^-$ oder

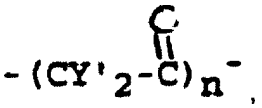


wobei Y' Wasserstoff oder Methyl oder Ethyl ist, und wobei n 1 oder 2 ist, und
R_3 ist Methyl, Ethyl, -OH, $-NH_2$, $-N^+(CH_3)_3$, $-N^+(CH_2CH_3)_3$, -COO-, $-COO^-$, $-SO_3$-, $-SO_3^-$, $-C\text{-}PO_3H$- oder $-C\text{-}PO_3H^-$.

[0045] Bei einer anderen spezifischen Ausführungsform ist
R_1 eine Bindung,

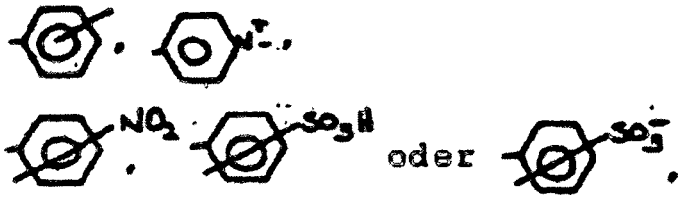


wobei Y Alkyl, bevorzugt C_{1-4}-Alkyl, bevorzugter Methyl oder Ethyl ist,
R_2 ist eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder



wobei Y' Wasserstoff oder Alkyl (bevorzugt C_{1-4}-Alkyl, bevorzugter Methyl oder Ethyl) ist, und wobei n 1 bis 4 (bevorzugt 1 oder 2) ist, und
R_3 ist C_{1-4}-Alkyl (bevorzugt Methyl oder Ethyl), -OH, -NH-, $-N^+(CH_3)_3$, $-N^+(CH_2CH_3)_3$, -COO-, $-COO^-$, $-SO_3$-, $-SO_3^-$, -C-PO_3H- oder -C-PO_3H^-.

[0046] Bei wiederum einer anderen spezifischen Ausführungsform ist
R_1 eine Bindung,



R_2 ist eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$ oder $-(CY'=CY')_n^-$,
wobei Y' Wasserstoff oder Alkyl (bevorzugt C_{1-4}-Alkyl, bevorzugter Methyl oder Ethyl) ist, und wobei n 1 bis 4 (bevorzugt 1 oder 2) ist, und
R_3 ist C_{1-4}-Alkyl (bevorzugt Methyl oder Ethyl), -OH, -NH-, $-N^+(CH_3)_3$, $-N^+(CH_2CH_3)_3$, -COO-, $-COO^-$, $-SO_3$-, $-SO_3^-$, -C-PO_3H- oder -C-PO_3H^-.

[0047] Zusätzlich zu den oben beschriebenen Substituenten können einer oder mehrere der Pyrrolringe des Porphyrin mit einer Elektronen-abziehenden Gruppe substituiert sein, z.B. mit einer NO_2-Gruppe, einem Halogen (z.B. Cl) oder mit einem Nitril.

[0048] Spezifische Mimetika, die für die Verwendung bei den vorliegenden Verfahren geeignet sind, beinhalten Mn(III)-tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP), Mn(III)-tetrakis-(4-trimethylaminophenyl)porphyrin (MnTMAP) und Mn(III)-tetrakis-(4-benzoesäure)porphyrin (MnTBAP).

[0049] Zielgerichtete Formen der Mimetika können hergestellt werden, indem die Mimetika direkt oder über einen Linker an eine im Bezug auf eine Zelloberfläche oder die extrazelluläre Matrix zielsteuernde Gruppierung gekoppelt werden.

[0050] Die zielgerichteten Mimetika können verwendet werden, um EC-SOD nachzuahmen. Da die Sequenz von humanem EC-SOD bekannt ist (Hjalmarsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6340 (1987)) kann das C-terminale Oligopeptid hergestellt und an den „mimetischen Kern" (z.B. ein Mn(III)-porphyrin) angeheftet werden, z.B. über ein freies Amin oder über eine Carboxylgruppe mittel einer durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) vermittelten Kopplungsreaktion (Yamada et al, Biochemistry 20: 4836 (1981); Davis und Preston, Anal. Biochem. 116: 402 (1981)) (beachte die R'-Gruppe in den im folgenden aufgeführten Strukturen). Diese einfache Kopplungsprozedur macht es möglich, eine breite Palette verschiedener Bindungsdomänen anzufügen, um die EC-SOD-Mimetika zielgerichtet zu machen. Die Bindungsaffinität eines Mimetikums für Heparin kann bestimmt werden, indem man das Mimetikum über eine Heparin-Sepharose CL-6B-Säule laufen lässt (Karlsson et al, Biochem. J. 256: 29 (1988)).

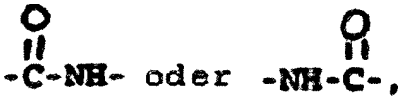
[0051] Kandidaten für zielsteuernde Gruppierungen, die geeignet sind, um an die SOD (z.B. EC-SOD)-Mimetika angeheftet zu werden und so GAG-Bindungseigenschaften zu verleihen, beinhalten die folgenden:

i) die A+-Helix von Protein C-Inhibitor (Boissinot et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 190: 250 (1993)):

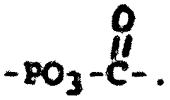
NH_2-His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu Asp Leu-COOH;
ii) das C-terminale Ende von humaner EC-SOD (Heparin-Binde-Domäne) (Karlsson et al., Biochem. J. 255: 223 (1988)): NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala-COOH;
iii) Varianten des C-terminalen Endes von humaner EC-SOD mit Heparin-Bindungsaffinität (Sandström et al., J. Biol. Chem. 267: 18205 (1992)):
a) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu-COOH;
b) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala-COOH;
c) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Glu Cys Lys Ala Ala-COOH;
d) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Ala Lys Ala Ala-COOH;
e) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Ala Ala Ala-COOH;
f) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Ala Cys Lys Ala Ala-COOH;
g) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Glu Cys Ala Ala Ala-COOH;
h) NH_2-Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Gly Arg Arg Ala Ser Glu Cys Ala Ala Ala-COOH;
iv) Jedwede Kombination von sich wiederholenden positiv geladenen Aminosäuren (z.B. poly-$(Arg)_n$, poly-$(Lys)_n$, poly-$(Arg)_n(Lys)_n$ oder poly-$(Arg\ Lys)_n$ oder poly-$(Lys\ Arg)_n$ oder poly-$(Lys\ Lys\ Arg\ Arg)_n$, wobei n vorzugsweise im Bereich von 1 bis 12 liegt, bevorzugter von 1 bis 8 und, am bevorzugtesten, von 1 bis 6, mit oder ohne ein C-terminales Glu oder Ala (Sandström et al, J. Biol. Chem. 267: 18205 (1992)); und
v) Polyethylenimin, z.B. $(NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH)nH$, wobei n 1 bis 6 ist.

[0052] Zusätzlich zu dem vorstehend genannten, beinhalten zielsteuernde Gruppierungen auch Heparin-Bindeproteine allgemein, sowie Zucker, einschließlich Mannose und Oligosaccharide.

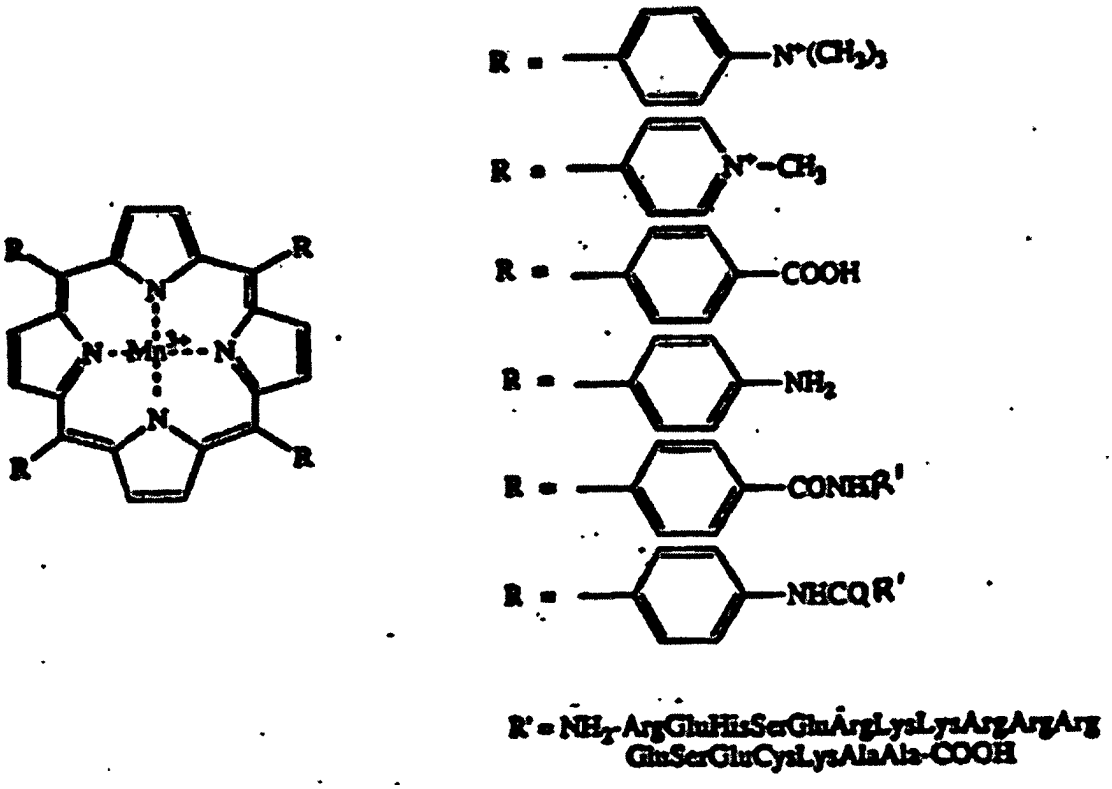
[0053] Geeignete Linker beinhalten:



$-SO_2NH-$, $-PO_3NH-$ oder



[0054] Spezifische Beispiele für geeignete SOD (z.B. EC-SOD)-Mimetika sind unten angegeben:



5,10,15,20-Tetrakis [R-Gruppe] Mangan (III)-Porphyrin

[0055] Mimetika, die für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, können ausgewählt werden, indem auf SOD-Aktivität und Stabilität hin getestet wird. Die SOD-Aktivität kann in Gegenwart und Abwesenheit von EDTA unter Verwendung des Verfahrens von McCord und Fridovich (J. Biol. Chem. 244 (1969)) gemessen werden. Die Effektivität eines Mimetikums kann gemessen werden, indem man die Auswirkung des Mimetikums auf das Wachstum eines SOD null-Stammes von E. coli gegenüber einem Wildtyp-Stamm misst. Konkret können wildtypisches E. coli (AB1157) und SOD null E. coli (J1132) in M9-Medium, enthaltend 0,2% Casaminosäuren und 0,2% Glukose, bei pH 7,0 und 37°C herangezogen werden; das Wachstum kann über die Trübung spektrophotometrisch bei 700 nm verfolgt werden. Aktive Mimetika können in Säugerzellkulturen auf ihre Toxizität hin getestet werden, indem man die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) misst. Konkret können Ratten L2-Zellen (eine Typ II-artige Lungenzelle; (Kaighn und Douglas, J. Cell Biol. 59: 160a (1973)) in Ham's F-12-Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, bei pH 7,4 und 37°C herangezogen werden. Die Zellen können mit jeweils gleicher Dichte in 24 Well-Kulturschalen inokuliert und bis auf etwa 90% Konfluenz vermehrt werden; die SOD-Mimetika können in logarithmischen Dosen (z.B. mikromolare Dosen in minimal-essentiellem Medium (MEM)) zu den Zellen hinzu gegeben werden, gefolgt von 24 h Inkubation. Die Bestimmung der Toxizität kann über die Morphologie und durch Messen der Freisetzung des zytosolischen Verletzungsmarkers LDH (z.B. auf einem thermokinetischen Platten-Lesegerät) erfolgen, wie es von Vassault beschrieben worden ist (in: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer (Herausgeber), S. 118–26 (1983); die Oxidation von NADH wird bei 340 nm gemessen). Die Wirksamkeit aktiver Mimetika kann ermittelt werden, indem man deren Befähigung bestimmt, Säugerzellen vor durch Methylviologen (Paraquat) induzierte Toxizität zu schützen. Konkret dargestellt, können Ratten L2-Zellen, die gemäß obiger Beschreibung herangezüchtet und in 24 Well-Platten inokuliert wurden, mit verschiedenen Konzentrationen des SOD-Mimetikums präinkubiert werden, gefolgt von der Inkubation mit einer Konzentration an Methylviologen, für die zuvor gezeigt wurde, dass sie eine LC_{75} bei Kontroll-L2-Zellen verursacht. Die Wirksamkeit des Mimetikums kann mit einer Abnahme der durch Methylviologen induzierten LDH-Freisetzung korreliert werden (St. Clair et al., FEBS Lett. 293: 199 (1991)). Die Wirksamkeit von SOD-Mimetika kann in vivo mit Maus- und/oder Ratten-Modellen getestet werden, wobei sowohl die Applikation als Aerosol als auch parenterale Injektion verwendet werden können. Beispielsweise können männliche Balb/c-Mäuse zufällig in 4 Gruppen mit jeweils 8 Mäusen eingeteilt werden, von denen jede ein statistisches 2 × 2-Standard-Zufallsmodell bildet. Den Tieren kann entweder Paraquat (40 mg/kg, i.p.) oder Saline verabreicht werden, wobei die Behandlung entweder mit einem SOD-Mimetikum oder mit einer Trägerkontrolle erfolgt. Die Lungenverletzung kann 48 Stunden nach der Paraquat-Behandlung bestimmt werden, indem die Schädigungsparameter (LDH, Protein und % PMN) in der bronchoalveolaren Spülflüssigkeit (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) analysiert werden (siehe vorherige Beschreibung

von Hampson et al., Tox. Appl. Pharm. 98: 206 (1989); Day et al., J. Pharm. Methods 24: 1 (1990)). Die Lungen von zwei Mäusen jeder Gruppe können durch Einflößen von 4% Paraformaldehyd fixiert und für die Nistopathologie auf lichtmikroskopischem Niveau weiterverarbeitet werden.

[0056] Die Synthese von Mimetika, die für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, kann unter Verwendung von Protokollen aus dem Stand der Technik erfolgen. Im Falle der Mn(III)-Porphyrin-Mimetika können Porphyrinringe mit verschiedenen Seitengruppen an dem Methinbrücken-Kohlenstoff kommerziell erworben werden, und das Mn(III)-Metallion kann in den Porphyrinring eingesetzt werden, wozu Verfahren einschließlich der folgenden verwendet werden können: (1) Mischen von Mn(II)-Acetat mit Porphyrin in Gegenwart von Sauerstoff, wobei die selektive Stabilisierung von Mn(III) durch das Porphyrin unter diesen Bedingungen die Autooxidation von Mn(II) bewirkt; (2) Herstellen von Mn(III)(OH)3 durch eine Modifikation des Winkler-Verfahrens (Sastry et al., Anal. Chem. 41: 857 (1969)), gefolgt von der Reaktion mit dem Porphyrin; (3) Rühren von MnO_2 mit dem Porphyrin in Gegenwart von NH_2OH, was dazu dient, Mn(IV) zu Mn(III) zu reduzieren, das dann von dem Porphyrin „eingefangen" wird; oder (4) ein modifiziertes Verfahren, nach Pasternack et al (Biochemistry 22: 2406 (1983)), das eine Rückflussbehandlung von im Überschuss vorhandenen $MnCl_3$ mit dem Porphyrin vorsieht. Die Mn(III)-Porphyrin-Komplexe können mit Natriumperchlorat aus der Lösung präzipitiert werden, wonach sie gewaschen und das verbliebene Perchlorat über ein starkes Anionenaustauscherharz entfernt wird. Die Bildung des Mn(III)-Porphyrins kann spektrophotometrisch verfolgt werden, indem man eine charakteristische Soret-Bande bei 468 nm beobachtet. Das Anfügen einer Bindungsdomäne an den „mimetischen Kern" kann gemäß obiger Beschreibung durchgeführt werden.

[0057] Die vorliegende Erfindung ergibt sich wenigstens teilweise aus der Beobachtung, dass EC-SOD die Funktion von NO· in spezifischer Weise reguliert. Zusätzlich basiert die Erfindung auf der Erkenntnis, dass EC-SOD durch epitheliale Zellen synthetisiert wird und sich primär im Interstitium, an Matrixelementen und Collagen und in der Umgebung glatter Muskelzellen (insbesondere der Luftwege und Gefäße der Lunge) befindet. NO· stellt ein interzelluläres Signal dar, sodass NO· als solches die extrazelluläre Matrix durchqueren muss, um seine Wirkungen auszuüben. NO· ist jedoch hochgradig empfindlich gegenüber der Inaktivierung, die durch das in extrazellulären Räumen befindliche O_2^- vermittelt wird. EC-SOD ist somit ein Enzym, das ideal geeignet ist, um die Bioverfügbarkeit von NO· durch das Verhindern seiner Degradation durch O_2^- zu steigern.

[0058] Wie oben angegeben, betrifft die Erfindung auch Mimetika der EC-SOD, die zielgerichtet an strategische Orte befördert werden können, und die Verwendung solcher Mimetika bei der Manipulation der extrazellulären Spiegel an NO·. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Manipulation von NO· als dem einzigen Wirkungsmechanismus der Mimetika beschränkt. Vielmehr bezieht sich die Erfindung auf das Abfangen von Sauerstoffradikalen im Allgemeinen.

[0059] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren spezifischen Aspekt die Inhibition der Produktion von Superoxid-Radikalen. In diesem Aspekt werden die SOD-Mimetika dafür verwendet, Oxidasen, wie etwa Xanthinoxidase, zu inhibieren die für die Produktion von Superoxidradikalen verantwortlich sind (siehe Beispiel VII). Die Befähigung der Mimetika, Säugerzellen vor durch Xanthin/Xanthinoxidase induzierter Verletzung zu schützen, kann z.B. dadurch getestet werden, dass man Ratten L2-Zellen in 24-Well-Platten heranzieht. Die Zellen können mit verschiedenen Konzentrationen eines SOD-Mimetikums präinkubiert werden, wonach z.B. Xanthinoxidase (XO) zusammen mit Xanthin (X) den Kulturen zugegeben werden kann. Die geeignete Menge an XO/X, die bei der Studie verwendet wird, kann vorab für jede Zelllinie bestimmt werden, indem man eine Dosis-Antwortkurve der Verletzung erstellt. X/XO kann in einer Menge verwendet werden, die eine ungefähre LC_{75} in der Kultur hervorruft. Die Wirksamkeit des Mimetikums kann mit einer Abnahme der XO/X-induzierten LDH-Freisetzung korreliert werden. Die Befähigung der Mimetika, die Produktion solcher Radikale zu hemmen, ermöglicht die Verwendung der Mimetika als Therapeutika für die Behandlung von Gicht und Reperfusionsverletzungen.

[0060] Die Mimetika können verwendet werden, um Wasserstoffperoxid ebenso wie Superoxidradikale abzufangen. Als Fänger von Wasserstoffperoxid fungieren die Mimetika als Mimetika entweder von Katalase oder Peroxidase. Geeignete mimetische Fänger können ausgewählt werden, indem man die Extinktion bei 240 nm in Gegenwart von Wasserstoffperoxid verfolgt (siehe Beers und Sizer, J. Biol. Chem. 195: 133 (1952)). Therapien, die auf dieser Aktivität basieren, entsprechen denjenigen, die unten dargestellt sind.

[0061] Die Mimetika können als katalytische Fänger von Superoxidradikalen verwendet werden, um vor ischämischen Repertusionsverletzungen zu schützen, die in Zusammenhang stehen mit Myocardinfarkt, Schlaganfall, akutem Kopftrauma, Organreperfusion nach Transplantation, Darmischämie, pulmonalem Infarkt, chirurgischem Abschluss des Blutflusses und Weichgewebeverletzung. Die Mimetika können ferner ver-

wendet werden, um vor Skelettmuskel-Reperfusionsverletzungen zu schützen. Die Mimetika können außerdem dazu verwendet werden, um vor einer Schädigung des Auges (und der Haut) aufgrund von Sonnenlicht zu schützen, ebenso wie vor Glaukom und der Makuladegeneration des Auges. Knochenerkrankungen sind der Behandlung mit den Mimetika ebenfalls zugänglich. Weiterhin kann bei Bindegewebsstörungen, die mit Störungen der Collagensynthese oder des Collagenabbaus verbunden sind, erwartet werden, dass sie auf eine Behandlung mit den vorliegenden Mimetika ansprechen.

[0062] Zusätzlich zu dem oben genannten, können die Mimetika als katalytische Fänger von Superoxidradikalen verwendet werden, um die sehr begrenzte Lebensfähigkeit zu transplantierender Herzen, Nieren, Haut und anderer Organe und Gewebe bei der Lagerung zu erhöhen.

[0063] Die Menge an Mimetikum, die bei einer spezifischen Behandlung oder im Zusammenhang mit einer spezifischen Substanz zu verwenden ist, kann von einem Fachmann bestimmt werden. Die Verfügbarkeit der Mimetika macht es auch möglich, O_2^--vermittelte Prozesse zu untersuchen.

[0064] Diagnostische Protokolle werden durch die Verfügbarkeit der EC-SOD-Gensequenz (siehe Beispiel V und **Fig. 24**) ermöglicht. Aufgrund der Natur und Anzahl der von NO· vermittelten physiologischen Funktionen ist das Auftreten eines Defekts im EC-SOD-Gen wahrscheinlicher als ein Defekt in der Stickstoffmonoxidsynthase. Die Detektion eines EC-SOD-Gendefekts würde einen Bedarf an Maßnahmen signalisieren, die zu unternehmen wären, um die Spiegel von funktionaler EC-SOD oder verwandter Superoxid-neutralisierender Verbindungen an strategischen Positionen anzuheben, um Ungleichgewichte von NO· zu korrigieren und folglich Störungen, die oxidativen Stress beinhalten.

[0065] Um eine Modulation der Wirksamkeit von extrazellulärem NO· zu bewirken, z.B. bei der Entspannung glatter Muskeln, werden Moleküle (Mittel) mit EC-SOD-Aktivität unter solchen Bedingungen verabreicht, dass die Spiegel an extrazellulärem O_2^- verändert werden. Für diese Anwendung geeignete Moleküle beinhalten Formen von SOD, die an Heparinsulfat oder andere Glykosaminoglycane (GAG) binden, z.B. befähigt durch die Tatsache, dass sie positiv geladene Aminosäuren nahe ihrem carboxy-terminalen Ende enthalten. Die allgemeinen Anforderungen an die Mimetika sind, dass sie (a) in Gegenwart der vielen Chelat-bildenden Mittel, die in lebenden Systemen vorliegen, stabil genug sind, um das komplexierte Metall (d.h. Mn) zu halten, (b) aktiv genug sind, sodass angemessene Dosen dazu dienen können, die Gesamtaktivität von SOD in den extrazellulären Räumen signifikant zu steigern, (c) in der Lage sind, sich an die Oberflächen von Zellen oder Elementen der extrazellulären Matrix (z.B. Collagen) anzuheften, wenn ein Schutz gegen extrazelluläre Quellen von O_2^- benötigt wird, und (d) von geringer Toxizität sind. Beispiele geeigneter Mimetika beinhalten stickstoffhaltige makrozyklische Liganden, die als Katalysatoren für die Dismutation (Disproportionierung) von Superoxid wirksam sind, einschließlich Mn(III)-Komplexen von Porphyrinen mit räumlich ausladenden kationischen Substituenten an den Methinbrücken-Kohlenstoffen, so wie etwa den oben beschriebenen (z.B. MnTMAP und MnTMPyP). Solche Komplexe sind sehr aktiv und stabil genug, um ihre vollständige Aktivität in Gegenwart von im Überschuss vorliegendem EDTA oder in Gegenwart von Gewebeextrakten aufrecht zu erhalten.

[0066] Die oben beschriebenen Mimetika können in pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden, die für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Solche Zusammensetzungen beinhalten den Wirkstoff zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel. Die Zusammensetzung kann in Formen von Dosierungseinheiten, wie etwa Tabletten, Kapseln oder Zäpfchen, vorliegen. Die Zusammensetzung kann auch in Form einer sterilen Lösung vorliegen, die für die Injektion oder Inhalation geeignet ist. Die Zusammensetzungen können auch in einer Form vorliegen, die für die Verwendung am Auge geeignet ist. Die Erfindung beinhaltet auch die Verwendung von Zusammensetzungen, die für die topische Applikation formuliert sind, wie etwa Zusammensetzungen in Form z.B. einer Lotion, einer Creme, eines Gels oder einer Salbe. Die in die Zusammensetzung einzubeziehende Konzentration des Wirkstoffs kann auf Basis der Natur des Wirkstoffs, des Dosierungsschemas und des gewünschten Resultats ausgewählt werden.

[0067] Die Dosierung der zu applizierenden Zusammensetzung kann ohne unangemessenen Versuchsaufwand ermittelt werden und wird von verschiedenen Faktoren abhängen, einschließlich der Natur des Wirkstoffs, der Verabreichungsroute, dem Patienten und dem Ergebnis, das erzielt werden soll.

[0068] Geeignete Dosen an Mimetika werden z.B. mit dem Mimetikum und mit dem gewünschten Resultat variieren. Die Ergebnisse von Faulkner et al (J. Biol. Chem. 269: 23471 (1994)) zeigen an, dass die in vivo-Oxidoreduktaseaktivität der Mimetika so ist, dass eine pharmazeutisch wirksame Dosis niedrig genug sein wird, um Probleme der Toxizität zu vermeiden. Dosierungen, die verwendet werden können, beinhalten solche im

Bereich von 1 bis 50 mg/kg.

[0069] Weitere Beispiele für Krankheiten oder Störungen, die für eine Behandlung unter Verwendung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, beinhalten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (einschließlich AIDS-Demenz, Schlaganfall, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Parkinson-Krankheit und Huntington-Krankheit), sowie Erkrankungen der Muskulatur (einschließlich Zwerchfellerkrankungen (z.B. Atemermüdung bei Emphysem, Bronchitis und Cystische Fibrose), Herzermüdung bei kongestiver Herzinsuffizienz, mit Myopathien in Zusammenhang stehende Muskelschwächesyndrome, ALS und Multiple Sklerose). Viele neurologische Erkrankungen (einschließlich Schlaganfall, Huntington-Krankheit, Parkinson-Krankheit, ALS, Alzheimer-Demenz und AIDS-Demenz) stehen in Verbindung mit einer Überstimulierung des Hauptsubtyps des Glutamatrezeptors, des NMDA(N-Methyl-D-aspartat)-Subtyps. Bei Stimulierung des NMDA-Rezeptors tragen exzessive neuronale Calciumkonzentrationen zu einer Reihe von Membranereignissen und zytoplasmatischen Ereignissen bei, die zur Produktion von freien Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO·) führen. Es ist gezeigt worden, dass die Wechselwirkungen zwischen freien Sauerstoffradikalen und NO· zu dem neuronalen Zelltod beitragen. Es sind gut etablierte neuronal-corticale Kulturmodelle der NMDA-Toxizität entwickelt und als Grundlage der Arzneimittelentwicklung verwendet worden. In diesen selben Systemen inhibieren die SOD-Mimetika der Erfindung die NMDA-induzierte Verletzung.

[0070] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Behandlung von Arthritis, systemischem Bluthochdruck, Arteriosklerose, Ödem, septischem Schock, pulmonalem Hochdruck, einschließlich primärem pulmonalem Hochdruck, Impotenz, Infertilität, Endometriose, vorzeitiger Gebänrmutterkontraktion, Gedächtnisstörungen, mikrobiellen Infektionen und Gicht.

[0071] Die Therapieschemata, einschließlich der Art der Verabreichung, die für die Durchführung der Behandlung der oben beschriebenen Zustände geeignet ist, können von einem Fachmann problemlos bestimmt werden.

[0072] Entzündungen, insbesondere Entzündungen der Lunge, sind der Behandlung unter Verwendung der vorliegenden Erfindung zugänglich (zu beachten sind hier insbesondere die entzündlich begründeten Störungen im Fall von Asthma, ARDS einschließender Sauerstofftoxizität, Lungenentzündung (insbesondere mit AIDS in Zusammenhang stehende Lungenentzündung), Cystischer Fibrose, chronischer Sinusitis und Autoimmunerkrankungen (wie etwa rheumatoide Arthritis)). EC-SOD befindet sich in den Interstitialräumen, die die glatten Muskelzellen der Luftwege und der Gefäße umgeben. EC-SOD und O_2^- vermitteln das antientzündliche/proinflammatorische Gleichgewicht im alveolaren Septum. Das von den Zellen des alveolaren Septums freigesetzte NO· wirkt unterdrückend auf Entzündungen, solange es nicht mit O_2^- reagiert, um $ONOO^-$ zu bilden. Durch das Abfangen von O_2^- verschiebt EC-SOD das Gleichgewicht im alveolaren Septum von der Entzündung weg. Signifikante Mengen an $ONOO^-$ werden sich nur bilden, wenn EC-SOD defizient ist oder wenn es eine massiv erhöhte Freisetzung von O_2^- gibt. EC-SOD-Mimetika, wie die hier beschriebenen, können verwendet werden, um vor der durch Hypoxie erzeugten Zerstörung zu schützen. Geeignete Therapieschemata können von einem entsprechenden Fachmann problemlos erstellt werden.

[0073] Wie oben angegeben, ist zu erwarten, dass Defekte im EC-SOD-Gen, die sich im Protein selbst manifestieren, de facto eher die Ursache von mit der NO·-Funktion in Zusammenhang stehenden Krankheitsproblemen sein können als Defekte der Stickstoffmonoxidsynthase. Folglich werden diagnostische Protokolle, die für die Verwendung zur Identifizierung von EC-SOD-Gendefekten geeignet sind, hier offenbart. Dieser Aspekt basiert auf der Verfügbarkeit der Gensequenz von EC-SOD. **Fig. 24** zeigt eine Gensequenz sowie Abschnitte nicht-codierender Regionen dieser Sequenz mit wenigstens 15 Basen, bevorzugt mit wenigstens 50 Basen, bevorzugter mit wenigstens 100 Basen und, am bevorzugtesten, mit wenigstens 500 Basen. Solche Abschnitte und die komplementären Gegenstücke dazu können als Sonden oder Primer in Protokollen verwendet werden, einschließlich derjenigen in Beispiel VI.

[0074] Das Durchtesten von Individuen auf Defekte im EC-SOD-Gen kann unter Verwendung des Ansatzes erfolgen, der benutzt wird, um Mutationen im β-adrenergen Rezeptorgen zu identifizieren (Reihaus et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 8: 334 (1993)). Dieser Ansatz ist ähnlich demjenigen, der von Rosen et al verwendet wird (Nature 262: 59 (1993)) (siehe Beispiel VI).

[0075] Die folgenden sind vorhergesagte Stellen für wichtige Genmutationen:
Positionen 1–558: Dies stellt eine 5'-ständige flankierende Region dar, die transkriptionsregulierende Elemente enthält. Es ist zu erwarten, dass Mutationen hierin zu defizienten Spiegeln an EC-SOD oder einer defektiven Verstärkung oder Verminderung der EC-SOD-Spiegel unter Bedingungen führen werden, die einer Anpassung

der EC-SOD-Konzentration bedürften. Die folgenden Regionen sind als putative regulatorische Regionen identifiziert worden. Es kann erwartet werden, dass Mutationen in diesen Regionen in defizienten Spiegeln von EC-SOD resultieren:

89–95	Metall-regulatorisches Response-Element
121–126	cyclisches AMP-Response-Element
370–375	Glucocorticoid-Response-Element
238–244	Response-Element des Skelettmuskel-transaktivierenden Faktors
251–256	Cis-Response-Element bei der Induktion des Proto-Onkogens c-fos
162–168	TPA-Response-Element
171–179	SV40 Enhancer-Region

Positionen 560–570: Es ist zu erwarten, dass hier vorliegende Mutationen zu einer Unfähigkeit, Intron 1 herauszuspleißen, führen werden. Dies würde aufgrund der Initiation der Translation an multiplen kryptischen ATG-Stellen in Intron 1, die sich stromaufwärts des ATG-Startcodons von EC-SOD befinden, in einer fehlenden Produktion von EC-SOD (oder einer stark verminderten Produktion) resultieren. Beispielsweise wären die Basenpaare 653, 656, 720, 743, 748 etc. potentielle Initiatoren der Translation.
Positionen 564–1135: Intron 1 enthält eine DNA-Sequenz, die nur bei EC-SOD vorkommt. Zusätzlich gibt es potentielle transkriptionsregulatorische Regionen innerhalb dieses DNA-Abschnitts, die unten aufgelistet sind. Mutationen in Intron 1 würden zu defizienten Spiegeln an EC-SOD oder einer defektiven Verstärkung oder Reduzierung der EC-SOD-Spiegel unter Bedingungen führen, die eine Einstellung der EC-SOD-Konzentration erfordern würden:

1085–1095	Xenobiotika-Response-Region
650–661	Antioxidans-Response-Element

Positionen 71–95: Es ist zu erwarten, dass hier vorliegende Mutationen zu einer Unfähigkeit, Intron 1 herauszuspleißen, führen werden. Dies würde aufgrund der Initiation der Translation an multiplen kryptischen ATG-Stellen in Intron 1, die sich stromaufwärts des ATG-Startcodons von EC-SOD befinden, in einer fehlenden Produktion von EC-SOD (oder einer stark verminderten Produktion) resultieren. Beispielsweise wären die Basenpaare 653, 656, 720, 743, 748 etc. potentielle Initiatoren der Translation.
Positionen 1211–1230: Es ist zu erwarten, dass hier vorliegende Mutationen zu einer Unfähigkeit, Intron 2 herauszuspleißen, führen werden. Dies würde aufgrund der Initiation der Translation an multiplen kryptischen ATG-Stellen in Intron 2, die sich stromaufwärts des ATG-Startcodons von EC-SOD befinden, in einer fehlenden Produktion von EC-SOD (oder einer stark verminderten Produktion) resultieren. Beispiele für stromaufwärts gelegene ATG-Translationsstartstellen sind bei 1339 und 1518 zu finden.
Positionen 5055–5080: Hier vorliegende Mutationen würden zu einer Unfähigkeit, Intron 2 herauszuspleißen, führen. Dies würde aufgrund der Initiation der Translation an multiplen kryptischen ATG-Stellen in Intron 2, die sich stromaufwärts des ATG-Startcodons von EC-SOD befinden, in einer fehlenden Produktion von EC-SOD (oder einer stark verminderten Produktion) resultieren. Beispiele für stromaufwärts gelegene ATG-Translationsstartstellen sind bei 1339 und 1518 zu finden.
Positionen 5085–5138: Hier vorliegende Mutationen würden (1) in die Effizienz der Translation von EC-SOD eingreifen, was in defizienten Spiegeln des Enzyms resultiert, (2) in die Zielsteuerung von EC-SOD an das endoplasmatische Retikulum eingreifen, die für die Sekretion von EC-SOD erforderlich ist, (3) in die co-translationale Signalpeptidprozessierung (d.h. die Entfernung des Signalpeptids) eingreifen, was zu defizienten Spiegeln führen kann, da die proteolytische Abspaltung des Signalpeptids von dem reifen Protein verhindert wird, was wiederum dazu führen wird, dass das Protein im endoplasmatischen Retikulum festgehalten wird, (4) in die posttranslationale Prozessierung (insbesondere die Glykosylierung) eingreifen, was aufgrund der Synthese von schlecht löslichem Protein in defektiven Spiegeln resultieren kann.
Positionen 5139–5150: Hier vorliegende Mutationen können sich auf die Signalpeptidase-Spaltstelle auswirken, was in einer mutanten EC-SOD resultieren würde, die einen veränderten Amino-Terminus enthält, was zu einer defektiven Funktion von EC-SOD bei defizienten Spiegeln führen wird.
Positionen 5403–5405: Es ist zu erwarten, dass hier vorliegende Mutationen zu einem Verlust der Glykosylierung führen, was zu defektiven Spiegeln aufgrund der Synthese von schwach löslichem Protein führen kann.
Positionen 5424–5720: Es kann erwartet werden, dass hier vorliegende Mutationen in einer defektiven EC-SOD-Aktivität resultieren. Diese Region ist kritisch für die Bindung an das Substrat und die Katalyse der Dismutation des Superoxidanion-Radikals. Zusätzlich würde sich diese Region auch auf alle anderen Aktivitäten dieses Enzyms auswirken, einschließlich der Reduktion anderer Spezies, wie etwa Stickstoffmonoxid, etc.

Positionen 5721–5804: Mutationen in dieser Region würden Defekte bei der Bindung von EC-SOD an Zielgewebe, wie etwa Typ I Collagen in der extrazellulären Matrix und im Bereich glatter Muskelzellen, sowohl in der Umgebung von Gefäßen als auch von Bronchien, bewirken. Solche Mutationen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit Krankheiten auslösen.
Positionen 6385–6395: Es kann erwartet werden, dass hier vorliegende Mutationen in einer defektiven Polyadenylierung resultieren, die aufgrund einer verminderten Halbwertszeit der EC-SOD-mRNA-Spezies zu defizienten Spiegeln an EC-SOD führen kann.

[0076] Bestimmte Details der vorliegenden Erfindung werden in den nun folgenden, nichteinschränkenden Beispielen in größerem Detail beschrieben.

Beispiel I

Erzeugung und Charakterisierung transgener Mäuse

Protokolle:

i) Konstruktion von transgenen Mäusen

[0077] Konstruktion des humanen EC-SOD-Expressionsvektors: Der EC-SOD-Expressionsvektor (Fig. 1) wurde wie folgt konstruiert: Das vollständige humane EC-SOD cDNA-Fragment (Hjalmarrson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6340 (1987); Hendrickson et al., Genomics 8: 736 (1990)) mit flankierenden EcoRI-Restriktionsstellen wurde mit Mungobohnen-Nuklease umgesetzt, um glatte Enden zu erzeugen, mit SalI-Linkern ligiert, mit SalI verdaut und dann in die SalI-Stelle des humanen β-Aktin-Expressionsvektors pHβApr-1 inseriert. Das EcoRI-HindIII-Fragment des resultierenden Plasmids, enthaltend den humanen β-Actinpromotor (zur Verfügung gestellt von Dr. Larry Kedes, University of Southern California, Los Angeles, Kalifornien), Intron, sowie EC-SOD-cDNA, wurde isoliert. Zusätzlich wurde die HpaI-Stelle von SV40 an Position 2666 in dem Plasmid pMSG (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, New Jersey) durch Linker-Ligation in eine HindIII-Stelle umgewandelt, und das HindIII-PstI-Fragment, das die Polyadenylierungsstelle der frühen SV40-Region enthält, wurde isoliert. Diese zwei DNA-Fragmente wurden dann an einen mit EcoRI plus PstI verdauten pKS-Vektor (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) ligiert. Das EcoRI-XbaI-Fragment, das das gesamte Expressionskonstrukt frei von Plasmidsequenzen enthält, wurde isoliert und dazu verwendet, um transgene Mäuse zu etablieren. Alle der rekombinanten DNA-Prozeduren wurden gemäß etablierter Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3, Cold Spring Harbor; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) durchgeführt.

[0078] Entwicklung transgener Mäuse: Gereinigte DNA mit 2,5 µg/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, wurde in die Vorkeme (Pronuklei) befruchteter Eier injiziert, die aus Mäusen des Typs (C57BL/6 × C3H)F1 × (C57BL/6 × C3H)F1 isoliert worden waren. ((C57BL/6 × C3H)F1-Mäuse wurden von Charles River bezogen). Mauseier, die die Mikroinjektion überlebten, wurden dann in die Eileiter pseudoschwangerer Ammenmütter (CD1) eingesetzt (CD1-Mäuse wurden von Charles River bezogen), wobei man sich an die Prozeduren hielt, die von Hogan et al. (Hogan et al, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor; Cold Spring Harbor Laboratory 1986, 32) beschrieben worden waren. Mäuse, die das Transgen trugen, wurden mittels Southern Blot-Analyse von Schwanz-DNA, markiert mit der vollständigen humanen EC-SOD-cDNA, identifiziert. Es wurden transgene Gründertiere bei Durchtesten des ersten Wurfes ermittelt. Diese Mäuse wurden mit (C57BL/6 × C3H)F1 gekreuzt, um Nachkommen für weitere Studien zu erzeugen. (In allen folgenden Experimenten mit den transgenen EC-SOD-Mäusen beziehen sich die nicht-transgenen Mäuse auf Geschwistertiere der transgenen Mäuse, die das Transgen für die humane EC-SOD nicht enthalten. Bei den Versuchen, bei denen keine für EC-SOD transgenen Mäuse verwendet wurden, wurden wildtypische (C57BL/6 × C3H)F1-Tiere eingesetzt.)

[0079] Herstellung homozygoter für EC-SOD transgenen Mäuse: Homozygote transgene Mäuse wurden durch eine F1-Kreuzung heterozygoter transgener Mäuse produziert. Schwanz-DNA von F2-Mäusen wurde isoliert und mit RNase behandelt. Es wurden 10 µg an DNA von jeder Maus mit PstI geschnitten und dann über ein 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde dann eine Southern Blot-Analyse der Schwanz-DNA unter Sondenmarkierung mit der vollständigen humanen EC-SOD-cDNA durchgeführt. Die humane EC-SOD-cDNA zeigte keine Kreuzreaktion mit dem Maus-EC-SOD-Gen. Die Bandenintensität wurde visuell verglichen, um zu bestimmen, welche Mäuse homozygot, heterozygot oder negativ für das humane EC-SOD-Transgen waren.

ii) Charakterisierung der transgenen Mäuse

[0080] Northern Analyse: Die transgenen Mäuse und ihre nicht-transgenen Geschwistertiere wurden mit einer Überdosis an Pentobarbital getötet. Die Gewebe wurden schnell entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde dann gemäß Beschreibung (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) Gesamt-RNA mittels des CsCl-Verfahrens isoliert. Zwanzig µg an Gesamt-RNA aus den Geweben der transgenen Mäuse und der nicht-transgenen Geschwistertiere und eine RNA-Leiter wurden dann mit Glyoxal denaturiert, elektrophoretisch auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und gemäß Beschreibung (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) auf Nitrozellulose geblottet. Die Blots wurden dann mit vollständiger humaner EC-SOD-cDNA sondenmarkiert.

Auftrennung von SOD Isoenzymen mittels Concanavalin A-Sepharose-Chromatographie:

[0081] Gewebe, die aus 3 Mäusen entnommen worden waren, wurden gewogen, dann vereint und in 10 Volumina an eiskaltem 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 mit 0,3 M KBr, 3 mM Diethylentriaminpentaessigsäure und 0,5 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid homogenisiert. Die Abtrennung der EC-SOD von der CuZn-SOD und der Mn-SOD wurde durchgeführt, indem man die Gewebehomogenate gemäß Beschreibung (Marklund et al., Clin. Chim. Acta 126: 4 (1982)) über eine Concanavalin A-Sepharosesäule leitete.

[0082] SOD-Aktivität. Die EC-SOD-Aktivität und die gesamte, nach der Extraktion von EC-SOD verbleibende SOD-Aktivität (CuZn-SOD und Mn-SOD) wurde anhand der Inhibition der Cytochrom C-Reduktion bei pH 10 gemessen, wobei gemäß vorheriger Beschreibung (Crapo et al., Methods Enzymol. 53: 382 (1978)) vorgegangen wurde. Das Gesamtprotein wurde mittels des BCA-Proteintests (Pierce, Rockford, IL) bestimmt. Die SOD-Aktivitäten wurden dann als Units/mg Gesamtprotein ausgedrückt.

Ergebnisse:

i) Transgene EC-SOD-Mäuse

[0083] Charakterisierung transgener Mäuse: Mäuse, die das humane EC-SOD-Transgen tragen, wurden mittels Southern Blot-Analyse detektiert. Die Northern-Analyse verschiedener Gewebe der F1 bei einer Maus, die als Trägerin des Transgens ermittelt wurde, ist in Fig. 2 dargestellt. Hohe Spiegel des Transkripts humaner EC-SOD wurden im Herzen, Skelettmuskel und Gehirn transgener Mäuse detektiert, wogegen wenig oder kein Transkript in der Lunge, Leber und Milz beobachtet wurde. Bei den nicht-transgenen Geschwistertieren war kein Transkript detektierbar.

[0084] Durch Kreuzung zweier heterozygoter F1-Mäuse wurden homozygote Mäuse erzeugt. Die Detektion der homozygoten Mäuse erfolgte über die aufgefundenen, abweichenden Bandenintensitäten bei Anwendung der Southern Blot-Analyse auf gleiche Mengen an PstI-verdauter DNA der Nachkommen. Es wurde herausgefunden, dass die EC-SOD-Aktivität bei den Mäusen in Reaktion auf die Gesamt-Kopien des EC-SOD-Transgens zunahm (Tabelle I).

Tabelle I

[0085] EC-SOD-Aktivität in Geweben nicht-transgener, heterozygot transgener und homozygot transgener Mäuse. Für jede Messung wurden die Gewebe von 3 Mäusen vereint. Die Aktivität ist in Units/g Feuchtgewicht an Gewebe angegeben.

Gewebe	Nicht-transgen	Heterozygot	Homozygot
Gehirn	18	38	50
Herz	35	69	102

Beispiel II

Sauerstofftoxizität auf das zentrale Nervensystem

Protokolle:

[0086] Sauerstoffexpositionen: 7–8 Wochen alte Mäuse wurden mit fünf Tieren zur selben Zeit in einer kleinen Tierkammer (Bethlehem, Pennsylvania) Überdruck-Sauerstoff ausgesetzt. Nach dem Spülen der Kammer mit reinem Sauerstoff erfolgte innerhalb von 5 Minuten eine Kompression auf 50 Meter (6 ATA). Die Sauerstoffkonzentration in der Kammer wurde kontinuierlich mittels eines Servomex-Sauerstoff-Analysators (Modell 572, Sybron, Norwood, Massachusetts) überwacht und auf ≥ 99% gehalten. Die Kohlendioxidkonzentration wurde anhand periodischer Proben des Kammergases mittels eines IR-Detektors (IR Industries, Santa Barbara, Kalifornien) analysiert, wobei man diese Konzentration nicht über 0,1% steigen ließ. Die Kammertemperatur wurde auf 25–26°C gehalten, dabei erhöhte die Sauerstoff-Kompression in der Kammer die Temperatur zwar vorübergehend auf 30–32°C, was jedoch von einem äußeren Kontrollsystem innerhalb von 3 Minuten wieder auf die normale Kammertemperatur eingestellt wurde.

[0087] Die Expositionen dauerten 25 bis 75 Minuten, gefolgt von einem Druckabbau für 5 Minuten. Die Mäuse wurden, vom Beginn der Exposition an bis 4 Stunden nach der Entnahme aus der Kammer kontinuierlich auf Zeichen von Sauerstofftoxizität hin beobachtet. Die Zeitspanne bis zur ersten generalisierten Konvulsion (Anfalls-Latenz) und die Zeitspanne bis zum Tod wurden aufgezeichnet. Diese Expositionsbedingungen sind so gestaltet, dass sie Sauerstofftoxizität im ZNS ohne merkliche Anzeichen pulmonaler Sauerstofftoxizität verursachen.

[0088] Behandlung mit Diethyldithiocarbamat: Eine Stunde vor der Exposition gegenüber 6 ATA Sauerstoff wurde den Mäusen über i.p.-Injektion entweder 0,008 cc/g Saline oder 400 mg/kg Diethyldithiocarbamat, gelöst in normaler Saline (0,008 cc/g), verabreicht. Die Mäuse wurden dann gemäß obiger Beschreibung für 25 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt.

[0089] Um das Ausmaß der EC-SOD- und CuZn-SOD-Inhibition durch Diethyldithiocarbamat zu bestimmen, wurde den Mäusen Diethyldithiocarbamat verabreicht, wonach sie eine Stunde später getötet wurden. Die Gehirne wurden entnommen und gemäß obiger Beschreibung auf die Aktivität von EC-SOD und CuZn-SOD hin getestet.

[0090] Behandlung mit β-Mercaptoethanol: Eine Stunde vor der Exposition gegenüber 6 ATA Sauerstoff erhielten Mäuse i.p.-Injektionen entweder mit 0,008 cc/g Saline oder 180 mg/kg β-Mercaptoethanol (0,008 cc/g). Diese Dosis an β-Mercaptoethanol wurde ausgewählt, da sie eine gleichwertige Anzahl reduzierender Thiole enthält wie die Dosis an Diethyldithiocarbamat. Die Mäuse wurden dann gemäß obiger Beschreibung für 30 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt.

Behandlung mit N-ϖ-Nitro-L-Arginin einem Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase:

[0091] Zehn Minuten vor Beginn der Druckbehandlung wurde den transgenen und nicht-transgenen Mäusen 0,008 cc/g Saline oder 20 mg/kg (0,008 cc/g) N-ϖ-Nitro-L-Arginin, gelöst in sterilem Wasser, i.p. verabreicht. Die Mäuse wurden dann für 25 oder 75 Minuten gemäß obiger Beschreibung 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt.

[0092] Statistische Analyse: Es wurde ein gepaarter Student-T-Test verwendet, um die Enzymaktivitäten in transgenen und nicht-transgenen Mäusen zu vergleichen. Ein χ^2-Test mit Bonferroni-Korrektur wurde verwendet, um die Signifikanz bei den Unterschieden des Überlebens bei den Überdruck-Expositionen zu bestimmen. Die Analyse der Varianz mittels eines Scheffe F-Tests wurde verwendet, um die Unterschiede der Anfalls-Latenzzeit bei den verschiedenen Mäusegruppen zu vergleichen.

Ergebnisse:

[0093] Überdruck-Sauerstoffexpositionen: Um die Auswirkungen gesteigerter EC-SOD-Spiegel im Gehirn auf die Sauerstofftoxizität im ZNS zu testen, wurden sowohl transgene als auch nicht-transgene Mäuse (siehe Beispiel I) für 25 Minuten 6 ATA Sauerstoff ausgesetzt. Die transgenen Mäuse waren gegenüber der ZNS-Sauerstofftoxizität empfindlicher (83% Mortalität) als die nichttransgenen Mäuse (33% Mortalität) (**Fig. 3**).

[0094] Transgene und nicht-transgene Mäuse wurden nachfolgend mit einem Inhibitor der CuZn-SOD, Diet-

hyldithiocarbamat, behandelt, um zu bestätigen, dass die gesteigerte Empfindlichkeit der transgenen Mäuse gegenüber ZNS-Sauerstofftoxizität das Ergebnis der gesteigerten SOD-Aktivität war. Sowohl bei transgenen als auch bei nicht-transgenen Mäusen resultierte die Behandlung mit 400 mg/kg an Diethyldithiocarbamat in einer 80%igen Inhibition der EC-SOD und in einer 60%igen Inhibition der CuZn-SOD im Gehirn. Dies stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein (Frank et al, Biochem. Pharmacol. 27: 251 (1978); Heikkila et al, J. Biol. Chem. 251: 2182 (1976)). Die Behandlung mit Diethyldithiocarbamat verlieh sowohl transgenen als auch nicht-transgenen Mäusen eine gesteigerte Resistenz gegenüber ZNS-Sauerstofftoxizität. Die Überlebensrate stieg auf 100% bei den transgenen Mäusen und auf 93% bei den nicht-transgenen Mäusen (Fig. 3). Das Einsetzen der Anfälle verzögerte sich ebenfalls vierfach bei den mit Diethyldithiocarbamat behandelten Mäusen (Fig. 4).

[0095] Um zu bewerten, ob Diethyldithiocarbamat nicht eher dadurch vor der ZNS-Sauerstofftoxizität schützt, indem es als ein Reduktionsmittel anstatt als Inhibitor der SOD-Aktivität fungiert, wurden die Mäuse mit einer äquimolaren Menge an reduzierenden Thiolen in Form von β-Mercaptoethanol behandelt und dann Überdruck-Sauerstoff ausgesetzt. Fig. 5 zeigt, dass β-Mercaptoethanol nicht vor der ZNS-Sauerstofftoxizität schützt.

[0096] Eine Möglichkeit, die erklären könnte, warum EC-SOD die ZNS-Sauerstofftoxizität verschlimmert, könnte darin liegen, dass Stickstoffmonoxid ein Mediator der ZNS-Sauerstofftoxizität ist und die EC-SOD Stickstoffmonoxid vor der Superoxid-vermittelten Inaktivierung schützt. Um die Hypothese zu testen, dass Stickstoffmonoxid zu der ZNS-Sauerstofftoxizität beiträgt, wurden wildtypische (C57BL/6 × C3H)F1-Mäuse mit einem Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase, N-ϖ-Nitro-L-Arginin, behandelt. Fig. 6 zeigt die Wirkungen von N-ϖ-Nitro-L-Arginin auf die Anfalls-Latenz bei Mäusen. Die Vorbehandlung mit N-ϖ-Nitro-L-Arginin resultierte in einer signifikanten Zunahme der Anfalls-Latenzzeit (13,50 ± 5,6 min) im Vergleich zu den mit Saline behandelten Mäusen (2,75 ± 1 min). Fig. 7 zeigt, dass die Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthase auch die Überlebensrate nach der Exposition gegenüber Überdruck-Sauerstoff signifikant erhöhte. Mäuse, denen der Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase verabreicht worden war, zeigten 50% Mortalität nach 90 Minuten Exposition gegenüber 6 ATA Sauerstoff, und eine Mortalität von 100% wurde nicht unterhalb einer 2-stündigen derartigen Exposition erreicht. Mit Saline behandelte Mäuse dagegen zeigten bereits nach nur 25 Minuten der Exposition eine 50%ige Mortalität, wobei eine Mortalität von 100% bereits nach 30 Minuten bei 6 ATA Sauerstoff erreicht wurde. Fig. 8 zeigt, dass die prozentuale Überlebensrate unter Überdrucksauerstoff von der verabreichten Dosis des Inhibitors abhängig war. Der von diesem kompetitiven Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase verliehene Schutz konnte aufgehoben werden, wenn ein Überschuss an L-Arginin verabreicht wurde (Fig. 6 und Fig. 9).

[0097] Die Wirkungen des Stickstoffmonoxidsynthase-Inhibitors N-ϖ-Nitro-L-Arginin auf die ZNS-Sauerstofftoxizität wurden dann bei den transgenen Mäusen untersucht. Diese Behandlung verminderte die ZNS-Sauerstofftoxizität sowohl bei den transgenen als auch bei den nichttransgenen Mäusen dramatisch. Das Überleben bei einer 25-minütigen Exposition gegenüber 6 ATA Sauerstoff stieg bei beiden Gruppen auf 100% (Fig. 3). Die Anfalls-Latenz verzögerte sich ebenfalls signifikant (Fig. 4). Die Expositionsdauer wurde dann auf 75 Minuten erhöht, um zu untersuchen, ob die transgenen Mäuse noch immer empfindlicher gegenüber Überdruck-Sauerstoff waren als die nicht-transgenen Mäuse. Die Ergebnisse in Fig. 10 zeigen, dass die Behandlung mit N-ϖ-Nitro-L-Arginin den Unterschied in der Empfindlichkeit beseitigte, der bei der 25-minütigen, in Fig. 3 dargestellten Exposition zwischen den unbehandelten transgenen und nicht-transgenen Mäusen beobachtet wurde.

Beispiel III

Kälte-induziertes Hirnödem

Protokolle:

[0098] Verletzungsmodell: Junge (6–7 Wochen alte) Mäuse (siehe Beispiel 1) wurden mit 60 mg/kg Pentobarbital (Nembutal, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois) betäubt. Es wurde dann ein Einschnitt in die Kopfhaut vorgenommen und ein Stahlstab (20 cm Länge, 3 mm Durchmesser), der in flüssigem Stickstoff äquilibriert worden war, und zwar in einem 8 cm-Bad mit flüssigem Stickstoff 4 cm vom Stabende, wurde für 30 Sekunden auf den Schädel über der rechten Gehirnhemisphäre aufgebracht. Der Hauteinschnitt wurde dann genäht.

[0099] Zwei Stunden nach der Verletzung erhielten die Mäuse eine weitere Dosis an Pentobarbital. Der Brustraum wurde geöffnet, die Lungen entnommen, und die Mäuse wurden dann über den linken Ventrikel des Her-

zens mit 20 ml Saline perfundiert. Das Gehirn wurde dann entnommen und das Cerebellum ausgeschnitten. Die rechte (R) und linke (L) Gehirnhemisphäre wurden getrennt und unverzüglich gewogen (Feuchtgewicht, W). Jede Hälfte wurde dann bei 70°C für 2–3 Tage in einem heißen Luftofen getrocknet, bis ein konstantes Gewicht erreicht wurde (Trockengewicht, D). Der Index des Ödems (I) wurde dann, wie in Gleichung 13 gezeigt, berechnet.

$$I = (W/D\ R - W/D\ L)/(W/D\ L) \times 100 \qquad [13]$$

[0100] Diese Berechnung ermöglichte es, die linke Gehirnhemisphäre als interne Kontrolle für die verletzte rechte Gehirnhemisphäre bei jeder Maus zu verwenden.

[0101] Chemische Behandlungen: Es wurden sechs Gruppen von Experimenten durchgeführt, um die Bedeutung von extrazellulärem Superoxid, Eisen und Stickstoffmonoxid bei dem Kälte-induzierten Hirnödem zu untersuchen. Bei allen Gruppen wurden die Arzneistoffe in Saline gelöst und mit 0,008 cc/g 15 Minuten vor der Kälte-Verletzung injiziert. Bei Gruppe 1 wurde die Ödembildung bei den EC-SOD-transgenen Mäusen mit der Ödembildung bei den nicht-transgenen Geschwistertieren verglichen. Bei Gruppe 2 erfolgte der Vergleich der Ödembildung zwischen den wildtypischen (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit Saline behandelt worden waren, und den (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit 0,33 mg/g an Deferoxamin (0,51 µmol/g) behandelt worden waren. Gruppe 3 verglich (C57BL/6 × C3H)F1-Mäuse, die mit Saline behandelt worden waren, mit. (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit 0,51 µmol/g an Fe^{3+}-gesättigtem Deferoxamin behandelt worden waren. Gruppe 4 bestand aus (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit Saline behandelt worden waren, und (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit 0,02 mg/g an N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester behandelt worden waren. Gruppe 5 bestand aus (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit Saline behandelt worden waren, und (C57BL/6 × C3H)F1-Mäusen, die mit 0,02 mg/g an N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester plus 0,05 mg/g an L-Arginin behandelt worden waren. Gruppe 6 verglich die Ödembildung zwischen den nicht-transgenen Mäusen, EC-SOD-transgenen Mäusen, die mit Saline behandelt worden waren, und EC-SOD-transgenen Mäusen, die mit 0,02 mg/g an N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester behandelt worden waren.

[0102] Mit Eisen gesättigtes Deferoxamin wurde hergestellt, indem man äquimolare Mengen an Deferoxamin und dann Eisen(III)chlorid in Saline löste. Die Sättigung des Deferoxamins mit dem Eisen(III)-Ion wurde spektrophotometrisch durch Messen der Extinktion bei 425 nm (ε = 2500 M^{-1} cm^{-1} für Fe^{3+}-Deferoxamin) (Monzyk und Crumbliss, J. Amer. Chem. Soc. 104: 4921 (1982)) bestimmt.

[0103] Behandlung mit Evan's Blau: Eine Stunde und 50 Minuten nach der Kälteverletzung wurden 5 ml/kg an 1% Evan's Blau in Saline in die Femoralarterie der transgenen und nicht-transgenen Mäuse injiziert. Die Mäuse wurden 10 Minuten später getötet. Die Lungen wurden dann herausgeschnitten und die Mäuse über den linken Ventrikel mit normaler Saline perfundiert, bis keine blaue Farbe mehr in der ausfließenden Lösung war. Die Gehirne wurden dann entnommen und photographiert.

[0104] Statistische Analyse: Es wurde ein gepaarter Student T-Test verwendet, um die Signifikanz der Ödementwicklung im Vergleich zu den nicht-transgenen Mäusen oder den mit Saline behandelten Mäusen für jede der getesteten Gruppen zu bestimmen. Es wurde eine Varianz-Analyse mittels eines Fisher PLSD-Tests verwendet, um die Signifikanz innerhalb Gruppe 6 zu vergleichen. P-Werte von unter 0,05 wurden als signifikant bewertet.

Ergebnisse:

[0105] Kälte-induziertes Hirnödem: Wenn transgene Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere einer Kälte-induzierten Verletzung an der rechten Gehirnhemisphäre unterzogen wurden, wurde herausgefunden, dass die transgenen Mäuse im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren einen signifikanten Schutz vor der Ödembildung besaßen (**Fig. 11**). Die prozentuale Ödembildung war bei den transgenen Mäusen um 44% geringer als bei den nichttransgenen Geschwistertieren, und der Austritt des Evan's Blau-Farbstoffs war bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren weniger sichtbar (**Fig. 12**).

[0106] Um den Beitrag von Eisen bei der Ödembildung in diesem Modell zu testen, wurden Mäuse mit i.p.-Injektionen von Deferoxamin oder Saline vor der Kälte-induzierten Verletzung vorbehandelt. Tabelle II zeigt, dass die Vorbehandlung mit Deferoxamin in einer zu 43% niedrigeren Ödembildung im Vergleich zu den Mäusen resultierte, denen nur Saline verabreicht worden war. Die Mäuse wurden dann vor der Kälte-induzierten Verletzung mit i.p.-Injektionen von Eisen-gesättigtem Deferoxamin oder Saline vorbehandelt, um zu prüfen, ob die Eisen-komplexierenden Eigenschaften dieser Verbindung tatsächlich für den Schutz gegen Ödembildung not-

wendig waren. Tabelle IV zeigt, dass auch dann, wenn Deferoxamin mit Eisen gesättigt war, es nach wie vor in der Lage war, vor Ödembildung zu schützen und zu 32–48% weniger Ödemen führte, als es bei mit Saline behandelten Kontrollen beobachtet wurde. Die absoluten Werte für den Ödemindex wurden als recht variierend ermittelt, jedoch zeigten wiederholte Versuche in konsistenter Weise dieselben signifikanten Trends beim Schutz gegen Ödembildung bei den verschiedenen geprüften Behandlungen.

Tabelle II

[0107] Bewertung der Wirkung des Eisen(III)-Chelators Deferoxamin auf die Ödembildung nach Kälteinduzierter Gehirnverletzung. Wildtypische (C57BL/6 × C3H)F1-Mäuse wurden mit Deferoxamin behandelt, um zu bestimmen, welchen Effekt die Eisen-komplexierenden Eigenschaften dieser Verbindung auf die Ödembildung haben. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

	Behandlung	**n**	**Ödemindex**
	Saline	7	5,92 ± 0,62
	Deferoxamin	7	3,41 ± 0,49*
Durchgang 1:			
	Saline	6	8,24 ± 0,53
	Fe-Deferoxamin	6	5,63 ± 0,63*
Durchgang 2:			
	Saline	5	7,65 ± 1,30
	Fe-Deferoxamin	5	3,97 ± 0,59*

* p < 0,05 beim Vergleich mit dem Ödem-Index der jeweils mit Saline behandelten Kontrollen unter Verwendung eines gepaarten Student-T-Tests.

[0108] Diese Ergebnisse zeigen, dass Deferoxamin durch einen Mechanismus, der von der Fähigkeit der Substanz, Eisen einzufangen, unabhängig ist, in der Lage ist, vor Ödembildung zu schützen. Da Deferoxamin zum Einfangen sowohl des Peroxynitritanions (Radi et al., Arch. Biochem. Biophys. 288(2): 481 (1991)) als auch zum Einfangen des Hydroxylradikals (Hoe et al, Chemico-Biological Interactions 41: 75 (1982)) in der Lage ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es diese Eigenschaften von Deferoxamin sind, die es befähigen, vor gefäßbedingten Ödemen zu schützen.

[0109] Um diese Hypothese zu testen, wurde die Synthese von Stickstoffmonoxid mit N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester, einem kompetitiven Inhibitor des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase, inhibiert, um zu bestimmen, ob dies in einem Schutz vor der Ödembildung nach einer Kälte-induzierten Verletzung resultieren wird. Tabelle III zeigt, dass die Behandlung mit N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester Mäuse in signifikanter Weise vor der Ödembildung schützt, was in einer um 37% niedrigeren Ödembildung resultiert, als dies bei den mit Saline behandelten Kontrollen der Fall ist. Dieser Schutz durch N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester wurde durch die gleichzeitige Verabreichung eines Überschusses an L-Arginin bei den Mäusen aufgehoben (Tabelle III).

Tabelle III

[0110] Auswirkung der Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthese auf die Ödembildung nach Kälte-induzierter Hirnverletzung. Wildtypische (C57BU6 × C3H)F1-Mäuse wurden mit dem kompetitiven Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase, N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester (LNAME), behandelt, um zu bestimmen, welche Auswirkung Stickstoffmonoxid auf gefäßbedingte Ödeme hat. Es wurde außerdem N-ϖ-Nitro-L-Arginin-Methylester plus einem Überschuss an L-Arginin (LNAME + L-Arg) an Mäuse verabreicht, um zu prüfen, ob die Wirkungen, die bei LNAME alleine zu sehen sind, aufgehoben werden können. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

Behandlung	n	Ödem-Index
Saline	6	5,77 ± 0,29
LNAME	6	3,65 ± 0,51*
Saline	6	6,56 ± 0,21
LNAME + L-Arg	6	6,03 ± 0,71

* p < 0,05 beim Vergleich mit dem Odem-Index der entsprechenden, mit Saline behandelten Kontrollen unter Verwendung eines gepaarten Student-T-Tests.

[0111] Bei den letzten Versuchen wurden transgene EC-SOD-Mäuse entweder mit Saline oder mit Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester behandelt, um zu bestimmen, ob es einen additiven Effekt bei der Verhinderung der Ödembildung bei Mäusen gibt, die sowohl erhöhte Spiegel an EC-SOD aufweisen als auch den Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthase. Die Tabelle IV zeigt, dass bei Verabreichung des Inhibitors der Stickstoffmonoxidsynthase an transgene EC-SOD-Mäuse im Verhältnis zu den transgenen Mäusen, die nur durch erhöhte Spiegel an EC-SOD im Gehirn geschützt sind, kein additiver Schutz gegen die Ödembildung detektiert wird.

Tabelle IV

[0112] Evaluierung des Effekts der Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthese auf die Ödembildung bei transgenen Mäusen. Vergleich der Ödembildung bei nicht-transgenen Mäusen mit der Ödembildung bei transgenen Mäusen mit erhöhten Spiegeln an Hirn-EC-SOD-Aktivität und mit der Ödembildung bei transgenen Mäusen, die 15 Minuten vor der Kälte-induzierten Verletzung mit einem Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthese behandelt wurden (20 mg/kg N-ω-Nitro-L-Arginin; Transgen + LNAME). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben und wurden unter Verwendung einer Varianzanalyse mittels eines Fisher PLSD-Tests verglichen. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Mäusen und den transgenen + LNAME Mäusen zu erkennen.

Behandlung	n	Ödemindex
Nicht-Transgen	6	7,91 ± 0,67
Transgen	6	4,91 ± 0,78*
Transgen + LNAME	6	4,30 ± 0,96*

* p < 0,05 im Vergleich zu dem Odem-Index bei nicht-transgenen Mäusen.

Beispiel IV

Immunlokalisierung von EC-SOD

Protokolle:

[0113] Humane Lunge: Es wurden fünf humane Lungenproben erhalten, um die Verteilung von EC-SOD in humanem Lungengewebe zu bewerten. Eine Probe wurde von einem chirurgischen Pathologie-Präparat des rechten oberen Lappens erhalten, entnommen bei einer 43 Jahre alten, weißen Frau mit einer Rauchergeschichte von 50 Packungen im Jahresbezug (entsprechend einer Packung pro Tag für ein Jahr) und einem vereinzelt stehenden Knoten, der beim Röntgen des Brustkorbs gefunden wurde. Bei der Patientin wurde die Diagnose auf Schuppenzellkarzinom gestellt. Bei den hier dargestellten Studien wurde Gewebe aus einer Region, die nicht an dem Karzinom aus diesem Lappen beteiligt war, verwendet. Eine zweite Lunge wurde aus einer chirurgischen Pathologie-Probe des rechten oberen Lappens erhalten, entnommen bei einem 51 Jahre alten weißen Mann mit einer Rauchergeschichte von 60 Packungen im Jahresbezug, bei dem bei der Röntgenuntersuchung ein isolierter Knoten gefunden wurde. Der Patient hatte keine anderen Krankheiten; die Diagnose lautete auf Schuppenzellkarzinom. Lungengewebe, das nicht am Karzinom aus dieser Probe beteiligt war, wurde für die Lokalisation der EC-SOD verwendet. Eine dritte Lunge wurde aus einer Schnellautopsie (Gewebe 6

Stunden nach dem Tod entnommen) von einem 66 Jahre alten weißen Mann mit Demenz, jedoch ohne Rauchergeschichte oder Lungenkrankheit, erhalten. Die vierte untersuchte Lunge wurde aus überschüssigem Lungengewebe einer Lunge erhalten, die für den Empfänger einer Lungentransplantation zu groß war. Die Lunge stammte von einer 45 Jahre alten weißen Frau ohne Rauchergeschichte oder Lungenerkrankung. Die fünfte bei diesen Studien untersuchte Lunge stammte ebenfalls aus überschüssigem Lungengewebe, das für die Lungentransplantation vorgesehen war und aus einem 39 Jahre alten weißen Mann ohne Rauchergeschichte oder Lungenerkrankung stammte. Bemerkenswerter Weise wurden keine Unterschiede der Markierungsmuster zwischen den chirurgischen Pathologieproben bzw. den Autopsiegeweben von den Spendern für die Lungentransplantation beobachtet.

[0114] Die Gewebe wurden in 2% Paraformaldehyd/0,2% Glutaraldehyd in 0,01 M Phosphatgepufferter Saline (PBS; 1,2 g NaH_2PO_4, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, pro 1 Liter, pH 7,3) für 1 Stunde fixiert, gefolgt von einer Übernacht-Fixierung in 4% Paraformaldehyd bei 4°C und dann in einer O. C. T.-Verbindung. Die Gewebe wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Hexan eingefroren und bei –70°C gelagert, bis sie für lichtmikroskopische Studien zerlegt wurden.

[0115] Für elektronenmikroskopische Studien wurden die Lungengewebe bis zu der Äquilibrierung in Sucrose wie bei den lichtmikroskopischen Studien weiterverarbeitet. Nach der Äquilibrierung in Sucrose wurden die Lungengewebe für 10 Minuten bei 37°C mit 10% Gelatine infiltriert. Die Gewebescheiben in Gelatine wurden dann auf Eis verfestigt, in Würfel mit 2 mm/Seite geschnitten und dann über Nacht einem Gefrierschutz in 4% Polyvinylalkohol mit 2 M Sucrose unterzogen. Diese Proben wurden dann auf Kontrollstreifen aufgebracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert, bis sie für die elektronenmikroskopischen Studien zerlegt wurden.

[0116] Charakterisierung von Anfikörper gegen humane rekombinante EC-SOD: Humane rekombinante EC-SOD (zur Verfügung gestellt von S. L. Marklund, Umea, Schweden; Tibell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6634 (1987)) und der 20.000 × g-Überstand eines humanen Lungenhomogenisats wurden in Gegenwart von β-Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat denaturiert, indem man sie für 5 Minuten kochte und dann eine Elektrophorese durch ein 12% Polyacrylamidgel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat durchführte. Das Protein wurde dann elektrophoretisch auf Nitrozellulose übertragen. Der Blot wurde dann mit 4,3 µg/ml einer mittels Affinitätschromatographie an rh-EC-SOD gereinigten IgG-Fraktion aus Kaninchen-anti-rh-EC-SOD (zur Verfügung gestellt von S. M. Marklund, Umea University Hospital, Umea, Schweden) inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit ^{125}I-Protein A und Autoradiographie.

[0117] Absorption von anti-EC-SOD IgG: Man ließ CNBr-aktivierte Sepharose in PBS quellen. Das gequollene Gel wurde so mit PBS gemischt, dass das abgesetzte Gel 50% des Volumens einnahm. Das Gel wurde suspendiert und 100 µl wurden mit 100 µg reiner rh-EC-SOD für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter sanfter Bewegung gemischt. Das Gel wurde dann 4-mal mit PBS + 1% Rinderserum-Albumin (BSA) gewaschen und ergab mit PBS + 1% BSA 100 µl. Es wurden dann 100 µl an Kaninchen-anti-rh-EC-SOD mit der zweifachen Konzentration, wie sie bei der Immunmarkierung verwendet wurde, hinzugegeben, gefolgt von 2-stündigem Mischen bei Raumtemperatur und unter sanfter Bewegung. Es wurde dann IgG aus nicht immunisierten Kaninchen in einer Konzentration zu dem Überstand hinzugegeben, die der vorhergesagten Konzentration des anti-rh-EC-SOD-IgG entsprach, die durch die Prozedur entfernt wurde. Dieser Überstand wurde dann für die nachfolgende Immunmarkierumg verwendet.

[0118] Lichtmikroskopische Immunhistochemie: 4 µm Serienschnitte von in O. C. T. eingebettetem Gewebe wurden auf einem Cryostat bei –20°C geschnitten und auf mit poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (3 Schnitte pro Objektträger) gelegt. Die Schnitte wurden bei –70°C gelagert, bis die Markierung erfolgte. Die Schnitte wurden dann für EC-SOD markiert, wobei ein indirektes Immunoperoxidase-Verfahren (Milde et al., J. Histochem. Cytochem. 37: 1609 (1989); Randell et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 4: 544 (1991)) mit einem biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG und Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Jackson, ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Pennsylvania)) verwendet wurde (Tabelle V). Um die Hintergrund-Färbung zu vermindern, wurden die Schnitte in 1% H_2O_2 in Methanol inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren und in 10 mM Borhydrid, um Aldehyde zu blocken. Unspezifische Bindungen wurden durch die Inkubation mit 5% Ziegennormalserum (NGS), 5% Milch und 1% BSA in PBS blockiert. Die optimalen Verdünnungen des primären und sekundären Antikörpers wurden empirisch bestimmt und erfolgten in PBS mit 1% Milch plus 1% BSA (Milch war nicht in der Streptavidin-Lösung enthalten). Die Scheiben wurden unter Verwendung von Diaminobenzidin (10 mg Diaminobenzidin, 50 ml 0,05 M Tris·Cl, pH 7,6, 100 µl 3% H_2O_2) entwickelt und mit 1% Methylgrün gegengefärbt. Als Kontrolle wurden Serenschnitte separat entweder mit Kaninchen-anti-rh-EC-SOD (EC-SOD), IgG aus nicht immunisierten Kaninchen oder Kaninchen-anti-rh-EC-SOD, aus dem das

EC-SOD-bindende IgG herausgezogen worden war (EC-SOD absorbiert; siehe oben), markiert.

Tabelle V

[0119] Färbeprozeduren für die lichtmikroskopische Immunhistochemie. Alle Inkubationen erfolgten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur.

	Inkubation	Dauer
Schritt 1	1% H_2O_2 in Methanol	30 Minuten
Schritt 2	10 mM Borhydrid in PBS (nur mit Glutaraldehyd fixiertes Gewebe)	30 Minuten
Schritt 3	5% NGS, 5% Milch, 1% BSA/PBS	30 Minuten
Schritt 4	Primärer Antikörper in 1% Milch, 1% BSA/PBS (verschiedene Verdünnungen)	1 Stunde
Schritt 5	Biotin-markiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:6000 in 1% Milch, 1% BSA/PBS)	1 Stunde
Schritt 6	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (1:2000 in 1% BSA/PBS)	1 Stunde
Schritt 7	Diaminobenzidin	15 Minuten
Schritt 8	1% Methylgrün in Wasser	15 Minuten

Elektronenmikroskopische Immunzytochemie:

[0120] Ultradünne Gefrierschnitte (70 nm) von humanem Lungengewebe wurden mit Kaninchen-anti-rh-EC-SOD und 10-nm Protein A-Gold gemäß vorheriger Beschreibung (Crapo et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 89: 10405 (1992)) immunmarkiert (Tabelle VI). Kurz dargestellt wurden die Schnitte zuerst 3-mal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 0,15% Glycin in PBS inkubiert, um die Aldehydgruppen zu blocken. Unspezifische Bindungen wurden weiterhin durch Inkubation in 1% BSA in PBS für 10 Minuten geblockt. Die Verdünnungen des primären und sekundären Antikörpers wurden empirisch bestimmt und erfolgten in PBS mit 1% BSA. Die Schnitte wurden gemäß vorheriger Beschreibung (Crapo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10405 (1992)) mit Uranyloxalat und mit Uranylacetat in Methylcellulose gefärbt. Die Kontrollgruppen entsprachen denen, die oben für die Lichtmikroskopie beschrieben worden sind.

Tabelle VI

[0121] Färbeprozeduren für die elektronenmikroskopische Immunhistochemie. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

	Inkubation	Dauer
Schritt 1	PBS + 0,15% Glycin	3 x 5 Minuten
Schritt 2	1% BSA/PBS	5 Minuten
Schritt 3	Primärer Antikörper in 1% BSA/PBS	45 Minuten
Schritt 4	Protein A-Gold	30 Minuten
Schritt 5	Uranyloxalat	5 Minuten
Schritt 6	Uranylacetat / Methylcellulose	10 Minuten

Ergebnisse:

[0122] Charakteristika des EC-SOD Antikörpers: Der Antikörper gegen rh-EC-SOD wurde mittels Western Blot-Analyse der rh-EC-SOD und eines humanen Lungenhomogenisats charakterisiert. Fig. 13 zeigt, dass der Antikörper sowohl mit der EC-SOD Typ C-Untereinheit (obere Bande) als auch mit der Typ A-Untereinheit (untere Bande) in einem humanen Lungenhomogenisat reagiert (siehe hierzu Sandström et al, Biochem. J. 267: 18205 (1992)). Die Typ A-Untereinheit kommt in vivo nicht im Interstitium von Geweben vor (Sandström et al., Biochem. J. 290: 623 (1993)). Der Antikörper reagierte mit drei Banden in der Spur, die gereinigte Typ C rh-EC-SOD enthält. Die zwei Spezies mit dem niedrigsten Molekulargewicht in Fig. 13 sind durch teilweise, unzureichende Glykosylierung der rh-EC-SOD in den stark überproduzierenden CHO-Zellen bedingt.

[0123] Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Unter Verwendung eines Antikörpers gegen die rh-EC-SOD wurde dieses Protein in der menschlichen Lunge immunlokalisiert. Die lichtmikroskopische Immunhistochemie zeigte, dass EC-SOD hauptsächlich mit der Bindegewebsmatrix um die Gefäße und Luftwege in der Lunge verbunden ist (Fig. 14a und b, Fig. 15a, b und c). EC-SOD wurde in enger Nähe zu den zu Gefäßen und Luftwegen gehörenden glatten Muskeln gefunden (Fig. 14a und b und Fig. 15a). EC-SOD wurde auch im Bindegewebe der alveolaren septalen Spitzen (Fig. 15c) beobachtet, was eine Affinität von EC-SOD für die Bindegewebsmatrix nahelegt. Es wurde keine Färbung in Zusammenhang mit den vaskulären Endothelzellen bei den großen elastischen Arterien, den Gefäßen mittlerer Größe oder den Kapillaren beobachtet (Fig. 14a und b). Bemerkenswerter Weise fehlte die EC-SOD an den Epithelzelloberflächen der Luftwege (Fig. 15a und b); ebenso fehlte sie im Knorpel (Fig. 15a).

[0124] Der Antikörper gegen EC-SOD war ein polyklonaler IgG-Kaninchen-Antikörper, der unter Verwendung von rh-EC-SOD affinitätsgereinigt worden war. Um die Spezifität der Markierung für EC-SOD zu testen, wurde das IgG, das für EC-SOD spezifisch war, unter Verwendung von reiner, an Cyanogen-Bromid-Sepharose gebundener rh-EC-SOD aus dem Antiserum herausgezogen. Es wurde dann IgG aus nicht immunisierten Kaninchen zu diesem absorbierten Antikörperansatz hinzugegeben, und zwar in einer Menge, die hinreichend war, das absorbierte IgG zu ersetzen. Die Markierung von Lungengeweben mit dieser prä-absorbierten Antikörperpräparation resultierte im Fehlen der Markierung in allen Gebieten der Lunge, einschließlich des pulmonalen Gefäßsystems (Fig. 14c). Die Markierung des Lungengewebes mit Nicht-Immun-IgG alleine resultierte ebenfalls in einem Fehlen der Färbung in allen Bereichen der Lunge. Diese Kontrollen zeigen, dass die bei dem primären Antikörper beobachtete Färbung spezifisch für die EC-SOD in der Lunge ist.

[0125] Elektronenmikroskopische Immunzytochemie: Eine Zusammenfassung der Markierung für die EC-SOD in der Lunge, die unter Verwendung der elektronenmikroskopischen Immunzytochemie aufgefunden wurde, ist in Tabelle VII dargestellt. EC-SOD war in allen Regionen der Lunge hauptsächlich mit Proteinen der extrazellulären Matrix assoziiert. Insbesondere wurde ein hohes Maß an Färbung in Gebieten gesehen, die reich an Typ I-Collagen waren (**Fig.** 16), sowie im Zusammenhang mit anderen, nicht-identifizierten Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix (Fig. 17). Bemerkenswerter Weise wurde keine Markierung für EC-SOD in Elastin-reichen Gebieten beobachtet (**Fig.** 16). Ein hohes Maß an Färbung wurde nahe der Oberfläche glatter Muskelzellen und in der Bindegewebsmatrix, die die glatten Muskelzellen an Gefäßen (Fig. 17) und Luftwegen umgibt, gefunden. Bemerkenswerter Weise fehlte eine Färbung an der Oberfläche der Endothelzellen an kleinen, mittleren und großen Gefäßen (Fig. 18a und b). Das Fehlen der Endothelzellfärbung, die bei der lichtmikroskopischen Immunhistochemie gefunden wurde, unterstützt die elektronenmikroskopischen Ergebnisse. Eine Markierung von EC-SOD wurde auch im Plasma im Lumen der Blutgefäße beobachtet (Fig. 18a). Die Lokalisierung der EC-SOD im Plasma wurde erwartet, da dieses Protein zuerst im Plasma entdeckt wurde (Marklund, Acta Physiol. Scand., 5492: 19 (1980)). Eine Markierung für EC-SOD wurde in den interzellulären

Verbindungen zwischen den bronchialen Epithelzellen (Fig. 19) beobachtet, fehlte jedoch an der apikalen Oberfläche dieser Zellen. Schließlich fehlte die EC-SOD-Markierung an der Oberfläche von Typ I und Typ II-Zellen. Eine moderate, jedoch konsistente Menge an intrazellulärer EC-SOD fand sich in Typ II-Epithelzellen und in bronchialen Epithelzellen (Fig. 19).

Tabelle VII

[0126] Verteilung von EC-SOD in der menschlichen Lunge. (+) zeigt das Vorliegen von Markierung für EC-SOD, und (–) zeigt eine fehlende Markierung für EC-SOD. (±) zeigt Gebiete, in denen niedrige Mengen an Markierung für EC-SOD in nicht konsistenter Weise beobachtet wurden.

POSITION	EC-SOD
Zelloberflächen	
Endothelial	-
Typ I Zelle	-
Typ II Zelle	-
Glatte Muskelzelle	+
Fibroblast	±
Extrazelluläre Matrix	
Typ I Collagen	+
Elastin	-
Knorpel	-
Nicht identifizierte Matrixelemente	+
Intrazellulär	
Endotheliale Zelle	±
Typ I Zelle	-
Typ II Zelle	+
Bronchiale Epithelzelle	+
Glatte Muskelzelle	-
Fibroblast	±
Blut	
Plasma	+
Rote Blutzelle	-

[0127] Kontrollen, die dadurch erfolgten, dass man den für EC-SOD spezifischen Antikörper aus dem primären Antikörperansatz herauszog und diesen absorbierten Antikörper durch IgG aus nicht immunisierten Kaninchen ersetzte, führten zum Fehlen von Markierung in allen Gebieten der Lunge einschließlich Regionen, die reich an Typ I-Collagen waren, wie in Fig. 16c zu sehen ist. Zusätzlich führte die Verwendung von IgG aus nicht immunisierten Kaninchen anstelle des primären Antiserums ebenfalls zum Fehlen von Markierung in allen Gebieten der Lunge. Das Fehlen der Markierung bei diesen Kontrollen zeigt, dass die bei dem primären Antiserum beobachtete Markierung spezifisch für EC-SOD in der Lunge ist.

[0128] Die Lokalisierung von EC-SOD an der Oberfläche glatter Muskelzellen und in der extrazellulären Matrix um diese Zellen sowohl bei Blutgefäßen als auch bei Luftwegen zeigt, dass EC-SOD an diesen Positionen eine wichtige Funktion haben könnte. Es ist bekannt, das Superoxid schnell mit Stickstoffmonoxid reagiert und dessen Eigenschaften als Relaxans glatter Muskeln inaktiviert. Daher sollte die Anwesenheit von EC-SOD entlang des Diffusionswegs von Stickstoffmonoxid zu glatten Muskelzellen die Halbwertszeit dieses kurzlebigen interzellulären Botenmoleküls in dieser speziellen Region erhöhen und somit dessen Wirksamkeit als gefäßerweiterndes Mittel steigern. Die starke Markierung für EC-SOD, die um die vaskulären und zu den Luftwegen gehörenden glatten Muskelzellen beobachtet wird, zeigt eine Funktion für EC-SOD als Mediator der Stickstoffmonoxidaktivität bei der Aufrechterhaltung niedriger pulmonaler Gefäßdrücke und eines niedrigen Luftwegswiderstandes.

[0129] Zusätzlich zu der Markierung von EC-SOD in Verbindung mit glatten Muskelzellen scheint EC-SOD außerdem eine starke Co-Lokalisierung mit Typ I-Collagen aufzuweisen. Es ist zuvor für Collagen gezeigt worden, dass dieses empfindlich ist gegenüber dem Angriff durch reaktive Sauerstoffspezies, wie etwa dem Superoxidanion. Zusätzlich könnte das Superoxidanion dazu in der Lage sein, latente Collagenasen aus polymorphkernigen Leukozyten (PMN) zu aktivieren, was zu einem weiteren Collagenabbau führen kann. Da für Collagenfragmente gezeigt wurde, dass diese chemoattraktiv und aktivierend auf PMNs wirken, könnte jede Steigerung der Produktion von Superoxid, die in Collagenabbau resultiert, entzündliche Reaktionen und Gewebezerstörung durch die Rekrutierung und Aktivierung von PMNs beschleunigen. Folglich könnte die Assoziation von EC-SOD mit Collagen wichtig dafür sein, einen Superoxid-vermittelten Abbau von Collagen zu verhindern und daher ein Mittel darstellen, um Entzündungsantworten zu kontrollieren.

Beispiel V

Humanes EC-SOD-Gen

Protokolle:

Materialien und Radiochemikalien:

[0130] [α-^{35}S]dATP (~1400 Ci/mmol), [γ-^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) und [α-^{35}P]CTP (800 Ci/mmol) wurden bei New England Nuclear erworben. Humane genomische DNA, T_7-, T_3- und SP6-RNA-Polymerase, RNasin und das Plasmid pGEM3Zf(+) wurden von Promega Biotec erhalten. Das Sequenase Sequenzierkit (V 2.0) stammte von der United States Biochemicals Corporation. Humane poly(A+)-RNA wurde von Clontech erworben. SeaPlaque GTG-Agarose stammte von FMC BioProducts. Die Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs. Alle anderen verwendeten Reagenzien entsprachen molekularbiologischen Reinheitsgrad. Die Oligonukleotide wurden unter Verwendung eines Applied Biosystems 380B oder 392 von der Duke University, Abteilung für Botanik, Einrichtung für DNA-Synthese, synthetisiert. Die geladenen Nylonmembranen (GeneScreen Plus) stammten von DuPont.

Humaner Northern Blot oder Analyse:

[0131] Zwei µg an poly(A+)-RNA wurden aus acht verschiedenen menschlichen Geweben gereinigt. Diese mRNAs wurden einer Elektrophorese auf einem denaturierenden, Formaldehyd enthaltenden 1,2% Agarosegel unterzogen und auf eine ladungsmodifizierte Nylonmembran übertragen, gefolgt von einer Fixierung mittels UV-Bestrahlung. Die Membran wurde in 50% Formamid, 0,25 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 0,25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS und 5% Polyethylenglykol (Molekulargewicht 8000) prähybridisiert. Die Hybridisierung des Blots erfolgte im gleichen Puffer über Nacht bei 60°C mit 1 × 106 cpm/ml an [^{32}P]-markierter humaner EC-SOD-RNA, erzeugt durch Transkription der cDNA voller Länge unter Verwendung von T_3-RNA-Polymerase in Gegenwart von [α-^{32}P]CTP. Der Blot wurde in 0,25 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 1% SDS und 1 mM EDTA bei 75°C gewaschen, gefolgt von einem zweiten Waschen unter Verwendung von 0,04 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 1% SDS und 1 mM EDTA bei 75°C für 30 Minuten. Hierauf folgte die Exposition gegenüber einem XAR-5-Film unter Verwendung eines Lightening Plus Verstärkerschirms bei –70°C. Das Autoradiogramm wurde unter Verwendung eines LKB Ultrascan XL-Laserdensitometers gescannt, und die Peaks wurden durch Integration unter Verwendung des internen digitalen Integrators des Densitometers oder durch Ausschneiden der Peaks aus einer Druckerspur und Wiegen quantifiziert.

Schnelle 5'-Amplifikafion der cDNA-Enden:

[0132] 0,5 µg an poly(A+)-mRNA aus menschlichem Herzen wurden unter Verwendung von 2 pmol EC7, ei-

nem 5'-ständigen, für das EC-SOD-Gen spezifischen Antisense-Oligonukleotid (5'-ATGACCTCCTGCCA-GATCTCC-3'), gemäß einem Protokoll von GIBCO BRL (5'-RACE System) revers transkribiert. Die RNA-Matrize wurde durch die Zugabe von RNase H für 10 Minuten bei 55°C abgebaut. Die resultierende cDNA wurde unter Verwendung einer GlassMAX (GIBCO BRL) DNA-Isolierungs-Zentrifugationskartusche isoliert. Die gereinigte cDNA wurde unter Verwendung von terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT, 0,5 Unit/µl) mit einem dC-Schwanz versehen. Die Reaktion erfolgte mit 200 µM dCTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 25 mM KCl, 1,25 mM $MgCl_2$ und 50 µg/ml an Rinderserum-Albumin für 10 Minuten bei 37°C. Die TdT wurde dann für 10 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert.

[0133] Die Produkte dieser Reaktion wurden dann mittels PCR amplifiziert, wobei ein „Anker"-Primer (GIBCO BRL), der an den homopolymeren Schwanz hybridisiert, und EC4 (ein inneres, 5'-ständiges, für das EC-SOD-Gen spezifisches „nested" Antisense-Oligonukleotid, 5'-AGGCAGGAACACAGTAGC-3') verwendet wurden. Alternativ wurden die mit dC-Schwanz versehenen Produkte unter Verwendung von EC7 und HEC1 (einem für das EC-SOD-Gen spezifischen Primer des Sinnstrangs, 5'-TGGGTGCAGCTCTCTTTTCAGG-3') PCR-amplifiziert. Die endgültige Zusammensetzung dieser Reaktion beinhaltete 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 100 µg/ml Rinderserum-Albumin, 400 nM Anker-Primer, 200 nM Gen-spezifischen Primer, sowie jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Nach Inkubation der PCR-Reaktion für 5 Minuten bei 94°C wurde Amplitaq (Perkin Elmer Cetus) mit einer Endkonzentration von 0,04 Unit/µl zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte auf einem Perkin Elmer 9600 für 35 Zyklen mit Schmelzen für 45 Sekunden bei 94°C, Anhybridisieren bei 53°C für 15 Sekunden und Verlängerung für 90 Sekunden bei 72°C. Die EC-SOD-cDNA voller Länge (6 ng) wurde als Positivkontrolle bei der PCR-Reaktion verwendet. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2% SeaPlaque GTG-Agarosegel aufgetrennt und mittels des Verfahrens nach Southern (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 (1975)) unter Verwendung des alkalischen Transferprotokolls (Reed et al., Nuc. Acids Res. 13: 7207 (1985)) auf geladene Nylon-Membranen übertragen. Die DNA wurde an der Membran fixiert, indem die Membran bei 80°C für 2 Stunden in einem Vakuumofen gebacken wurde. Der resultierende Blot wurde mit [^{32}P]-endmarkiertem NEC2 (einem inneren, für EC-SOD spezifischen nested Primer, 5'-TCCAGCTCCTCCAAGAGAGC-3') über Nacht bei 37°C hybridisiert. Der Blot wurde bei steigender Stringenz gewaschen, bis die Hintergrundhybridisierung entfernt war. Hierauf folgte die Exposition gegenüber einem XAR-5-Film unter Verwendung eines Lightening Plus Verstärkerschirms bei –70°C.

Humane genomische Southern Blot-Analyse:

[0134] Zehn µg humane genomische DNA wurden bis zur Vollständigkeit mit den Restriktionsendonukleaseenzymen BamHI, EcoRI, KpnI und PstI verdaut. Die DNA wurde dann auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach alkalischer Denaturierung (Reed et al., Nuc. Acids Res. 13: 7207 (1985)) mittels der Southern-Technik (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 (1975)) auf eine geladene Nylon-Membran übertragen. Die DNA wurde durch 2-stündiges Erhitzen auf 80°C im Vakuumofen an der Membran fixiert. Es wurde [^{32}P]CTP-markierte humane EC-SOD Antisense-Strang-cRNA unter Verwendung der EC-SOD-cDNA, die mit StuI linearisiert worden war, synthetisiert. Die Hybridisierung des Blots (500 × 10^3 cpm/ml) erfolgte bei 50°C in 50% Formamid, 0,25 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 0,25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS und 5% Polyethylenglykol (Molekulargewicht 8000). Nach der Übernacht-Hybridisierung wurde der Blot in 0,25 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 2% SDS und 1 mM EDTA und dann in 0,04 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 1% SDS und 1 mM EDTA bei steigender Stringenz gewaschen, bis die Hintergrundhybridisierung minimiert war. Der Blot wurde bei –70°C und unter Verwendung eines Lightening Plus-Verstärkerschirms der Exposition gegenüber einem XAR-5-Film unterzogen.

Isolierung des humanen Gens für EC-SOD:

[0135] Eine humane, adult-weibliche genomische Leukozyten-Bibliothek, konstruiert in dem Vektor EMBL-3, wurde von Clontech bezogen. Es wurden ungefähr 1 × 10^6 pfu bei einer Dichte von 50.000 pfu/Platte unter Verwendung von [^{32}P]CTP-markierter humaner EC-SOD-cRNA (1 × 10^6 dpm/ml) durchgetestet. Der erste bis dritte Screen identifizierte etwa 7 singuläre putativ positive Plaques. Die einzelnen Plaques wurden isoliert, und die Lamda-DNA wurde unter Verwendung des LamdaSorb-Phagen-Adsorbens (Promega Biotec) gereinigt. Die Größe der Insert-DNA aus jedem Klon wurde mittels SalI-Restriktionsendonuklease-Verdau, gefolgt von einer Elektrophorese in 0,7% Agarose, bestimmt. Ausgewählte Klone wurden einer ausführlichen Restriktionsendonuklease-Kartierung unterzogen. Basierend auf den Ergebnissen der Restriktionskartierung und der asymmetrischen Hybridisierung unter Verwendung 5'- und 3'-anhybridisierender EC-SOD-Oligonukleotide, wurde Klon #7 für die gesamte nachfolgende DNA-Sequenzanalyse ausgewählt. Klon #7 enthält ein etwa 18–20 kb großes Fragment.

DNA-Sequenzierung des humanen EC-SOD-Gens:

[0136] Die allgemeine Strategie, die für die Sequenzierung von Klon #7 verwendet wurde, ist in **Fig.** 20 dargestellt. Durch Restriktionsendonuklease erzeugte DNA-Fragmente verschiedener Größe aus Klon #7 wurden in die Vektor-DNA von pGEM3Zf(+) subkloniert. Es wurde das Didesoxysequenzier-Verfahren (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York (1992)) unter Verwendung doppelsträngiger DNA als Matrize sowie des Enzyms Sequenase (United States Biochemicals) eingesetzt (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 (1977)). Es wurden sowohl der universelle als auch der –40 M13 Sequenzierprimer verwendet, um die DNA-Sequenzierung bei jedem subklonierten Fragment zu starten. Es wurden von diesen anfänglichen Sequenzierdaten abgeleitete Oligonukleotide synthetisiert, und zwar etwa alle 250 Basenpaare, bis die vollständige Nukleotidsequenz erhalten war. Wie in **Fig. 20B** gezeigt, wurden die Sequenzierdaten von beiden Strängen erhalten, mit Ausnahme des 3'-Bereichs des Gens, wo die DNA-Sequenz nur an einem Strang erhalten wurde.

Computer-gestützte Sequenzanalyse und Suche in der transkriptionellen Datenbank:

[0137] Das Programm IntelliGenetics Geneworks (Version 2.2) wurde für das Organisieren der DNA-Sequenzdaten verwendet. Die Homologiesuche wurde über NCBI unter Verwendung von BLAST (Altschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)) Netzwerkservice und nicht-redundanter Nukleotidsequenzdatenbanken (GenBank (77.0) + EMBL (35.0) + EMBLUpdate + GBUpdate) durchgeführt. Die Transkriptionsfaktor-Datenbanksuche wurde durchgeführt unter Verwendung sowohl des SIGNAL SCAN 3.0 Algorithmus (Prestridge et al., CABIOS 9: 113 (1993)) sowie des FINDPATTERNS-Programms des GCG-Packets (V 7.2), wobei Ausgabe 6.3 der Transkriptionsfaktordatenbank (Gosh, Nuc. Acids Res. 18: 1749 (1990)) verwendet wurde. Für eine Vorhersage der Signalpeptidase-Spaltstelle wurden die Programme SIGSEQ1 (Folz et al., J. Biol. Chem. 261: 14752 (1986)) und SIGSEQ2 (Folz et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 146: 870 (1987)) verwendet.

Ergebnisse:

Gewebespezifische Expression von humaner EC-SOD:

[0138] Um die Expression von humaner EC-SOD zu untersuchen, wurde poly(A+)-mRNA aus acht verschiedenen menschlichen Geweben auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine geladene Nylon-Membran übertragen. Da ein früheres Paper lange Expositionszeiten beschrieben hatte, um die für EC-SOD spezifischen Banden bei der genomischen Southern Analyse zu identifizieren (Hendrickson et al., Genomics 8: 736 (1990)), wurde eine radioaktiv markierte Antisense-cRNA-Sonde, die von humaner EC-SOD-cDNA voller Länge abgeleitet war, verwendet (Oury et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 9715 (1992)). Eine diskrete Bande von etwa 1,4 kb kann bei allen acht analysierten menschlichen Geweben beobachtet werden (**Fig. 21A**). Zusätzlich enthält der Skelettmuskel ein etwa 4,2 kb großes Transkript, das bei den anderen Geweben nicht detektiert wurde. Durch densitometrisches Scannen der 4,2 kb und 1,4 kb großen Banden kann berechnet werden, dass das größere Transkript etwa 32% der gesamten EC-SOD-Transkripte des Skelettmuskels ausmacht. Im Gehirn ist eine sehr schwache Bande von 2,2 kb zu erkennen. Diese Bande war zu schwach für eine Quantifizierung mittels Laserdensitometer. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels Laserdensitometrie und Integration der Peaks bei Autoradiogrammen, die im linearen Expositionsbereich erhalten wurden (**Fig. 21B**). Nach der Normalisierung im Bezug auf das Gehirn zeigte das Herz die meiste Expression mit dem 10,1-fachen des Gehirns. Darauf folgten Plazenta, Pankreas und Lunge, die 13,6, 10,2 bzw. 7,5 ergaben. Die Expression im Skelettmuskel betrug 4,7 für die 1,4 kb-Bande oder 6,9 für das 1,4 kb-Transkript plus dem 4,2 kb-Transkript, während Niere und Leber bezogen auf das Gehirn die 6,3-fache bzw. 4,1-fache Expression zeigten. Diese Expressionsmuster sind auf Basis der Sondenmarkierung eines weiteren, unabhängigen Northern Blots mit mehreren Geweben reproduziert worden. Die Banden basieren in besonderer Weise auf der relativ hohen Stringenz des Waschens sowie auf Daten, die eine Sinnstrang-EC-SOD-cRNA als Sonde verwenden, was unter den gegebenen Bedingungen keine Hybridisierung ergab.

Kartierung der Transkriptionsinitiationsstelle:

[0139] Zuerst wurde eine Kartierung der Transkriptionsinitiationsstelle unter Verwendung des Primer-Extensionsverfahrens versucht. Bei der Verwendung mehrerer verschiedener endmarkierter 5'-Oligonukleotide sowie der Verwendung von poly(A+)-mRNA aus humaner Lunge und humanem Herzen sowie von Gesamt-RNA, die aus humanen Vorhautfibroblasten isoliert worden war, wurde auch nach langen Expositionszeiten kein positives Signal erhalten. Dies schien nicht an der Technik zu liegen, da es möglich war, positive Signale zu erhalten, wenn RNA verwendet wurde, die durch eine in vitro-Transkription der EC-SOD-cDNA erzeugt worden

war. Ob der ausbleibende Erfolg bei der Verwendung dieser Technik durch die sehr geringe Häufigkeit der für EC-SOD codierenden mRNA oder durch ein oder mehrere andere Probleme bedingt war, ist unklar. Unter der Annahme einer mRNA niedriger Häufigkeit arbeitend, versuchten wir die Technik der schnellen Amplifikation der cDNA-Enden, um dieses Signal durch PCR zu amplifizieren. Es wurde der für das EC-SOD-Gen spezifische Primer EC7 für die Hybridisierung an und die reverse Transkription von poly(A+)-mRNA aus menschlichem Herzen verwendet, wie in **Fig.** 22 dargestellt.

[0140] Die Hälfte dieses Reaktionsansatzes wurde unter Verwendung von terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase mit einem 3'-dC-Schwanz versehen, die verbleibende Hälfte blieb unverändert. Diese Matrizen wurden dann einer PCR-Amplifikation unterworfen, wobei die Genspezifischen Primer HEC1 + EC7 ebenso verwendet wurden wie der Anker-Primer + EC4. Die Produkte dieser Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Nylonmembranen überführt und mit dem inneren Gen-spezifischen nested Primer HEC2 sondenmarkiert. Ein Autoradiogramm dieses Versuchs ist in Fig. 22A dargestellt. Bei Verwendung von EC-SOD-cDNA als Kontrollmatrize und HEC1 + EC7 wird eine Bande von 217 bp erwartet (Spur 3 von Fig. 22A). Da zu erwarten ist, dass die Primer HEC1 und EC7 unabhängig von einem dC-Schwanz amplifizieren, sind Banden gleicher Intensität in den Spuren 4 und 5, die auch von gleicher Größe wie die EC-SOD-Kontrolle sind, zu sehen. Bei Verwendung des Anker-Primers (der an den dC-Schwanz hybridisiert) und EC4, ist nur eine Bande von ~ 190 bp zu sehen (Spur 1). Da die Matrize hier nicht mit poly-C-Schwanz versehen war, zeigte Spur 2 erwartungsgemäß kein Signal. Nach Abziehen von 48 bp (der Länge des Anker-Primers) würde die Größe der revers transkribierten DNA ~ 136 bp 5' von dem EC4-Primer entsprechen. Diese Analyse würde vorhersagen, dass es etwa 6 Basenpaare an zusätzlicher 5'-Sequenz an dem cDNA-Klon gibt, und dass die Transkriptionsinitiation etwa 6 bp stromaufwärts von dem ersten Intron (angezeigt durch eine gestrichelte Box) beginnt. Obwohl die Initiation der eukaryotischen Transkription für gewöhnlich an einem Adenosinrest beginnt, wird angenommen, dass sie hier an einem G beginnt (Breathnach et al., Ann. Rev. Biochem. 50: 349 (1981)).

Genomische Southern Blot-Analyse:

[0141] Um die Charakterisierung des humanen EC-SOD-Gens zu beginnen, wurden 10 µg an humaner genomischer Gesamt-DNA einem Restriktionsverdau unterzogen und die Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, gefolgt von der Übertragung auf eine Nylonmembran. Der Blot wurde mit einer [^{32}P]-markierten partiellen EC-SOD-cRNA sondenmarkiert. Ein Autoradiogramm dieses Blots ist in Fig. 23 dargestellt. Wie für jede Spur zu sehen ist, gibt es singuläre Banden, die mit dem jeweiligen Restriktionsverdau assoziiert sind. Es waren keine Schattenbanden, die Pseudogene nahe legen könnten, zu erkennen. Wenn eine cRNA-Sonde voller Länge für die mit KpnI verdaute DNA verwendet wurde, war eine zusätzliche Bande von ~ 4000 bp zu sehen, die dem 3'-Ende des Gens entspricht. Zusätzlich zeigt die KpnI-Spur eine 0,5 kb-Bande, die auf anderen Blots besser zu sehen war. Dieses Bandenmuster war ähnlich einer Restriktionskarte des humanen EC-SOD-Klons #7 (siehe Fig. 20A).

Isolierung und Charakterisierung der humanen EC-SOD durch DNA-Sequenzierung:

[0142] Es wurden mehrere unabhängige positive Klone bei einer humanen, adulten, genomischen Leukozyten-Bibliothek, die in EMBL-3 konstruiert worden war, identifiziert. Diese Klone wurden einer ausgedehnten Restriktionsendonuklease-Kartierung unterzogen und wurden mit für EC-SOD spezifische 5'- und 3'-Oligonukleotide sondenmarkiert, um die relative Orientierung der Inserts zu bestimmen. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde Klon #7 für eine weitere Analyse herangezogen. Klon #7 ist etwa 18 bis 20 kb groß und enthält wenigstens 5000 bp an 5'-flankierender DNA und wenigstens 4000 bp an 3'-flankierender DNA. Die Restriktionskarte von Klon #7 ist in Fig. 20A dargestellt. Diese Karte ähnelt den Ergebnissen, die als Daten einer genomischen Southern Blot-Analyse erhalten wurden, was anzeigt, dass Klon #7 das EC-SOD-Gen enthält. Die Strategie zur Subklonierung und Sequenzierung von Klon #7 ist in Fig. 20B dargestellt. Es wurden zusammenhängende und überlappende Restriktionsfragmente verschiedener Größe in den Plasmidvektor pGEM32f(+) subkloniert (Fig. 20B). Die DNA-Inserts wurden an beiden Strängen sequenziert, wobei eine Kombination aus „Primer Walking" und vektorspezifischen, universellen Sequenzier-Primern verwendet wurde. Die 3'-Hälfte des 7K36-Inserts wurde nur an einem Strang sequenziert. Veröffentlichte Sequenzdaten für die humane EC-SOD-cDNA (Hjalmarsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6340 (1987)) sowie DNA-Sequenzinfonmation, erhalten von einem unabhängigen cDNA-Klon, der zusätzliche untranslatierte 5'-Information enthielt (Hendrickson et al., Genomics 8: 736 (1990)) wurden verwendet, um die genomische Intron/Exon-Struktur zu bestimmen. Auf Basis eines Vergleichs dieser Daten mit der genomischen Sequenzinformation wurde bestimmt, dass das humane EC-SOD-Gen drei Exons und zwei Introns enthält (Fig. 20C). Exon 1 enthält wenigstens 5 Basenpaare, ist aber vermutlich länger (um etwa 6 Basenpaare), da der genaue Startpunkt für die Transkriptionsinitiation nicht ermittelt wurde (siehe unten). Exon 2 enthält 84 bp und ist von Exon 1 durch eine 572

bp große, als Intron 1 gekennzeichnete, zwischengeschaltete Sequenz getrennt. Exon 3 ist von Exon 2 durch Intron 2, ein 3849 bp-Segment, getrennt. Exon 3 beinhaltet eine Gesamtheit von 1336 bp, wobei bei 17 bp im Inneren dieses Exons der Start für den Beginn der vollständigen codierenden Sequenz von präEC-SOD liegt (Fig. 20D). Diese beinhaltet ein 18 Aminosäuren langes Signalpeptid, das den 222 Aminosäuren der reifen Proteinsequenz vorangeht. Es gibt keine Introns, die die verschiedenen strukturellen Domänen von EC-SOD trennen. Diese Domänen sind schematisch in Fig. 20D dargestellt und beinhalten die Aminosäuren 1–95, die ein glykosyliertes Asn-89 enthalten und keine Sequenzhomologie zu anderen Proteinen aufweisen. Die Reste 96–193 zeigen eine starke Homologie zu CuZn-SOD-Proteinsequenzen mit einer Konservierung kritischer Aminosäuren, die für die Enzymkatalyse und Struktur wichtig sind. Die Aminosäuren 194–222 enthalten mehrfach geladene Reste, für die gezeigt wurde, dass sie für die Bindung an sulfatierte Proteoglykane wichtig sind. 558 bp der 5'-flankierenden Region, enthaltend putative regulatorische Elemente und 3675 bp der 3'-flankierenden Region wurden ebenfalls sequenziert. Die Daten der Exon-DNA-Sequenzen stehen in Übereinstimmung mit der veröffentlichten cDNA-Sequenz (Hjalmarsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6340 (1987)). Die Intron-Exon-Grenzen sind in Tabelle VIII dargestellt und sind mit der eukryotischen Konsensus-Spleiß-Sequenz (Senapathy et al., Methods Enzymol. 183: 252 (1990)) konform. Beide Introns spalten Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region des EC-SOD-Gens.

Tabelle VIII

Sequenzen an den Intron/Exon-Spleißverbindungsstellen

[0143] Die Größe der Introns und Exons ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die großgeschriebenen Buchstaben zeigen Exonsequenzen, während die kleingeschriebenen Buchstaben Intronsequenzen zeigen. Die gezeigten Spleißverbindungsstellen sind konform mit den zuvor veröffentlichten Konsensus-Sequenzen für Spleiß-Verbindungsstellen (Senapathy et al., Methods Enzymol. 183: 252 5 (1990)).

Donor	Introngröße (bp)	Akzeptor	Exon
TGCGGG gt ggac	572	gccc ag GCTCCA	84
GGAAAG gt gggt	3849	ccgc ag GTGCCC	1336

[0144] Fig. 24 zeigt die vollständige Sequenz für das humane EC-SOD-Gen. Exonsequenzen sind als in Boxen gepackte Großbuchstaben dargestellt, während intronische, bzw. 5'- und 3'-flankierende Sequenzen in Kleinschrift dargestellt sind. Exon 3 enthält die vollständige, nicht unterbrochene codierende Region für EC-SOD, und die Proteinsequenz ist unter Verwendung des Einbuchstaben-Aminosäurecodes angegeben. Das 18 Aminosäuren große Signalpeptid und die 222 Aminosäuren große reife Proteinsequenz sind hervorgehoben. Die Identifizierung der Signalpeptid-Spaltstelle stimmt mit dem Computer-Algorithmus überein, der die Stelle der eukaryotischen Signalpeptidspaltung (Folz et al., Biochem Biophys. Res. Comm. 146: 870 (1987)); Von Heijne, Eur. J. Biochem. 133: 17 (1983)) vorhersagt.

[0145] Es wurde eine Suche in der Transkriptionsfaktordatenbank verwendet, um putative transkriptionelle Regulatorelemente zu identifizieren. Obwohl nahezu alle eukaryotischen Promotoren ein TATA-Box-Element verwenden, um die Position der Transkriptionsinitiation festzulegen, kann keine offensichtliche TATA-Box für das EC-SOD-Gen ermittelt werden. Es wurden zwei CAAT-Box-Elemente identifiziert. Eines davon ist revers orientiert und befindet sich etwa 20 bp stromaufwärts von dem ersten Exon, während das zweite etwa 335 bp stromaufwärts zu finden ist. Das putative Signal für die Polyadenylierung ist angegeben, und die Stelle der Poly(A)-Adenylierung ist angezeigt. Die Suche in der Transkriptionsfaktordatenbank im Bezug auf die 5'-untranslatierte Region und das erste Intron identifizierte mehrere potentielle regulatorische Elemente. Ein cAMP-Response-Element (CREB) (TGACGT), das dem viralen Transkriptions-Element des Adenovirus (ATF) ähnlich ist, kann beginnend bei 121 bp gefunden werden (Fink et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6662 (1988); Sassone-Corsi, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 7192 (1988)). Eine Halbstelle für das Glucocorticoid-Response-Element (GRE) (TGTCCT) befindet sich bei 370 bp (Karin et al., Nature 308: 513 (1984)). Ein Response-Element für Skelettmuskel-spezifischen transaktivierenden Faktor (M-CAT) (CATTCCT) findet sich in reverser Orientierung beginnend bei Position 238 (Mar et al., Mol. Cell. Biol. 10: 4271 (1990)). Ein Xenobiotika-Response-Element (XRE) (CACGCW) findet sich innerhalb des ersten Introns an der Position 1085 bp (Rushmore et al., J. Biol. Chem. 265: 14648 (1990)). Ein Metall-regulatorisches Element (MRE) (TGCRCYC) findet sich an Position 89 (Culotta et al., Mol. Cell. Biol. 9: 1376 (1989)). Zwei putative Antioxidans-Response-Elemente (ARE) (RGTGACNNNGC) finden sich an den Positionen 650 und 5022 (Rushmore et al., J. Biol. Chem. 266: 11632 (1991)). Ein sis-Response-Element (SIF) (CCCGTC), das wichtig für die Induktion des Proto-Onkogens c-fos ist, findet

sich in reverser Orientierung an Position 251 (Wagnet et al., EMBO J. 9: 4477 (1990)). Es gibt eine AP1-Bindungsstelle oder TPA-Response-Element (TRE) (TGACTCA), das sich an Position 162 befindet (Risse et al., EMBO J. 8: 3825 (1989)). Die SV40-Enhancerregion AP4 (CAGCTGTGG) ist an Position 171 zu finden (Jones et al., Genes Dev. 2: 267 (1988)).

Beispiel VI

Durchtesten von Patienten auf Gendefekte in der EC-SOD

Präparation von aus Leukozyten stammender genomischer DNA aus Patienten:

[0146] Es werden normale gesunde Kontrollpatienten und Patienten mit Asthma, primärem pulmonalem Hochdruck und sekundärem pulmonalem Hochdruck identifiziert werden. Genomische DNA wird unter Verwendung eines QIAGEN Blut PCR-Kits gereinigt werden. Dabei wird von jedem Patienten oder einem Kontroll-Subjekt ein Milliliter Blut, enthaltend ~10^7 Leukozyten/ml in Natriumcitrat gesammelt werden. Das Blut wird in eine QIAGEN-Zentrifugationssäule eingebracht, und die Leukozyten werden durch kurze Zentrifugation in dem Harz eingeschlossen, während die Erythrozyten und das Hämoglobin ausgewaschen werden. Die Leukozyten werden durch Zugabe von 0,7 ml Lysepuffer und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten lysiert. Freigesetzte DNA bindet an das Harz in dem Röhrchen. Die verbleibenden Zelltrümmer werden durch mehrere Wasch/Zentrifugations-Zyklen weggespült. Die DNA wird durch Zugabe von 1,2 M KCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8,3 eluiert. Dies ergibt typischerweise ~10 µg an genomischer DNA (Reihsaus et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8: 334 (1993)).

Primeraufbau und PCR-Amplifikation der exonischen Sequenzen von EC-SOD:

[0147] Es werden Sense- und Antisense-Oligonukleotidprimer (oder Verwendungsprimer, die bereits aus der Sequenzierung der genomischen DNA erhalten wurden), die eine 3'-GC-Klammer (Sheffeld et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 232 (1989)) enthalten, erstellt werden. Diese Primer werden für die Intron-freie codierende Region des EC-SOD-Gens codieren. Es ist eine 172 bp-Region in der 3'-untranslatierten Region unter Verwendung von DNA-Sequenzierprimern und humaner genomischer DNA amplifiziert worden. Die PCR-Bedingungen sind beschrieben (Reihause et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8: 334 (1993); Innris et al. (Herausgeber) Academic Press San Diego S. 1–12 (1990)), wobei Taq-Polymerase und die folgenden Temperaturzyklen verwendet werden: anfängliche Denaturierung bei 95°C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen der Denaturierung bei 94°C für 20 sec, Anhybridisieren bei 57°C für 15 sec, und Verlängerung bei 72°C für 45 sec. Aufgrund der GC-Zusammensetzung und der jeweiligen Primer-Sequenz wird es notwendig sein, die Bedingungen für die PCR-Amplifikation unter Verwendung jedes Primer-Sets experimentell zu optimieren. Es werden drei Sets von Primern verwendet werden, um die gesamte codierende Region abzudecken.

Identifizierung von Mutationen über die Analyse konformativer Einzelstrang-Polymorghismen (SSSCP):

[0148] Die SSCP-Analyse ist verwendet worden, um Einzelbasen-Fehlpaarungen zu detektieren (Orita et al., Genomics 5: 874 (1989)). Es wird Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) verwendet werden, um Unterschiede der Mobilität (Wartell et al., Nuc. Acids Res. 18: 2699 (1990)) zu detektieren. Die Herstellung der Proben für die TGGE wird erfolgen durch Hitzedenaturieren des PCR-Produkts bei 98°C für 5 min, gefolgt von Renaturierung bei 50°C für 15 min mit der korrespondierenden Wildtyp-DNA, stammend aus der PCR des klonierten Gens. Die Elektrophorese wird auf einem Gel mit 5% Acrylamid und 8 M Harnstoff über einen Temperaturgradienten erfolgen. Der Temperaturgradient wird für jedes der EC-SOD-DNA-Segmente optimiert werden. Typische Gradienten für die Detektion von Mutationen des β_2-adrenergen Rezeptors bewegten sich zwischen 35°C und 60°C und erforderten 4 bis 6 Stunden Laufzeit (Rosen, Nature 262: 59 (1993)).

[0149] Alle PCR-Proben, die durch TGGE als positiv für Mutationen ermittelt wurden, werden direkt unter Verwendung der Didesoxytechnik (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 74: 5463 (1977)) sequenziert werden.

Beispiel VII

Inhibition von Xanthinoxidase

[0150] In einer ersten Studie erfolgten Tests in einer 1 ml-Quarzküvette mit 50 mM Carbonatpuffer, pH 10, 0,1 mM EDTA, 1 nM Xanthinoxidase (Boehringer Mannheim) bei 25°C. Die Aktivität von Xanthinoxidase wurde spektrophotometrisch durch Verfolgen der Abnahme an Xanthin über den Zeitverlauf bei 295 nm gemessen.

Es wurden vier Konzentrationen an Xanthin (25, 50, 250, 500 µM) und 2 Konzentrationen an MnTBAP (5, 10 µM) verwendet. Es wurden dann zwei Inhibitionskonstanten aus den Achsenabschnitten (Kii = 5,5 µM) und Steigungen (Kis = 15 µM) abgeleitet. Die in Fig. 25 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass MnTBAP die Xanthinoxidase in einer nicht kompetitiven Weise hemmt.

[0151] Bei einer zweiten Studie wurden Endothelzellkulturen aus der Lungenarterie des Kalbs (CPA-47 (Tissue and Cell 10: 535 (1978)) in Ham's F-12K-Medium mit 10% fetalem Rinderserum bei pH 7,4 und 37°C bis zur Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und mit gleicher Dichte in 24 Well-Platten inokuliert und bis zu 90%iger Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden gewaschen und für 1 Stunde mit 50 µM MnTBAP in minimal-essentiellem Medium (MEM) oder mit MEM alleine präinkubiert. Es wurden verschiedene Mengen an Xanthinoxidase (XO) plus 200 µM Xanthin (X) zugegeben und eine Inkubation für 24 Stunden ermöglicht. Die Zellverletzung wurde durch Messen der Freisetzung von zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium quantifiziert. Die Wirksamkeit von MnTBAP ist in Fig. 26 durch die Verminderung der XO/X-induzierten Freisetzung von LDH dargestellt.

Beispiel VIII

SOD-Mimetika bieten zellulären Schutz vor durch Paraquat induzierter Verletzung

[0152] Rattenlungen-Epithelzellkulturen (L2 (Kaighn und Douglas, J. Cell Biol. 59: 160a (1973)) wurden in Ham's F-12K-Medium mit 10% fetalem Rinderserum bei pH 7,4 und 37°C bis zur Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und mit gleicher Dichte in 24 Well-Platten inokuliert und bis zu 90%iger Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden gewaschen und für 1 Stunde mit 100 µM MnTBAP oder MnTMPyP in MEM oder mit MEM alleine präinkubiert. Es wurde dann Paraquat (2,5 mM) hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation für 48 Stunden. Die Zellverletzung wurde durch Messen der Freisetzung von zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium quantifiziert. Fig. 27 zeigt, dass MnTPyP (schraffierte Balken) und MnTBAP (graue Balken) die durch Paraquat induzierte LDH-Freisetzung verringern.

[0153] Bei einer weiteren Studie wurden Endothelzellkulturen aus der Lungenarterie des Kalbs (CPA-47 (Tissue and Cell 10: 535 (1987)) in Ham's F-12K-Medium mit 10% fetalem Rinderserum bei pH 7,4 und 37°C bis zur Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und mit gleicher Dichte in 24 Well-Platten inokuliert und bis zu 90%iger Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden gewaschen und für 1 Stunde mit verschiedenen Konzentrationen an MnTBAP in MEM oder mit MEM alleine präinkubiert. Es wurde dann Paraquat (2 mM) hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation für 24 Stunden. Die Zellverletzung wurde durch Messen der Freisetzung von zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium quantifiziert. MnTBAP verringerte die durch Paraquat induzierte LDH-Freisetzung in einer Dosis-abhängigen Weise (siehe Fig. 28).

[0154] Im Gegensatz zu MnTBAP schützt ZnTBAP nicht vor der durch Paraquat induzierten Verletzung. Endothelzellkulturen aus der Lungenarterie des Kalbs (CPA-47) wurden in Ham's F-12K-Medium mit 10% fetalem Rinderserum bei pH 7,4 und 37°C bis zur Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und mit gleicher Dichte in 24 Well-Platten inokuliert und bis zu 90%iger Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden gewaschen und für 1 Stunde mit verschiedenen Konzentrationen an ZnTBAP in MEM oder mit MEM alleine präinkubiert. Es wurde dann Paraquat (2 mM) hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation für 24 Stunden. Die Zellverletzung wurde durch Messen der Freisetzung von zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium quantifiziert. Die in Fig. 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ZnTBAP keine SOD-artige Aktivität besitzt. ZnTBAP kann als Negativkontrolle verwendet werden, um zu zeigen, dass das Redoxmetall beim Schutz gegen die Paraquat-Toxizität wichtig ist.

Beispiel IX

Durch MnTBAP vermittelter Schutz vor Paraquat-induzierter Lungenverletzung

[0155] Mäuse wurden entweder mit Paraquat (PQ, 45 mg/kg, i.p.) oder mit Saline (10 ml/kg, i.p.) behandelt und MnTBAP (2,5 mg/ml, eingesprüht in eine 2 l-Kammer bei 2 l/min für 30 min, zweimal täglich für 2 Tage) oder Raumluft ausgesetzt. Die Mäuse wurden 48 Stunden nach dem Beginn der Behandlung getötet und die Lungenverletzung bestimmt, indem die bronchoalveolare Spülflüssigkeit (BALF) analysiert wurde. Die verwendeten BALF-Verletzungsmarker waren Laktatdehydrogenase (LDH, als Unit/l), die Proteinkonzentration (als mg/dl) und der Prozentsatz der polymorphkernigen Leukozyten (PMN). Die Behandlung mit MnTBAP verlieh einen teilweisen Schutz gegen Paraquatinduzierte Lungenverletzung (siehe Fig. 30).

[0156] Alle oben zitierten Dokumente werden hiermit durch Verweis in ihrer Gesamtheit in Bezug genommen.

[0157] Ein Fachmann wird aus der Lektüre der hier offenbarten Lehre erkennen, dass verschiedene Änderungen hinsichtlich der Form und der Details vorgenommen werden können, ohne vom tatsächlichen Schutzbereich der Erfindung abzuweichen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: DUKE UNIVERSITY
(B) STRASSE: OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, P.O. BOX 90083, 001E ALLEN BUILDING
(C) ORT: DURHAM
(D) BUNDESLAND: NC
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 27708-0083

(i) ANMELDER:
(A) NAME: UNIVERSITY OF ALABAMA AT BURMINGHAM RESEARCH FOUNDATION
(B) STRASSE: 701 20TH STREET SOUTH
(C) ORT: BURMINGHAM
(D) BUNDESLAND: AL
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 35294-0111

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: SUPEROXIDDISMUTASE UND MIMETIKA DAVON

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: US 08/322,766
(B) ANMELDETAG: 13. Okt. 1994
(C) KLASSIFIKATION:

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: US 08/136,207
(B) ANMELDETAG: 15. Okt. 1993
(C) KLASSIFIKATION:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

His	Arg	His	His	Pro	Arg	Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Val	Glu	Asp	Leu
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Glu Cys Lys
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Ala Lys
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Ala
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Ala Cys Lys
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Ala Ser Glu Cys Ala
1 5 10 15

Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATGACCTCCT GCCAGATCTC C 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AGGCAGGAAC ACAGTAGC 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TGGGTGCAGC TCTCTTTTCA GG 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TCCAGCTCCT CCAAGAGAGC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TGCGGGGTGG AC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGAAAGGTGG GT 12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GCCCAGGCTC CA 12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CCGCAGGTGC CC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 11 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

RGTGACNNNG C 11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CAGCTGTGG 9

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 10079 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM; einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(v) FRAGMENTTYP: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
(B) ORT: 5085..5805

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GGATCCAGAG ATTTAGATTT TTTATAAGCT TTCCTGCCAC CGAAACGGGT GTTTGGGACC 60

TCACGAGGCC CTGTTCATTC TTCGTCGCTG CGCTCCCCAC TCTGTACTGG ATGCATTTAC 120

TGACGTTGTT GTCTCCGTCC CCAGAGTATG AACCCCCAAG GTGACTCATG CAGCTGTGGG 180

TGCCCGGCAT ACAGCATGGT GACTGGAATG GATGAGCACC CAATAAACAT TTGTTGCAGG 240

AATGCAGGAG GACGGGCAGG CCAGCAAGCA GGCTGCCTGG TTTTTCCCAC ATGGGCTTTT 300

CTGGGAAAGA AGAGCTTCTA TTTTTGGAAA GGGCTGCTAT GATTGAGAAA AGTTCATGGC 360

AGCAAAAAAA GGACAGACGT CGGGAGGGAA ACACTCCTAG TTCTCCCAGA CAACACATTT 420

TTTAAAAAGA CTCCTTCATC TCTTTAATAA TAACGGTAAC GACAATGACA ATGATGATTA 480

CTTATGAGTG CGGCTAGTGC CAGCCACTGT GTTGTCACTG GGCGAGTAAT GATCTCATTG 540

GATCTTCACG GTGGGCGTGC GGGGTGGACA GCCTCACACC CCCATTTTAC AGATGATGAA 600

AAGGAGGTGC AGGGAGTGGT GCAGCTGCTT CAGGCGTACA CAGATAGGAA GTGACAAGGC 660

TGGGACTCTG CAGCCTGAGT GTGTCATCAC GACCCACCCG CTGCTCTGCT CTCATAGGTA 720

TGACAGCACA GCTCTGGAGC AAATGCCATG CACATTTGCA AGGTGCCCAT TTCCATGCAG 780

CAAAAATAAG TCAATAAGTT ATTGACTTAG AGAAAAGCAA AGGGCCTCTC AATAAAGAGG 840

TCATTGTACA CCTCTCCAAA CAGGCGATTT TCTTTCTCAT TTTTATTCCC CTGCTGTGTG 900

CTGAAGGTCA CTGGCTACAA GCCGGTGAAG TCGCGGAATG GAATCCTTGG CCCGAAAACC 960

CAAAAATGGG AGGGGCAGAG GAGGTGGGGA CAGAGCGGGA GGAGGTGGAG GCGAAGCAAT 1020

TCTACAACCC GGGGAGGTCT GGCCTGCTTT TCCTCCCTGA ACTGGCCCAA TGACTGGCTC 1080

CCTCACGCTG ACCACTCCTC TGGGCTGGCC TCCTGCACTC GCGCTAACAG CCCAGGCTCC 1140

AGGGACAGCC TGCGTTCCTG GGCTGGCTGG GTGCAGCTCT CTTTTCAGGA GAGAAAGCTC 1200

TCTTGGAGGA GCTGGAAAGG TGGGTGCTAA GTTGAGGTTC ATTTTGTTCT TCTCGGAGTG 1260

TGCTTATTGA GTCTGAAGCT GGGTTGGGGC AACGGGCCTC TTCTTGGGAA CAAATTGGAT 1320

CATCTTCTTG GGAAGGAAAT GTACTTTCCC TGGCTGCTCT GAGGGGTTAG TGGGGAGGTG 1380

GAGTGAGCGG GGAGGAAGGC AAGGAGGGGA GGAAGAAACC GTTCCTCCTG TGGATCTGCA 1440

AAGACCAGTC CAAGAGGATT TTAGTGTTAG GAAAAGGAAT CTGGAGTGAC GAGAAAGGGG 1500

GCCTTTCTAG ATGTTGCATG GCTTTGGTGT CGGGAGCCAC TTATGGGACA GCAGGTACTC 1560

TAAAAAGCCA CCTCCTTAGG AAAGCAGAGA GGCCCTGGCC AGCTCAGGCT CCCAGCAAGA 1620

GCTCCTTCTA GGAGACAGCT GAGGGATGAA ACACACCCAA GGCTCAAGAG GGGCAGGTTC 1680

TTCCCAGATA CAGACCCAGG AAGGAGATAA AGGCTTGGTG CCTCTATTTG GTTCAGGATA 1740

AGGGCCCCTG TCCTCTTTCT CTGATAACAC TGTCCTCTTT CTCTGATAAC ACCGTCCTCC 1800

CTTCCAGATC CACGTACAAA GGAGGCCCTT AAAAAGGCAC TTGGTCATTC ACAGCTCAAA 1860

CTGAGCAAGA GGCTGTGGGA GAAGAATCAA GTTGGTCCCG AGGGGAAGAG GTGTCAAAGG 1920

CTTAAGAAAC AAGAAGTCAG AGTTTACCTG GGTTTGAGGG AGAATTTTCT TTCCCCCTTT 1980

TCCTCCTCCT CCTCCTTCTT CTCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGACATG 2040

GTCTCATTCT GTCACCCAGC ACCCAGGCTG GAATGTAGTG GCACGATCAC TATCACGGCT 2100

CACTACAGCC TCTACCTCCC GGGCTCAAGT GATCCTCCTA CCTCAGCCTC CTGAGTAACT 2160

GGGACTACAG GCACATGCCA CCACACCCAG CTATTTTTTT TTTTGCTAGA GATGGGGGTC 2220

TCTACCAGGT TGGTCTCATA CTCTTGTACT CAAATGATTC TCCTGTCTCA TCCTCCCAAA 2280

GGGTGGGATT ACAGGCATAA GCCACCATGC CTGGCTCTTC TTTTGGTTTC AGAGAAAAAC 2340

ATCTCCTTAA AATGTTTATT TCCCAAGGAT TCTTGAAAAA GAAAGCTCAC TGACACACCC 2400

AAAACAATCT GGTTTTGCTC TGTGCTTTTA GGGAGAACTT TCTAAGCAGC AGAGCCCTTC 2460

TGAGTGGCAG GGCTGTCTTA GGAGGAAGGT GTCTTTTGAT GATGGGGAAC TTCATGTCCA 2520

GGTCTGGCAG GAGAGTTACC CCACTTTCCT GCCTACTCCC TGGGGCTTTG GGGTAGTAGT 2580

ACCACATTGG GCCATGTCAT TTAGGTGAGT CCTTCAACAT CACTTTCTCT GCTTCTCCCT 2640

CTTTCTGGAT CCTCCTTCTT GGAGCCTTTC AAGGGGACCT CCTCTCACAG TGTCCATAGC 2700

ATCTCTTAGC TAATGGTCCT TAAAATCTCT ACCAGCAGCT TCTCTCTGAT AGCTAAGAGC 2760

TGCCATTTAC TGGGAACTTT CTATGTACTG GGCTCTGTGC TAAGTGCCCT AGATGAGAGA 2820

TGTGCAGTGT GGTGCCTAAA CCTTGGGCTT GGAGCAGACA CACACTTTCA AATCCTGCCT 2880

TCAGCTCCTT AGTGAACATG TCACCTTGGG CGGGACACAC GCCTCTCTGT GCCTCAGTTT 2940

CCTACACTTT AGAATGGGGA TAACACTGAA TAATGTTCTT GTGAGGATGC AGGGAATTAA 3000

CCCACGCACA GTACTTATAA TAGTGTCTGG CGCCTGTGTT CGATAAGTTT TAGCAATTCT 3060

AATCATCTCT TTTAAGCCTC GCAGCAAGCC TCTAAGGTAA GTCTGTATTA GTATCCCTAT 3120

TTACAGATGA GAAAACTGAG GTTCACAGGG GATGAGACAG TGTACAGTCT GCAGTCCAGC 3180

AATTACTCTG CTACTCAGCA ATAAAAATAG TAACAGCTAA CCCTTAGACT AAGTGGCAGA 3240

GTCAGGCTTT AGATTCATGA GGTGAGTTCT GGAATCCATC CCTTTAATAA CCACACTAAA 3300

TTGCCTTTCT GAAATGGTTA TATAAAGCAT ATCTACCCAA TCTTGGAGTT TTTTAAATGG 3360

CACCTAGTTT GGTGCTGGAA ATGCAGTTGA CCTTCAAAGC AATTCTTTGG AGGCAGCATC 3420

AATCCCTCTG GAAATACCTC GGTGGCATGG CTGGCCTTAT TCTACAGGTA AGGAACTTGA 3480

AGCTAAGCAT CAGTAACCCC GTGAAGTCAC AGTTAGTATA GGTTGGAATT GGGATTCAAA 3540

TCTGTACCTG ACTTTATAAT TCCTAGCTGG GCCCCAGAAT CTTTGATAGA GGTGTCTTCT 3600

TTCTTTTCTT TTCTTTCTTT CCTCTTTCTT TCCCTTCCTT CCTCTCTCTC TGTCTTTCTT 3660

CTCTCCTTTC TTTCTCACAG AATCAAAATC TCTTGGGGTG GGGCCTGGGC ATCTGATTTT 3720

TAAAAACCAG ACATCTGATG TGCAGTCAAC ACTGAGAACC CCTGCCAGCT TCATCTCCTC 3780

TTCTAAGTGC CAGACCCAAG TTTCCAACTG TCTGCCCACC TGTCTCCCCA CCTGGGCACC 3840

CGCCAGCGTC TCACCCTCAG GAGACTCCAG CTGAACTAAT CCTCTCTCCC TGCTTTTCCA 3900

GAACAGGTCC CACCCTCCCT CCACTCAGTC TCTCCTGCTG GGAACCCTGG TCATCTGCAC 3960

TGTGCCTTCA TCTTCCATCC TGCCAGTGCT GCCCGGTGTG TCTCTTAAAC CCATGCCTCC 4020

TCTGTGTGCA CCACCTGCAC TTTGGTAAAA GCCTTCATTT CCTGCTTGGG TTACTACAAC 4080

GCCCCCTAAC TCATCTCACT GTCTCTATTT CTGCTTCTCT GTCTCTCCCT AGGCTACTCC 4140

CATTCTTCCT CCCCTTTCCT CTTCATCCCA AAGTCCAACC CATATCCTTT TACCAGTAGG 4200

ACTTAAGGAA CTAAAGACTA TCTCATCACC CACTTTTCTT CTTAAAAACT TCCACTGCAC 4260

TGCCTGCTGA GATGGCCTTC CTACCCAACT TGGCTGGAAA ACTCCTACCC ATCTTGTGGA 4320

ACCCAGTTCA AAAGTCACCA CCTCTGAGAA GCCTTCCCTG AGGCTCCTAG GGAGATGGGT 4380

ACTGCCTCCT CTGTCCTTCT CCAGCACAGG CCCCATCTTC AATCACAGGA TTGTGCTGGA 4440

ATGATTGGAT GCCAAGTCTG TCCCTCACTG AACTCCTTAT GCAAAATCCA TATTATATGT 4500

TTCCTTTTGC CAGGTGTGGG CCCAGGTGCT GGGGATACCG ATGAATAAAA CTGAGTTTCT 4560

GTCTTCAAGA AGCTCCAAGT CTACTGAGTG TAGCAGAGAA CAGGGAGAAG GCACTTCAGG 4620

GAGAAGGGGT AGCACATGCA AAGCCCCAGA AGGCAGGGAC AGAAGCCTTA GGGATGTCTG 4680

TGGGGGAGGA TGGAGGAAGA GGGTAACAGG AGACCAGGTG GGGAGATGAG GGAGGTGGTC 4740

```
TGGAAGGGCC ATGAGACACC CCTCACGCTC CCTGAGACCC CCTCCACGCT ATAGAGATGG     4800

GACTGGAGAG GACGATGATC ATTTGTGACT CAGATCCCTG TGGGTTTCTT CAGATTGGGT     4860

CTCACCCATC TTTACAGCCA CAGCACCTAA CACAGTGCCC GGCACACAGC AGGCCCTAGA     4920

CAAACGTTTG CCACATGAAG TCATGCCACT GGCCAGGAAG CCCACTGGGG ACTGGGGGGT     4980

TGGTTCTGCG ATAATGGGGT CCCTGAGATT CTATGTTTCA CGTGACTAAG CCTCACTCTG     5040

CCCCCACCTC CGCGGGGGCG TCCCGCAGGT GCCCGACTCC AGCC ATG CTG GCG CTA      5096
                                                  Met Leu Ala Leu
                                                    1

CTG TGT TCC TGC CTG CTC CTG GCA GCC GGT GCC TCG GAC GCC TGG ACG      5144
Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser Asp Ala Trp Thr
  5                  10                  15                  20

GGC GAG GAC TCG GCG GAG CCC AAC TCT GAC TCG GCG GAG TGG ATC CGA      5192
Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg
                 25                  30                  35

GAC ATG TAC GCC AAG GTC ACG GAG ATC TGG CAG GAG GTC ATG CAG CGG      5240
Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg
             40                  45                  50

CGG GAC GAC GAC GGC ACG CTC CAC GCC GCC TGC CAG GTG CAG CCG TCG      5288
Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser
         55                  60                  65

GCC ACG CTG GAC GCC GCG CAG CCC CGG GTG ACC GGC GTC GTC CTC TTC      5336
Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe
     70                  75                  80

CGG CAG CTT GCG CCC CGC GCC AAG CTC GAC GCC TTC TTC GCC CTG GAG      5384
Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu
 85                  90                  95                  100

GGC TTC CCG ACC GAG CCG AAC AGC TCC AGC CGC GCC ATC CAC GTG CAC      5432
Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His
                105                 110                 115

CAG TTC GGG GAC CTG AGC CAG GGC TGC GAG TCC ACC GGG CCC CAC TAC      5480
Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr
            120                 125                 130

AAC CCG CTG GCC GTG CCG CAC CCG CAG CAC CCG GGC GAC TTC GGC AAC      5528
Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn
        135                 140                 145

TTC GCG GTC CGC GAC GGC AGC CTC TGG AGG TAC CGC GCC GGC CTG GCC      5576
Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala
    150                 155                 160

GCC TCG CTC GCG GGC CCG CAC TCC ATC GTG GGC CGG GCC GTG GTC GTC      5624
Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val
165                 170                 175                 180
```

```
CAC GCT GGC GAG GAC GAC CTG GGC CGC GGC GGC AAC CAG GCC AGC GTG      5672
His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val
                185                 190                 195

GAG AAC GGG AAC GCG GGC CGG CGG CTG GCC TGC TGC GTG GTG GGC GTG      5720
Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val
            200                 205                 210

TGC GGG CCC GGG CTC TGG GAG CGC CAG GCG CGG GAG CAC TCA GAG CGC      5768
Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg
        215                 220                 225

AAG AAG CGG CGG CGC GAG AGC GAG TGC AAG GCC GCC T GAGCGCGGCC         5815
Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala
    230                 235                 240

CCCACCCGGC GGCGGCCAGG GACCCCCGAG GCCCCCCTCT GCCTTTGAGC TTCTCCTCTG    5875

CTCCAACAGA CACCTTCCAC TCTGAGGTCT CACCTTCGCC TCTGCTGAAG TCTCCCCGCA    5935

GCCCTCTCCA CCCAGAGGTC TCCCTATACC GAGACCCACC ATCCTTCCAT CCTGAGGACC    5995

GCCCCAACCC TCGGAGCCCC CCACTCAGTA GGTCTGAAGG CCTCCATTTG TACCGAAACA    6055

CCCCGCTCAC GCTGACAGCC TCCTAGGCTC CCTGAGGTAC CTTTCCACCC AGACCCTCCT    6115

TCCCCACCCC ATAAGCCCTG AGACTCCCGC CTTTGACCTG ACGATCTTCC CCCTTCCCGC    6175

CTTCAGGTTC CTCCTAGGCG CTCAGAGGCC GCTCTGGGGG GTTGCCTCGA GTCCCCCCAC    6235

CCCTCCCCAC CCACCACCGC TCCCGCGGCA AGCCAGCCCG TGCAACGGAA GCCAGGCCAA    6295

CTGCCCCGCG TCTTCAGCTG TTTCGCATCC ACCGCCACCC CACTGAGAGC TGCTCCTTTG    6355

GGGGAATGTT TGGCAACCTT TGTGTTACAG ATTAAAAATT CAGCAATTCA GTACTGCGTC    6415

GAGGTCTTGG TTACTTTTTT GTTTGTTTGT TTTAGGCTTC TCTCCCAAGC TGAGCTTTTT    6475

TTTGTTTTGT TTTCGTTTTC CTTTTTTTTC TTTTTTTTGG GAGTGGCAAA CATGCTTCCC    6535

AAATCCCTAC AGGACTTCTC CTTATCCTCT GCCCCCACCT CCCTAACCCT GCTGGCAACA    6595

ACGTTCAGCC ACTGCTTGTC TTGCCCTTCA GTGTGGCTCC AAGAGGAAGA TCACCAGAAT    6655

CACTCAGGGA AGTTAAAAAA AAAAATACAG CTTCCTGGGC TACATCCCAG AGCTGTGGAA    6715

TCCAAAGGGA GAAGAGAAAG TGAATTTGCG ACAAGCGTCG GGATGATTCT GGCACTGGAC    6775

CCTCTGGCCT GAGAGGGGAA GAGGCCTTCC ATCTCACCTG GGCTGGTAGC TTGTCACATC    6835

TGCCTCCGAG TACAGCCTTA GGTCCATTTC CCAGATATCA GAGACAGTGC CAGGGAAGCC    6895

AGGTGACTGC ATCTTGCCTA GGCACAGAAG AGTAGGGTTG GAATGTGACG TTGTTAGCAT    6955

TTGGCAGGAC CAAAACCAGA GGCAAACGGA GGCAGTGGGA TGGAAAGGCA GTTGATTTTG    7015

ATGAAGGCTT GTTGGGAGTT CAGCTTTCTT TTGAAACTTA TAATCTATAC CCAGGCTAGA    7075
```

ACAGTCTTGT GTATACACCT TCATTCATGG AATAAACGTA CTTGCAATAA CTTTTTAGCC 7135

TCCCAGGGTA GCCTCACTTC CTAGCTGTGA CTTTTCCACC CTGGTTACTG GGAGGCAGCT 7195

TCCATTTCTC CCAGACTAGC TAGGCAGTGC GTCCAACTGA ACCGCAGCCA GAAACCTGTC 7255

TCCAGGGGTT ATTTTTACCT CTAACTAGGA CTAACTTATT TTAAAATCTT TCCTTGAGCC 7315

CAAGTGACAA CTGAAGAGAA AGGCTATTGC CTGGTGATTT TGCTCCACCA GTTGGTTCTC 7375

ACTGGTTTGA ATACTAACTT GAACTGTACT CATCGACACT GAAAGGGGAT GAGCAAACAG 7435

TGTCTCTAAA TCTCCTGATC CTGATCTCAA ATATCCCCCT AATTACAAGT TGCAACAAGG 7495

CAGCTATTAC ACGGGGACAC AGGATGGAGA GGATGGGTGC CAAACACCCA TCGTCTACTC 7555

TGCTGCCTCG GTTATGGTGA ATTCAGGACC ATCAAGGGAG GTGTGGACCT TTTTTTTCAG 7615

AAGGAGGCTG ACACTTCTTG TCAATTGCAT TGTGTTCTTA GTTTTGCTCT TCACAACCCT 7675

TGACCCCGTA GATGGGGGCT GAAGAGGCAC CCTGGCCGAC TCACTCTATT TCTGTTTTGG 7735

GAATGGGATG GATAAACTAT CCCATGGCCT CCAGAGCCAA AAAACCAAAA CGAAACAAAA 7795

CAAAAAACCC CAAAACAAAA AAGCAAAAAG CAAACAAGAA AAAAAAAAAA AGAGGAAATA 7855

ATAGGCAGAC AATTTACAGT TCATTGTAAG GGCAAAGATA TGCATATAGC ATGATGGTTA 7915

ACAGGTCAGG CTCAGGTAGA AAGGCCCATT TGAACCCCAG CTCTGCCACA CTCAGAAACT 7975

GTGTGACCCG AACAAGTCAC TTAACCTCTC TGAGCATAGG TAAAATAAGA TCATCATACC 8035

AGATTGTTTT GAAGATTAAA TCAAGTGTTA TTCACGAGAG GTGCACAGCA TAGCATGCAC 8095

AACAAATAAG GACCTGGTAA GTATCTAATT AATAACAATG GCTAAGATCC AAAAAACAGC 8155

TACCTACTAA TAAATAGATG GGGCTGCCTT GTAAGGCAGT GAGCATCATG CAACCAGGAT 8215

TCAAATGAAG GACAGTTGCT ACCTCTGAGG TTCCCGAGAA GGATTTCTCG ATCCATTGAG 8275

AGACTGAATG ACATGAACTC TGCGATCCCA TCTCTTGTGG GGAGGGAACC TAGAATGAAG 8335

GGAAGATTGT GGGCCATAAA GGCAGACATC TGGTTCCTGG GCACAGAACC ATATGTGTGC 8395

CACCAAAGCC ACCCACCGGA CCCCACTTGG CCCCTGGAGT CTATTTTTAC TCCTCTCATC 8455

TTACAAGATC TATTTTGTTA ATCTCCTTAT ATTTGCTGTT TTGACTTCCC AGCCAGCTTG 8515

CTAATCAGTT TGCCTATTTG ACTCACAGGG TTTGCATTTG TCACGGGGAC TGAAACACAC 8575

GCTTGTTTTG ATTTCTTTTT GTAAATTAGA AGCGTTGATG TAATGACTCT ACCTAGACAC 8635

AGCTGGTAAA GTGAGAATAA TGCTCAAGTT TGCACAGTTT AAACACAATG TAGACAATAA 8695

TTAGAAATGC TATCTTTAGA TGTTTAGGAT AAGCTTTTCT CAGAATTGCA CTGATTTTTT 8755

TTTTCTGAGT GGGGCTTTTT AGTGCATATA TACAGAAATA CTAAAAACGT AAGAAAATAG 8815

AGCAAATCAG TGAGTGCTTT GGTCAACTTG AAAGACTGCA GGAAATAAAC CAACTGATTT 8875

TAGATCTGCC TTTTTTTGAC TGAATGCATA AAATCTTTAC ATTCTCCATA TTTTTCATGA 8935

CTACCATATG ATCAAATAGT TTTAGGTGAC AGATTGCAAC TGATAAGTTG CTGCAATATG 8995

GCAGAAGTCA TGCTCAGCCT CCGCTTGCCC GGTGGTGAGG GTGGAATATG AAGCAAACAA 9055

TAAAGATAAT TCATCATCTC TATCAGGAAA ATTGCCACAT GTTTATTTCA GGTAACAAAA 9115

AAGATATAGT TATGATATAC AATGACCATA GAATCCAATA AAGCAACTTC TGCAAATGAA 9175

TAGAAGGTAC TTTTTCTTTA AATGAAACTA CAAAATAGCA GCTGGTTTTA AAAACAAAGC 9235

CAATTGTTTT AGATTTAATA GGCTACCACT GGCCTCTGCT AAGATCCCCA AATATATTCC 9295

TGAGCTCACA TAGATTCCAG AAAGTCAAAC TTTTCAATAT TATGCAAACT TTCCCTATGC 9355

ATCCAAAAAA TTCTCATTTA GTAAAGAGGT GATATGAAAT GTAAGGCAGC ATGTCCATAT 9415

CTATCATTTT AAATTGCCTT CATGCTGTAT CAACTGGTTT TGTTTTGGGA AGCAACCATA 9475

ATATTGAGAG ACGGGTCTTT CCTATTTTTT CTGCTACTCA TTTCTAACTA GATTCACTAC 9535

GGAGCTCCCA ATTGCATCTC TCTGATCTAC AAATTTTTCT CTCTTCAGGA AGACACCTGG 9595

AAAGAAGGGA CTACATTAAA GGAGTGTGTT GGGGGCAATG CTTTGGCCTT TTGACATCCT 9655

ATCTAGTCTG AAGGGACCCT CACTATTGCT AAGGAGGAGG AGTGTTTTAA ATGGAGGCTT 9715

CAGAATGAAA GCAGAGGAAG AAGGTACTCT CTTTTTCAAA AAGAAGGAGG GTACAGGCCG 9775

GGCGCAGCTG TCACGCCTGC AATCCCAGCA CTTTGGGAGG CCGAGGAAGG CAGATCACGA 9835

GGTTGGGAGT TTGAGCCAGC CTGGTCAACA TAGTGAAACC CCGTCTCTAC TAAAAATACA 9895

AAAATTAGCC AGCATGGTGG TGCATGCCTG TAGTCCCAGT TACTCGGGAG GCTGAGGCAG 9955

GAGAATCGCT TGAACTCGGG AAGTGGAGGT TGCAGTGAGC CGAGATCATG CCACTGCACT 10015

CCACCCTGGG TGACAGAGTG AGACTCTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGAAGTAGGG 10075

TACC 10079

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 240 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```
Met Leu Ala Leu Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser
 1               5                  10                  15

Asp Ala Trp Thr Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala
            20                  25                  30

Glu Trp Ile Arg Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu
        35                  40                  45

Val Met Gln Arg Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln
    50                  55                  60

Val Gln Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe
                85                  90                  95

Phe Ala Leu Glu Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala
            100                 105                 110

Ile His Val His Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr
        115                 120                 125

Gly Pro His Tyr Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly
    130                 135                 140

Asp Phe Gly Asn Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg
145                 150                 155                 160

Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg
                165                 170                 175

Ala Val Val Val His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn
            180                 185                 190

Gln Ala Ser Val Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys
        195                 200                 205

Val Val Gly Val Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu
    210                 215                 220

His Ser Glu Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala
225                 230                 235                 240
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

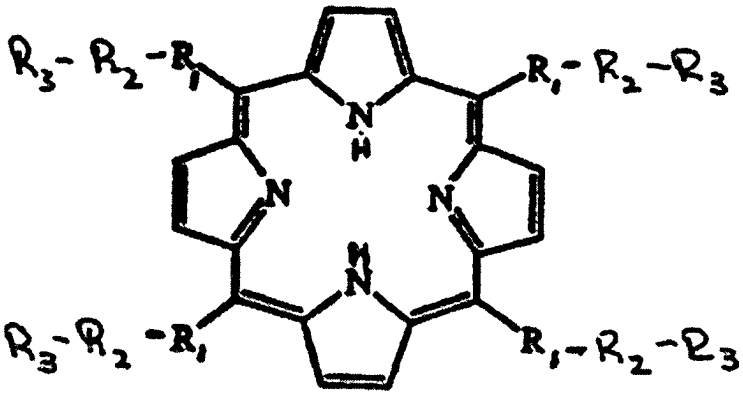
(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

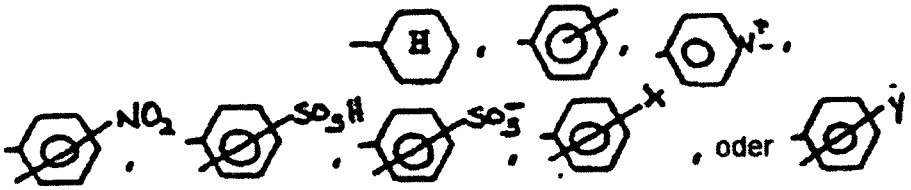
```
Arg Glu His Ser Glu Arg Lys Lys Gly Arg Arg Ala Ser Glu Cys Ala
1               5                  10                  15

Ala Ala
```

Patentansprüche

1. Verwendung eines Mimetikums von Superoxiddismutase mit der Formel



oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon,
worin
R_1 eine Bindung,



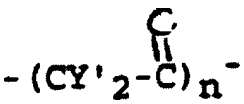
ist,
wobei X ein Halogen ist und Y eine Alkylgruppe ist und
wobei



eine Bindung an R_2 an irgendeiner Position bezeichnet und



eine Bindung an R_2 und den Substituenten an irgendeiner Position bezeichnet und
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2-CY'=CY')_n^-$, $-(CY'_2-CY'_2-CH=CH)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder



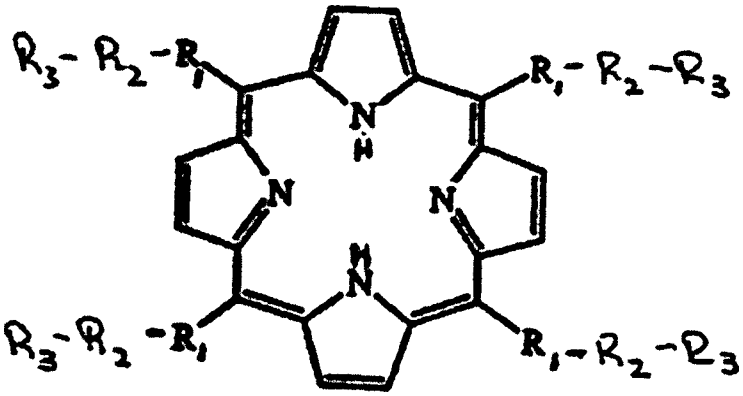
ist,
wobei Y' Wasserstoff oder eine Alkylgruppe ist und n 1 bis 8 ist und
R_3 -Y'', -OH, $-NH_2$, $-N'(Y'')_3$, -COOH, -COO-, $-SO_3H$, $-SO_3$-, $-CH_2-PO_3H_2$ oder $-CH_2-PO_3H$- ist, wobei Y'' eine Alkylgruppe ist,
komplexiert mit Mangan,
bei der Herstellung eines Medikaments zum Schutz von Zellen vor durch Superoxidradikal induzierter Toxizität in einer oder mehreren der folgenden Anwendungen:
1. dem Schutz gegen ischämische Reperfusionsverletzungen, die mit Myokardinfarkt, Schlaganfall, akutem Kopftrauma, Organreperfusion nach Transplantation, Darmischämie, Lungeninfarzierung, chirurgischer Okklusion des Blutstroms oder Weichgewebeverletzung einhergehen,

2. dem Schutz gegen Skelettreperfusionsverletzungen,
3. dem Schutz gegen Schädigung von Haut und Augen durch Sonnenstrahlung,
4. dem Schutz gegen Schädigung der Augen durch Glaukom oder Makuladegeneration,
5. dem Schutz gegen Knochenerkrankung,
6. dem Schutz gegen Bindegewebsstörungen, die mit Störungen der Kollagensynthese oder Degradation einhergehen,
7. der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems,
8. der Behandlung von Erkrankungen der Muskulatur,
9. der Behandlung von neurologischen Störungen,
10. der Behandlung von Arthritis, systemischem Bluthochdruck, Arteriosklerose, Ödem, septischem Schock, pulmonalem Hochdruck, Impotenz, Unfruchtbarkeit, Endometriose, vorzeitigen Gebärmutterkontraktionen, Gedächtnisstörungen, Mikrobeninfektionen und/oder Gicht,
11. der Behandlung von Entzündungen und
12. der Behandlung von chronischer Sinusitis und/oder Autoimmunerkrankungen.

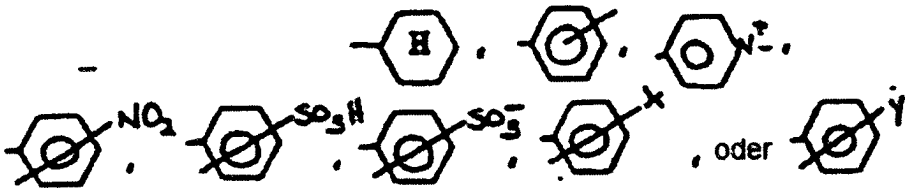
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zellen Säugerzellen sind.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 für die Behandlung von AIDS-Demenz, Schlaganfall, amyotropher Lateralsklerose (ALS), Parkinson'scher Krankheit, Huntington'scher Krankheit, Zwerchfellerkrankungen, einschließlich Atemermüdung bei Emphysem, Bronchitis und zystischer Fibrose, Herzermüdung bei kongestiver Herzinsuffizienz, Muskelschwächesyndromen, die mit Myopathien einhergehen, ALS oder multipler Sklerose, Alzheimer'sche Krankheit, Asthma, ARDS, Pneumonie oder rheumatoider Arthritis.

4. Verfahren zum Schutz von Pflanzenzellen vor durch Superoxidradikal induzierter Toxizität, bei dem man die Zellen mit einer nicht toxischen Menge, die ausreicht, um den Schutz zu bewirken, eines Mimetikums von Superoxiddismutase in Kontakt bringt mit der Formel



oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon,
worin
R_1 eine Bindung,



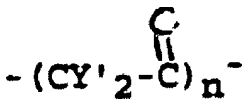
ist,
wobei X ein Halogen ist und Y eine Alkylgruppe ist und
wobei



eine Bindung an R_2 an irgendeiner Position bezeichnet und

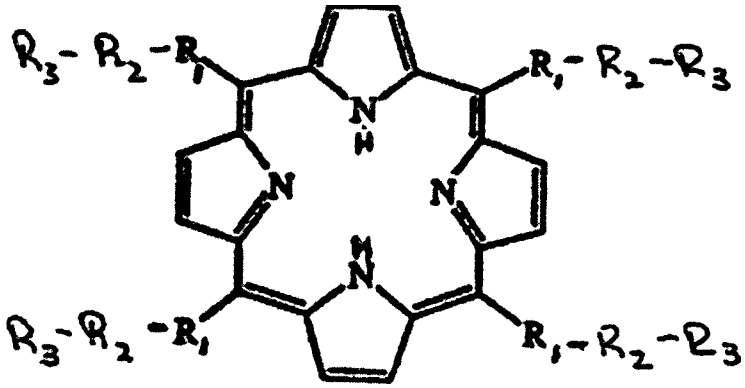


eine Bindung an R_2 und den Substituenten an irgendeiner Position bezeichnet und
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2-CY'=CY')_n^-$, $-(CY'_2-CY'_2-CH=CH)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder

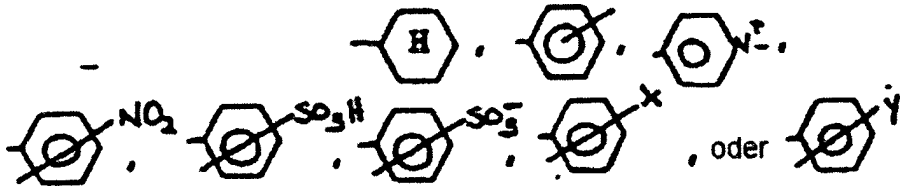


ist,
wobei Y' Wasserstoff oder eine Alkylgruppe ist und n 1 bis 8 ist und
R_3 -Y", -OH, $-NH_2$, $-N^+(Y")_3$, -COOH, -COO-, $-SO_3H$, $-SO_3$-, $-CH_2-PO_3H_2$ oder $-CH_2-PO_3H$- ist, wobei Y" eine Alkylgruppe ist,
komplexiert mit Mangan.

5. Verwendung eines Mimetikums von Superoxiddismutase mit der Formel



oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon,
worin



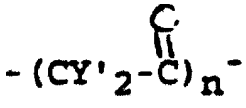
ist,
wobei X ein Halogen ist und Y eine Alkylgruppe ist und
wobei



eine Bindung an R_2 an irgendeiner Position bezeichnet und



eine Bindung an R_2 und den Substituenten an irgendeiner Position bezeichnet und
R_2 eine Bindung, $-(CY'_2)_n^-$, $-(CY'_2-CY'=CY')_n^-$, $-(CY'_2-CY'_2-CH=CH)_n^-$, $-(CY'=CY')_n^-$ oder



ist,
wobei Y' Wasserstoff oder eine Alkylgruppe ist und n 1 bis 8 ist und
R_3 -Y", -OH, $-NH_2$, $-N^+(Y")_3$, -COOH, -COO-, $-SO_3H$, $-SO_3$-, $-CH_2-PO_3H_2$ oder $-CH_2-PO_3H$- ist, wobei Y" eine Alkylgruppe ist,
komplexiert mit Mangan,
bei der Herstellung eines Medikaments zur Hemmung eines Schadens aufgrund von Oxidation einer Substanz

mit der anschließenden Bildung von O_2^- in einer oder mehreren der in Anspruch 1 definierten Anwendungen.

6. Verwendung eines Mimetikums von Superoxiddismutase, wie er in Anspruch 1 definiert ist, zur Erhöhung der Lagerungsüberlebensfähigkeit von transplantierten Herzen, Nieren, Haut und anderen Organen und Geweben.

Es folgen 35 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

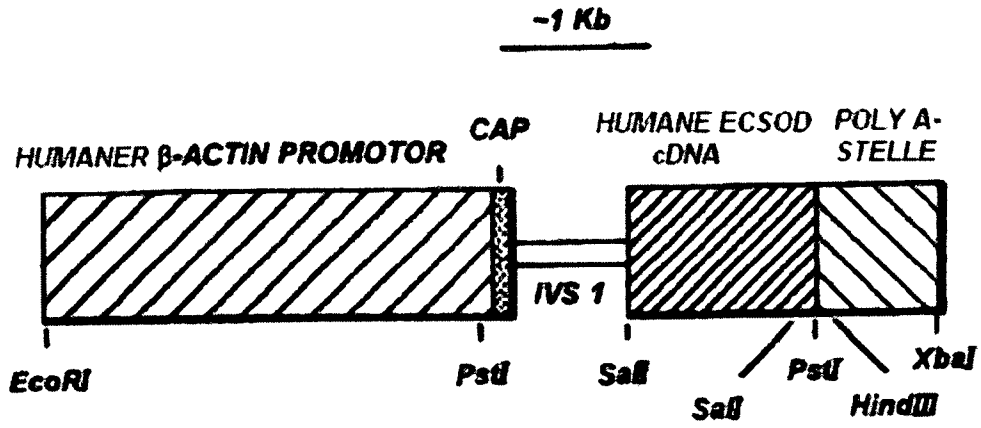


FIG. 1

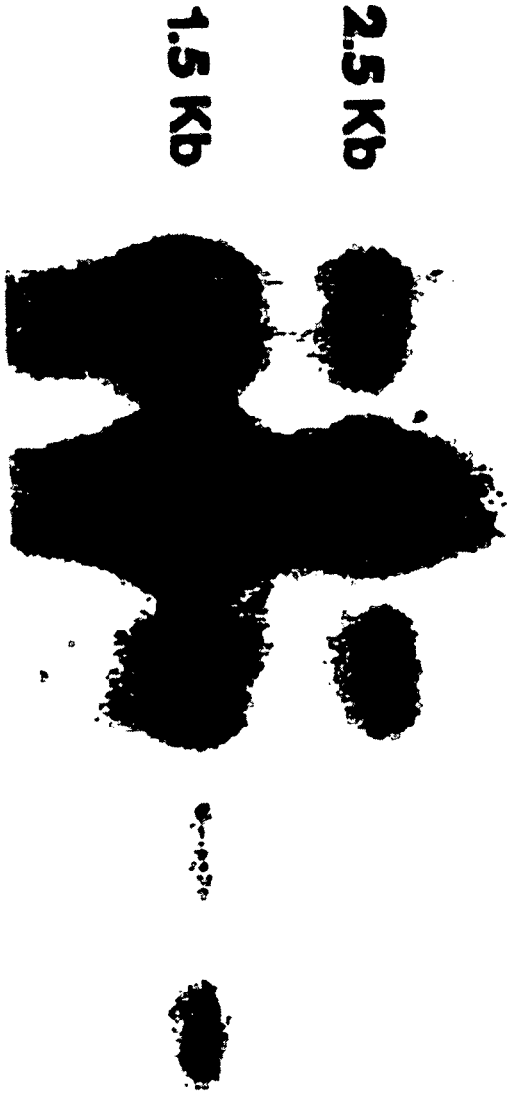


FIG. 2

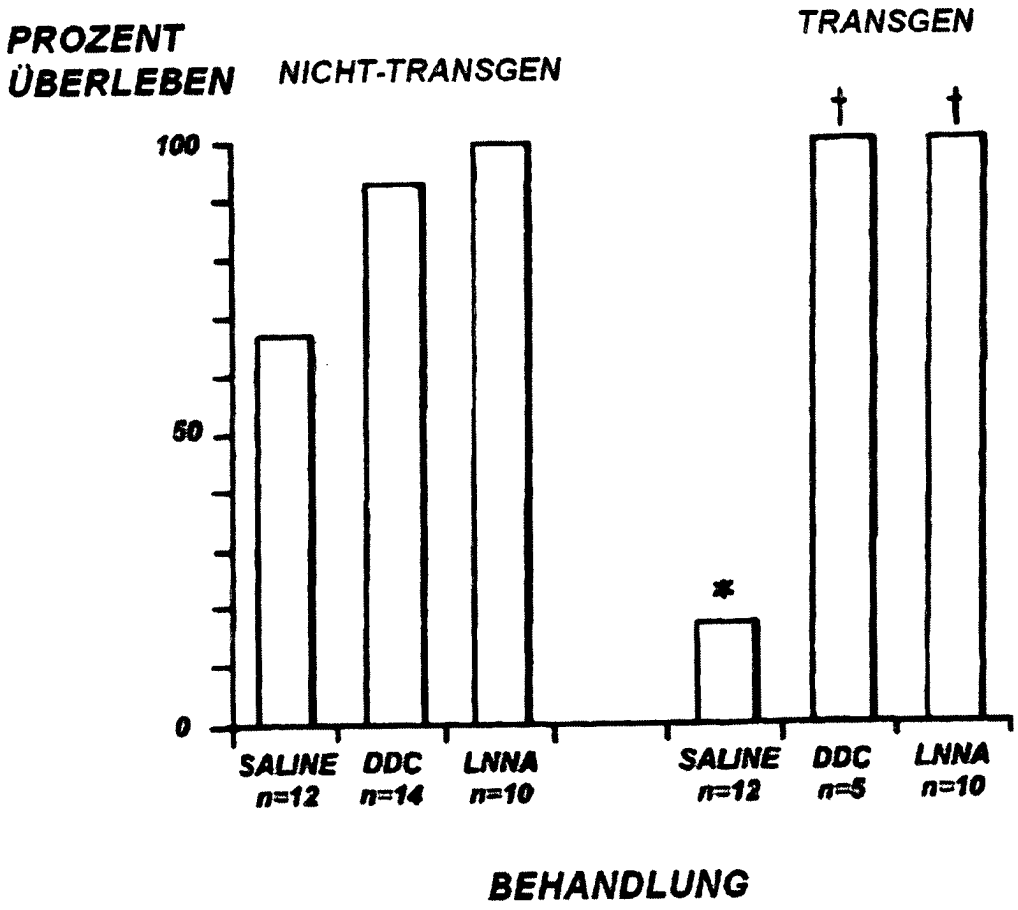

PROZENT ÜBERLEBEN
NICHT-TRANSGEN
TRANSGEN
100
50
0
*
†
†
SALINE n=12
DDC n=14
LNNA n=10
SALINE n=12
DDC n=5
LNNA n=10
BEHANDLUNG

FIG. 3

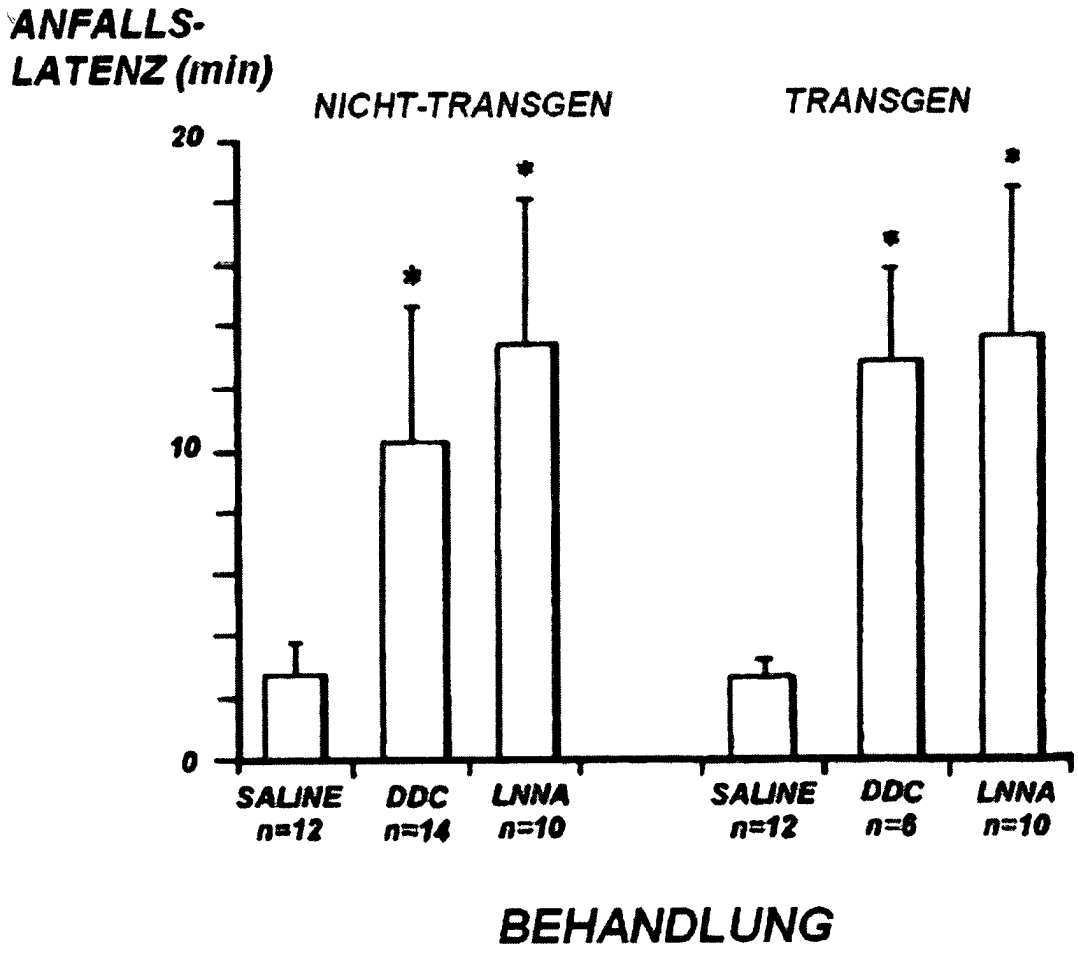

ANFALLS-
LATENZ (min)
NICHT-TRANSGEN
TRANSGEN
20
10
0
*
*
*
*
SALINE
n=12
DDC
n=14
LNNA
n=10
SALINE
n=12
DDC
n=6
LNNA
n=10
BEHANDLUNG

FIG. 4

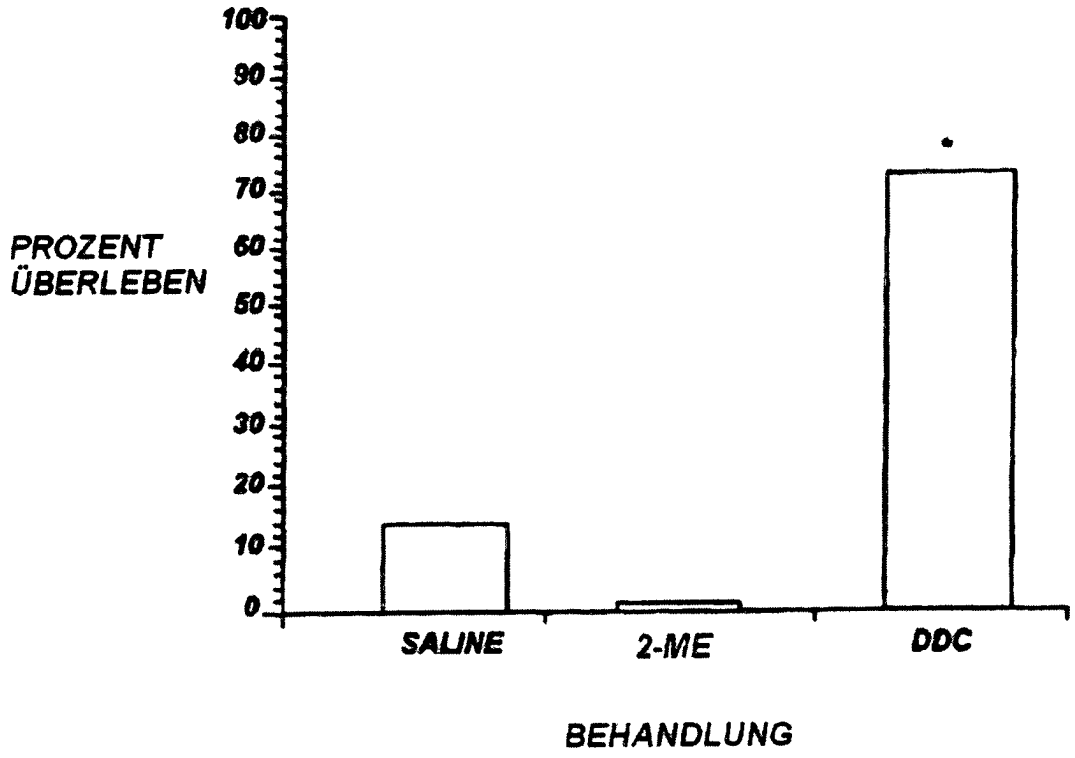

PROZENT ÜBERLEBEN
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
SALINE
2-ME
DDC
BEHANDLUNG

FIG. 5

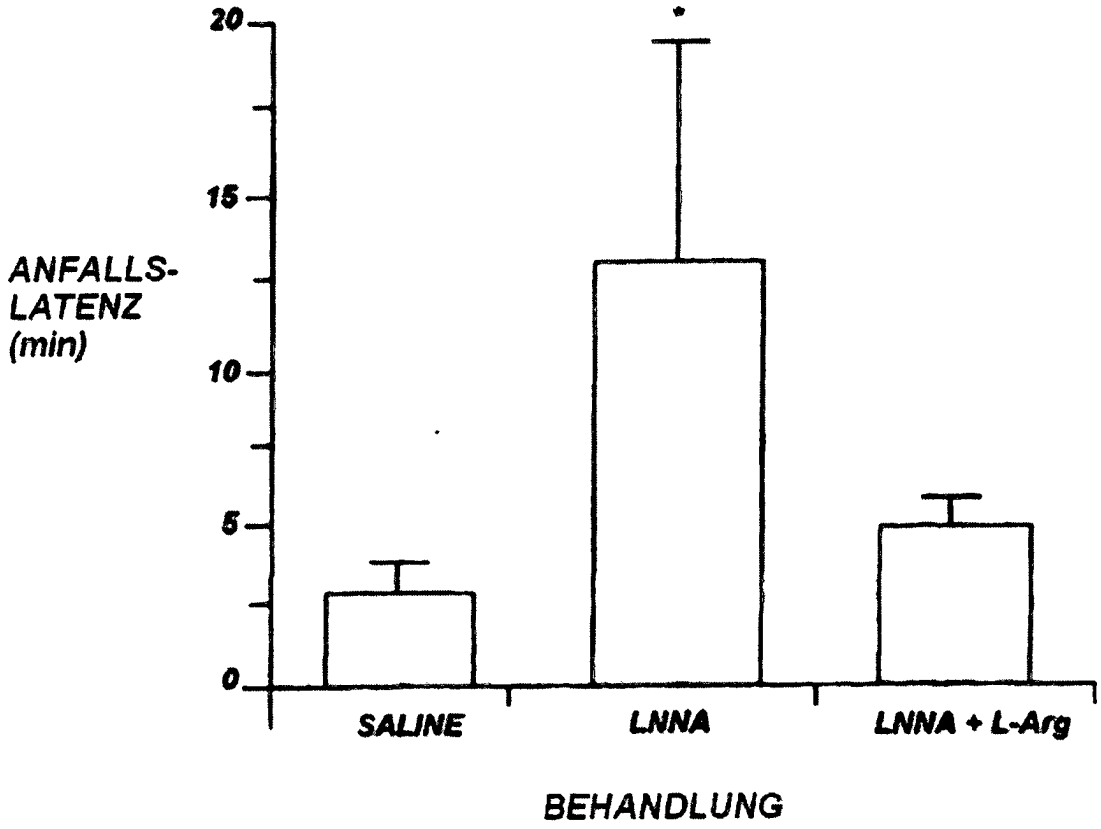

20
15
10
5
0
ANFALLS-
LATENZ
(min)
*
SALINE
LNNA
LNNA + L-Arg
BEHANDLUNG

FIG. 6

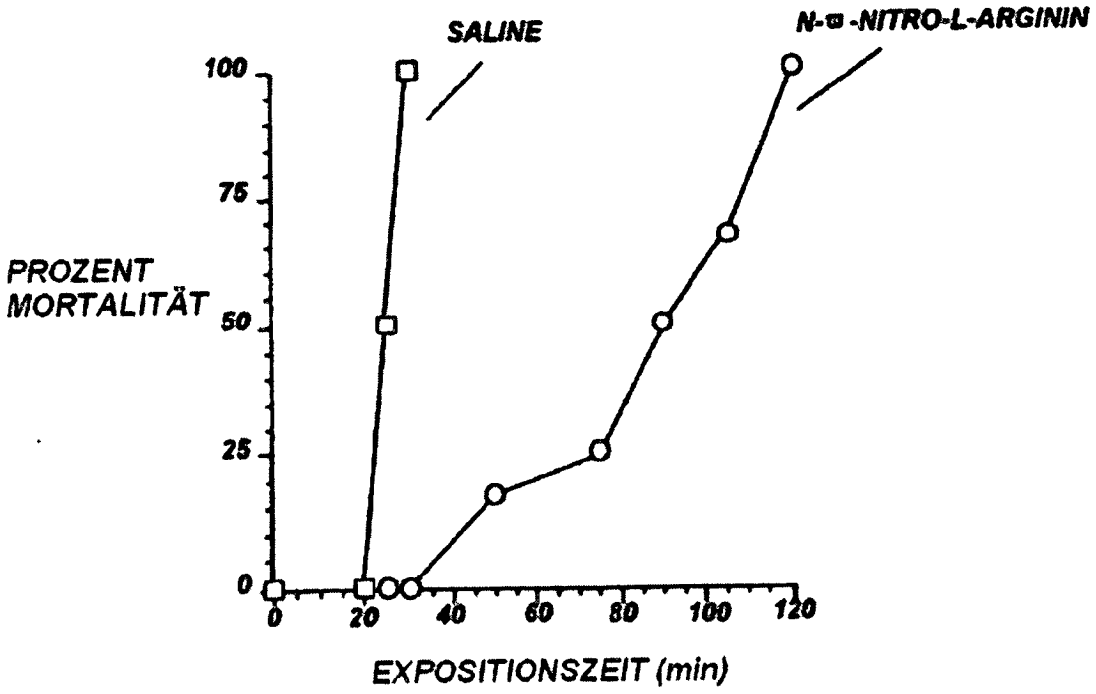

SALINE
N-ω-NITRO-L-ARGININ
100
75
50
25
0
PROZENT
MORTALITÄT
0
20
40
60
80
100
120
EXPOSITIONSZEIT (min)

FIG. 7

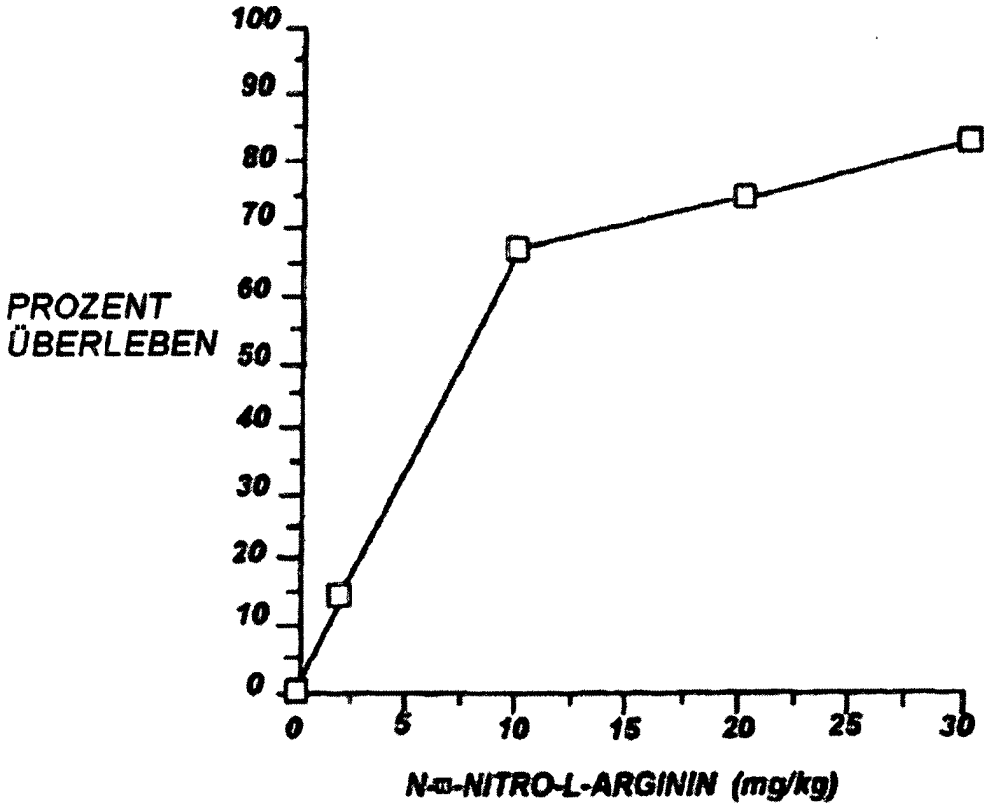

PROZENT
ÜBERLEBEN
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
N-ω-NITRO-L-ARGININ (mg/kg)

FIG. 8

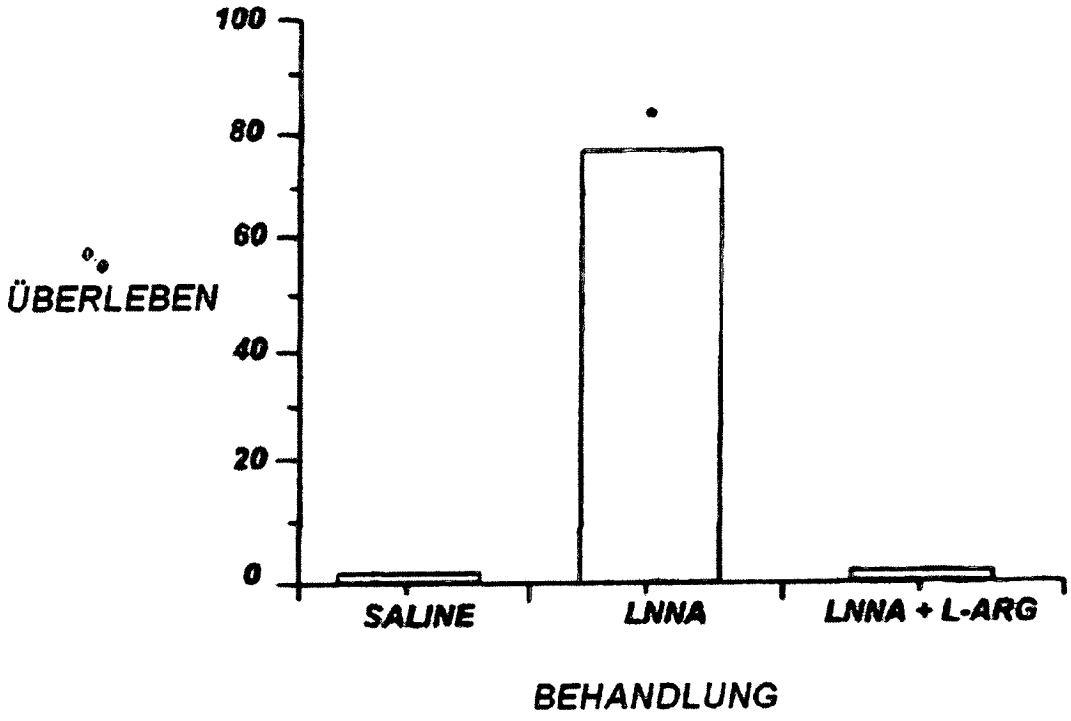


FIG. 9

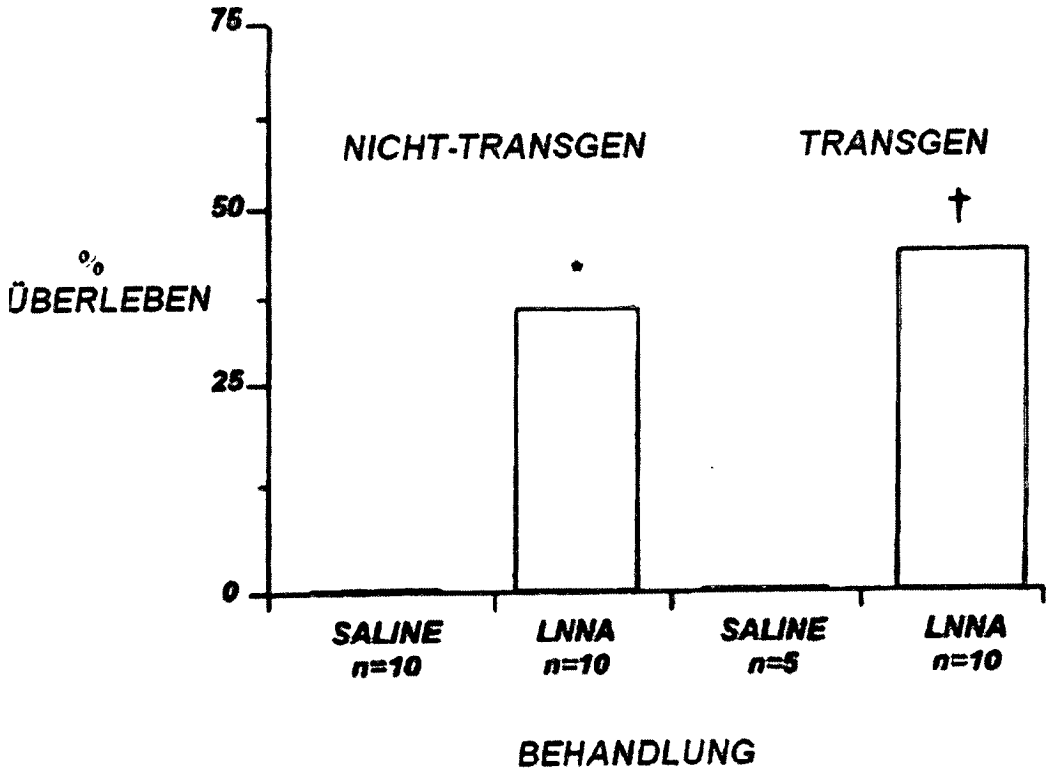

75
50
25
0
%
ÜBERLEBEN
NICHT-TRANSGEN
TRANSGEN
*
†
SALINE
n=10
LNNA
n=10
SALINE
n=5
LNNA
n=10
BEHANDLUNG

FIG. 10

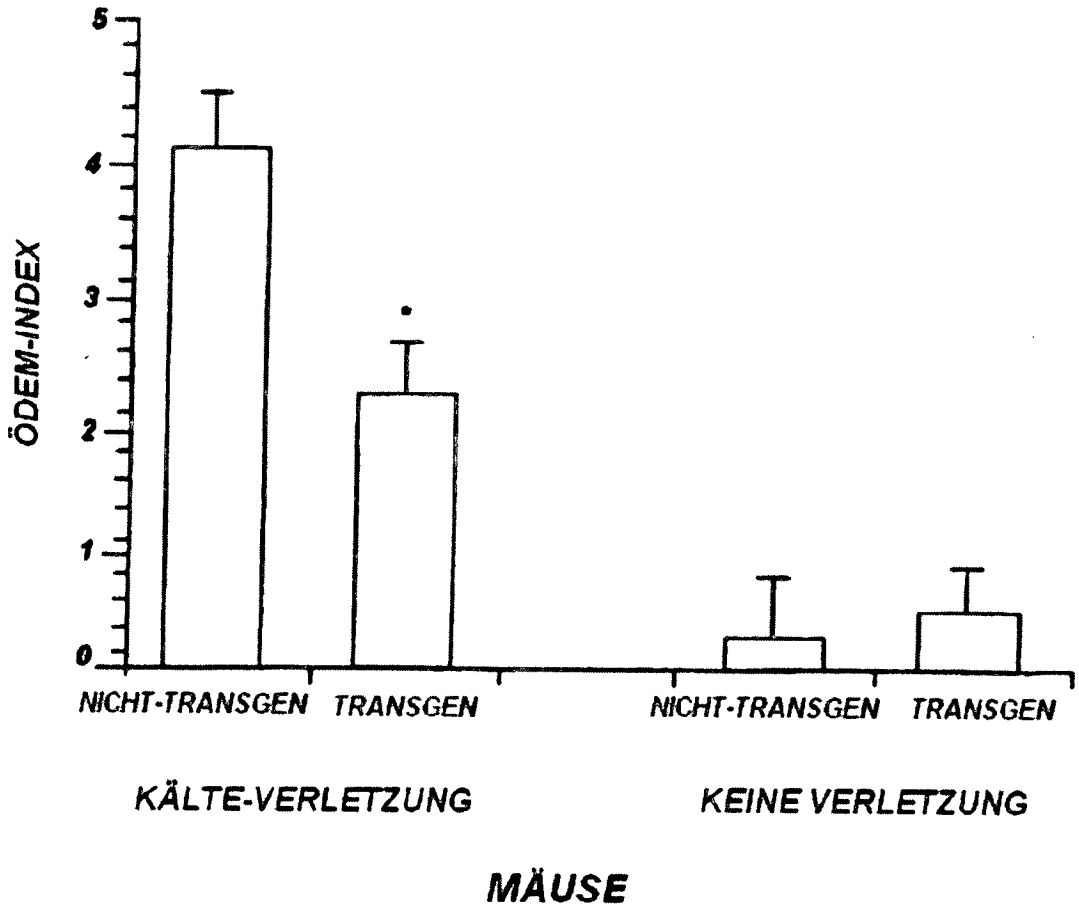

ÖDEM-INDEX
5
4
3
2
1
0
NICHT-TRANSGEN
TRANSGEN
NICHT-TRANSGEN
TRANSGEN
KÄLTE-VERLETZUNG
KEINE VERLETZUNG
MÄUSE

FIG. 11

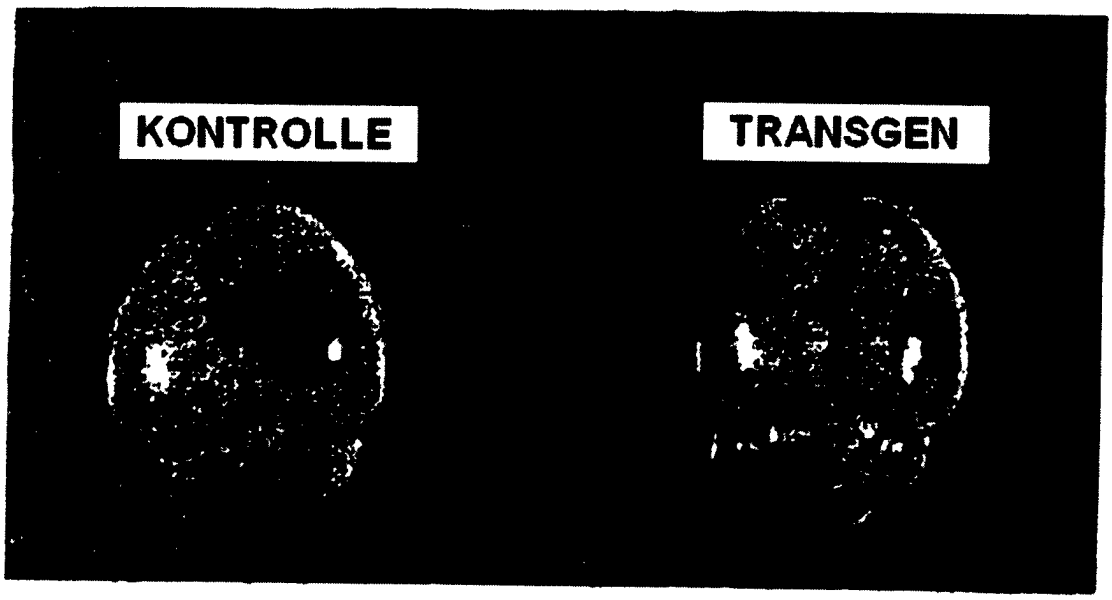


FIG. 12

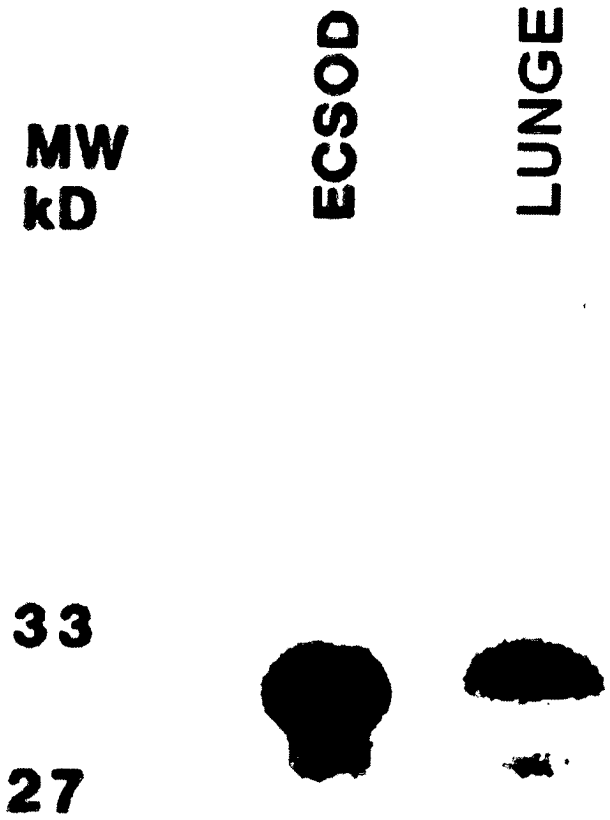


FIG. 13



FIG. 14A



FIG. 14B



FIG. 14C

FIG. 15A



FIG. 15B



FIG. 15C



FIG. 16A



FIG. 16B



FIG. 16C

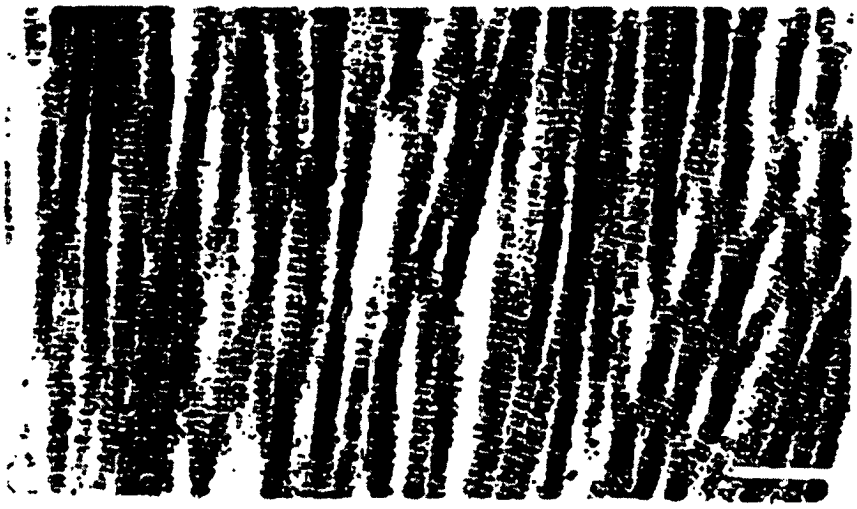


FIG. 17



FIG. 18A



FIG. 18B





FIG. 19

FIG. 20A

RESTRIKTIONSKARTE



FIG. 20B

SEQUENZIER-STRATEGIE

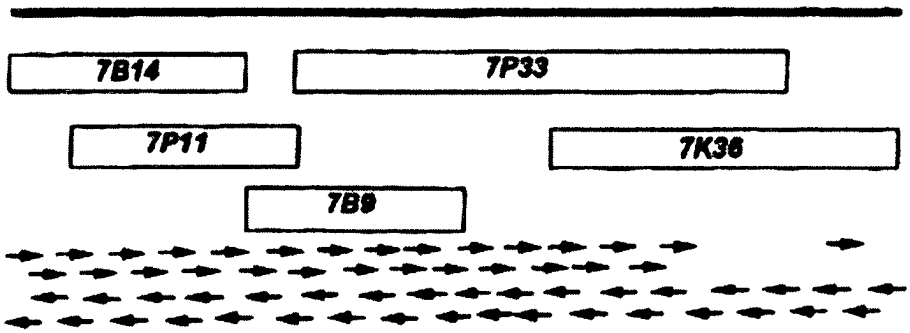


FIG. 20C GEN-STRUKTUR

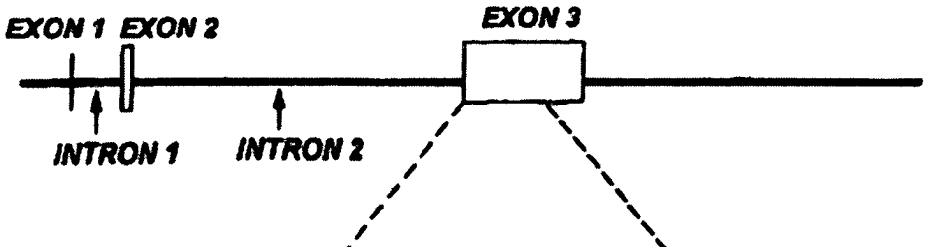


FIG. 20D

PROTEIN-STRUKTUR

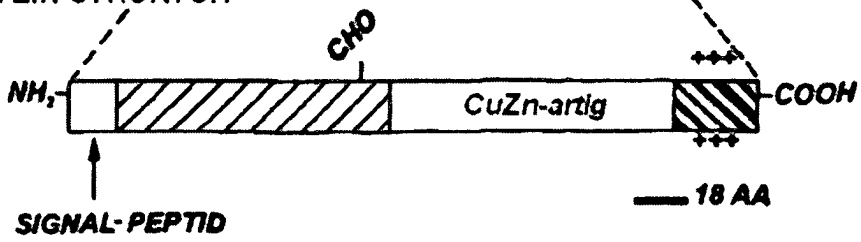


FIG. 21A



FIG. 21B

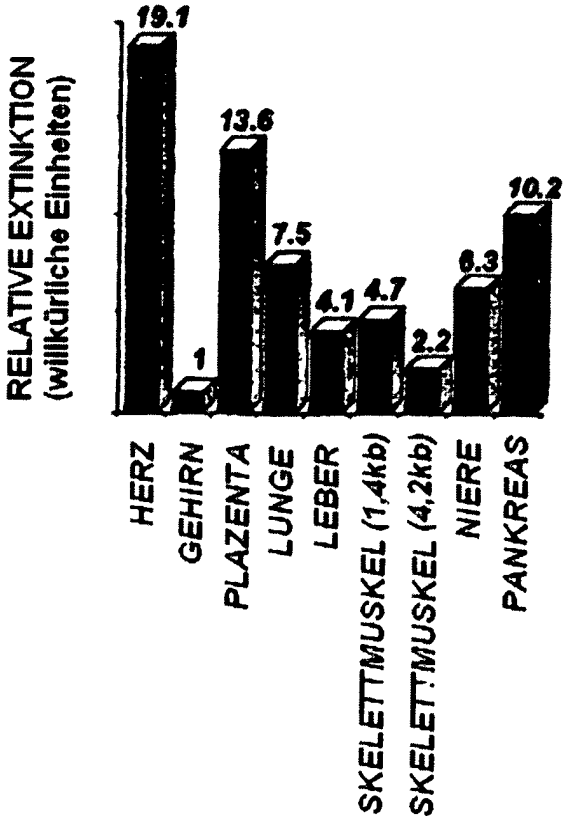


FIG. 22A

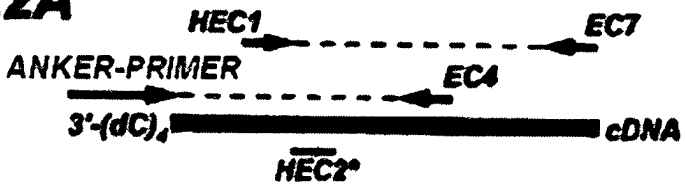


FIG. 22B

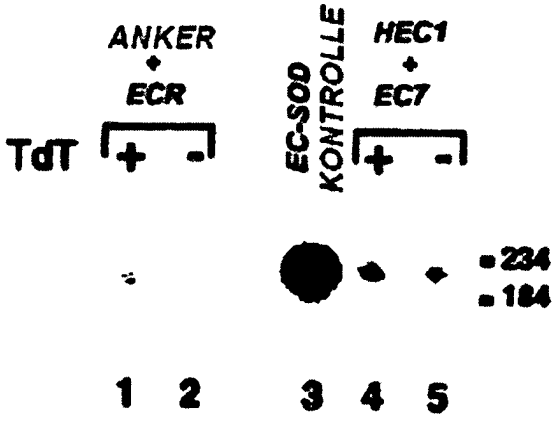


FIG. 23

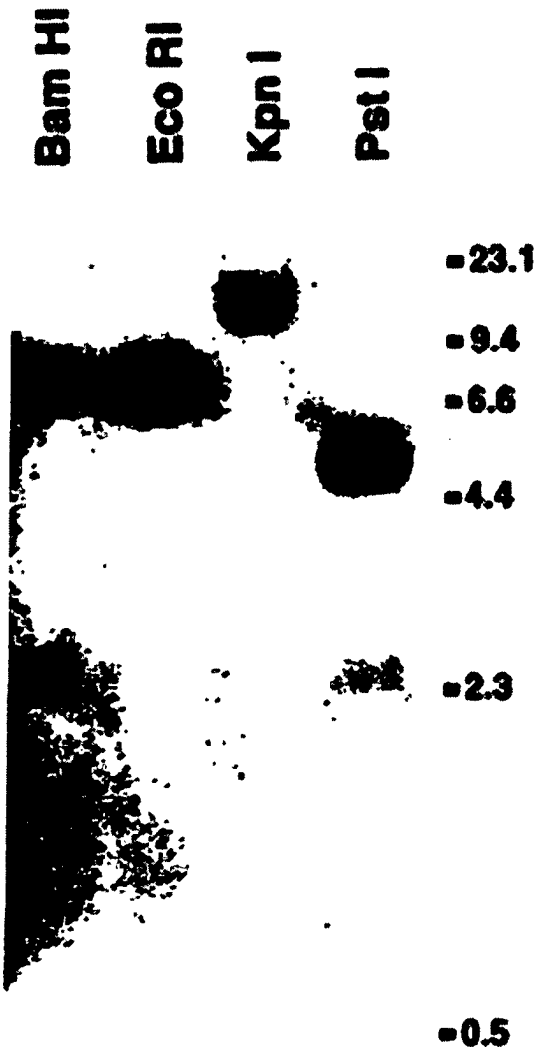


FIG. 24

GGATCCAGAG ATTTAGATTT TTTATAAGCT TTCCTGCCAC CGAAACGGGT GTTTGGGACC 60

TCACGAGGCC CTGTTCATTC TTCGTCGCTG CGCTCCCCAC TCTGTACTGG ATGCATTTAC 120

TGACGTTGTT GTCTCCGTCC CCAGAGTATG AACCCCCAAG GTGACTCATG CAGCTGTGGG 180

TGCCCGGCAT ACAGCATGGT GACTGGAATG GATGAGCACC CAATAAACAT TTGTTGCAGG 240

AATGCAGGAG GACGGGCAGG CCAGCAAGCA GGCTGCCTGG TTTTTCCCAC ATGGGCTTTT 300

CTGGGAAAGA AGAGCTTCTA TTTTTGGAAA GGGCTGCTAT GATTGAGAAA AGTTCATGGC 360

AGCAAAAAAA GGACAGACGT CGGGAGGGAA ACACTCCTAG TTCTCCCAGA CAACACATTT 420

TTTAAAAAGA CTCCTTCATC TCTTTAATAA TAACGGTAAC GACAATGACA ATGATGATTA 480

CTTATGAGTG CGGCTAGTGC CAGCCACTGT GTTGTCACTG GGCGAGTAAT GATCTCATTG 540

GATCTTCACG GTGGGCGTGC GGGGTGGACA GCCTCACACC CCCATTTTAC AGATGATGAA 600

AAGGAGGTGC AGGGAGTGGT GCAGCTGCTT CAGGCGTACA CAGATAGGAA GTGACAAGGC 660

TGGGACTCTG CAGCCTGAGT GTGTCATCAC GACCCACCCG CTGCTCTGCT CTCATAGGTA 720

TGACAGCACA GCTCTGGAGC AAATGCCATG CACATTTGCA AGGTGCCCAT TTCCATGCAG 780

CAAAAATAAG TCAATAAGTT ATTGACTTAG AGAAAAGCAA AGGGCCTCTC AATAAAGAGG 840

TCATTGTACA CCTCTCCAAA CAGGCGATTT TCTTTCTCAT TTTTATTCCC CTGCTGTGTG 900

CTGAAGGTCA CTGGCTACAA GCCGGTGAAG TCGCGGAATG GAATCCTTGG CCCGAAAACC 960

CAAAAATGGG AGGGGCAGAG GAGGTGGGGA CAGAGCGGGA GGAGGTGGAG GCGAAGCAAT 1020

TCTACAACCC GGGGAGGTCT GGCCTGCTTT TCCTCCCTGA ACTGGCCCAA TGACTGGCTC 1080

CCTCACGCTG ACCACTCCTC TGGGCTGGCC TCCTGCACTC GCGCTAACAG CCCAGGCTCC 1140

AGGGACAGCC TGCGTTCCTG GGCTGGCTGG GTGCAGCTCT CTTTTCAGGA GAGAAAGCTC 1200

TCTTGGAGGA GCTGGAAAGG TGGGTGCTAA GTTGAGGTTC ATTTTGTTCT TCTCGGAGTG 1260

TGCTTATTGA GTCTGAAGCT GGGTTGGGGC AACGGGCCTC TTCTTGGGAA CAAATTGGAT 1320

CATCTTCTTG GGAAGGAAAT GTACTTTCCC TGGCTGCTCT GAGGGGTTAG TGGGGAGGTG 1380

GAGTGAGCGG GGAGGAAGGC AAGGAGGGGA GGAAGAAACC GTTCCTCCTG TGGATCTGCA 1440

AAGACCAGTC CAAGAGGATT TTAGTGTTAG GAAAAGGAAT CTGGAGTGAC GAGAAAGGGG 1500

GCCTTTCTAG ATGTTGCATG GCTTTGGTGT CGGGAGCCAC TTATGGGACA GCAGGTACTC 1560

TAAAAAGCCA CCTCCTTAGG AAAGCAGAGA GGCCCTGGCC AGCTCAGGCT CCCAGCAAGA 1620

GCTCCTTCTA GGAGACAGCT GAGGGATGAA ACACACCCAA GGCTCAAGAG GGGCAGGTTC 1680

TTCCCAGATA CAGACCCAGG AAGGAGATAA AGGCTTGGTG CCTCTATTTG GTTCAGGATA 1740

AGGGCCCCTG TCCTCTTTCT CTGATAACAC TGTCCTCTTT CTCTGATAAC ACCGTCCTCC 1800

CTTCCAGATC CACGTACAAA CGAGGCCCTT AAAAAGGCAC TTGGTCATTC ACAGCTCAAA 1860

CTGAGCAAGA GGCTGTGGGA GAAGAATCAA GTTGGTCCCG AGGGGAAGAG GTGTCAAAGG 1920

CTTAAGAAAC AAGAAGTCAG AGTTTACCTG GGTTTGAGGG AGAATTTTCT TTCCCCCTTT 1980

FIG. 24 (Fortsetz.)

TCCTCCTCCT CCTCCTTCTT CTCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGACATG 2040
GTCTCATTCT GTCACCCAGC ACCCAGGCTG GAATGTAGTG GCACGATCAC TATCACGGCT 2100
CACTACAGCC TCTACCTCCC GGGCTCAAGT GATCCTCCTA CCTCAGCCTC CTGAGTAACT 2160
GGGACTACAG GCACATGCCA CCACACCCAG CTATTTTTTT TTTTGCTAGA GATGGGGGTC 2220
TCTACCAGGT TGGTCTCATA CTCTTGTACT CAAATGATTC TCCTGTCTCA TCCTCCCAAA 2280
GGGTGGGATT ACAGGCATAA GCCACCATGC CTGGCTCTTC TTTTGGTTTC AGAGAAAAAC 2340
ATCTCCTTAA AATGTTTATT TCCCAAGGAT TCTTGAAAAA GAAAGCTCAC TGACACACCC 2400
AAAACAATCT GGTTTTGCTC TGTGCTTTTA GGGAGAACTT TCTAAGCAGC AGAGCCCTTC 2460
TGAGTGGCAG GGCTGTCTTA GGAGGAAGGT GTCTTTTGAT GATGGGGAAC TTCATGTCCA 2520
GGTCTGGCAG GAGAGTTACC CCACTTTCCT GCCTACTCCC TGGGGCTTTG GGGTAGTAGT 2580
ACCACATTGG GCCATGTCAT TTAGGTGAGT CCTTCAACAT CACTTTCTCT GCTTCTCCCT 2640
CTTTCTGGAT CCTCCTTCTT GGAGCCTTTC AAGGGGACCT CCTCTCACAG TGTCCATAGC 2700
ATCTCTTAGC TAATGGTCCT TAAAATCTCT ACCAGCAGCT TCTCTCTGAT AGCTAAGAGC 2760
TGCCATTTAC TGGGAACTTT CTATGTACTG GGCTCTGTGC TAAGTGCCCT AGATGAGAGA 2820
TGTGCAGTGT GGTGCCTAAA CCTTGGGCTT GGAGCAGACA CACACTTTCA AATCCTGCCT 2880
TCAGCTCCTT AGTGAACATG TCACCTTGGG CGGGACACAC GCCTCTCTGT GCCTCAGTTT 2940
CCTACACTTT AGAATGGGGA TAACACTGAA TAATGTTCTT GTGAGGATGC AGCGAATTAA 3000
CCCACGCACA GTACTTATAA TAGTGTCTGG CGCCTGTGTT CGATAAGTTT TAGCAATTCT 3060
AATCATCTCT TTTAAGCCTC GCAGCAAGCC TCTAAGGTAA GTCTGTATTA GTATCCCTAT 3120
TTACAGATGA GAAAACTGAG GTTCACAGGG GATGAGACAG TGTACAGTCT GCAGTCCAGC 3180
AATTACTCTG CTACTCAGCA ATAAAAATAG TAACAGCTAA CCCTTAGACT AAGTGGCAGA 3240
GTCAGGCTTT AGATTCATGA GGTGAGTTCT GGAATCCATC CCTTTAATAA CCACACTAAA 3300
TTGCCTTTCT GAAATGGTTA TATAAAGCAT ATCTACCCAA TCTTGGAGTT TTTTAAATGG 3360
CACCTAGTTT GGTGCTGGAA ATGCAGTTGA CCTTCAAAGC AATTCTTTGG AGGCAGCATC 3420
AATCCCTCTG GAAATACCTC GGTGGCATGG CTGGCCTTAT TCTACAGGTA AGGAACTTGA 3480
AGCTAAGCAT CAGTAACCCC GTGAAGTCAC AGTTAGTATA GGTTGGAATT GGGATTCAAA 3540
TCTGTACCTG ACTTTATAAT TCCTAGCTGG GCCCCAGAAT CTTTGATAGA GGTGTCTTCT 3600
TTCTTTTCTT TTCTTTCTTT CCTCTTTCTT TCCCTTCCTT CCTCTCTCTC TGTCTTTCTT 3660
CTCTCCTTTC TTTCTCACAG AATCAAAATC TCTTGGGGTG GGGCCTGGGC ATCTGATTTT 3720
TAAAAACCAG ACATCTGATG TGCAGTCAAC ACTGAGAACC CCTGCCAGCT TCATCTCCTC 3780
TTCTAAGTGC CAGACCCAAG TTTCCAACTG TCTGCCCACC TGTCTCCCCA CCTGGGCACC 3840
CGCCAGCGTC TCACCCTCAG GAGACTCCAG CTGAACTAAT CCTCTCTCCC TGCTTTTCCA 3900
GAACAGGTCC CACCCTCCCT CCACTCAGTC TCTCCTGCTG GGAACCCTGG TCATCTGCAC 3960

FIG. 24 (Fortsetz.)

```
TGTGCCTTCA TCTTCCATCC TGCCAGTGCT GCCCGGTGTG TCTCTTAAAC CCATGCCTCC    4020
TCTGTGTGCA CCACCTGCAC TTTGGTAAAA GCCTTCATTT CCTGCTTGGG TTACTACAAC    4080
GCCCCCTAAC TCATCTCACT GTCTCTATTT CTGCTTCTCT GTCTCTCCCT AGGCTACTCC    4140
CATTCTTCCT CCCCTTTCCT CTTCATCCCA AAGTCCAACC CATATCCTTT TACCAGTAGG    4200
ACTTAAGGAA CTAAAGACTA TCTCATCACC CACTTTTCTT CTTAAAAACT TCCACTGCAC    4260
TGCCTGCTGA GATGGCCTTC CTACCCAACT TGGCTGGAAA ACTCCTACCC ATCTTGTGGA    4320
ACCCAGTTCA AAAGTCACCA CCTCTGAGAA GCCTTCCCTG AGGCTCCTAG GGAGATGGGT    4380
ACTGCCTCCT CTGTCCTTCT CCAGCACAGG CCCCATCTTC AATCACAGGA TTGTGCTGGA    4440
ATGATTGGAT GCCAAGTCTG TCCCTCACTG AACTCCTTAT GCAAAATCCA TATTATATGT    4500
TTCCTTTTGC CAGGTGTGGG CCCAGGTGCT GGGGATACCG ATGAATAAAA CTGAGTTTCT    4560
GTCTTCAAGA AGCTCCAAGT CTACTGAGTG TAGCAGAGAA CAGGGAGAAG GCACTTCAGG    4620
GAGAAGGGGT AGCACATGCA AAGCCCCAGA AGGCAGGGAC AGAAGCCTTA GGGATGTCTG    4680
TGGGGGAGGA TGGAGGAAGA GGGTAACAGG AGACCAGGTG GGGAGATGAG GGAGGTGGTC    4740
TGGAAGGGCC ATGAGACACC CCTCACGCTC CCTGAGACCC CCTCCACGCT ATAGAGATGG    4800
GACTGGAGAG GACGATGATC ATTTGTGACT CAGATCCCTG TGGGTTTCTT CAGATTGGGT    4860
CTCACCCATC TTTACAGCCA CAGCACCTAA CACAGTGCCC GGCACACAGC AGGCCCTAGA    4920
CAAACGTTTG CCACATGAAG TCATGCCACT GGCCAGGAAG CCCACTGGGG ACTGGGGGGT    4980
TGGTTCTGCG ATAATGGGGT CCCTGAGATT CTATGTTTCA CGTGACTAAG CCTCACTCTG    5040
CCCCCACCTC CGCGGGGGCG TCCCGCAGGT GCCCGACTCC AGCC ATG CTG GCG CTA      5096
                                                  Met Leu Ala Leu
                                                    1

CTG TGT TCC TGC CTG CTC CTG GCA GCC GGT GCC TCG GAC GCC TGG ACG      5144
Leu Cys Ser Cys Leu Leu Leu Ala Ala Gly Ala Ser Asp Ala Trp Thr
  5                  10                  15                  20

GGC GAG GAC TCG GCG GAG CCC AAC TCT GAC TCG GCG GAG TGG ATC CGA      5192
Gly Glu Asp Ser Ala Glu Pro Asn Ser Asp Ser Ala Glu Trp Ile Arg
                 25                  30                  35

GAC ATG TAC GCC AAG GTC ACG GAG ATC TGG CAG GAG GTC ATG CAG CGG      5240
Asp Met Tyr Ala Lys Val Thr Glu Ile Trp Gln Glu Val Met Gln Arg
             40                  45                  50

CGG GAC GAC GAC GGC ACG CTC CAC GCC GCC TGC CAG GTG CAG CCG TCG      5288
Arg Asp Asp Asp Gly Thr Leu His Ala Ala Cys Gln Val Gln Pro Ser
         55                  60                  65

GCC ACG CTG GAC GCC GCG CAG CCC CGG GTG ACC GGC GTC GTC CTC TTC      5336
Ala Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val Thr Gly Val Val Leu Phe
     70                  75                  80

CGG CAG CTT GCG CCC CGC GCC AAG CTC GAC GCC TTC TTC GCC CTG GAG      5384
Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu Asp Ala Phe Phe Ala Leu Glu
 85                  90                  95                  100

GGC TTC CCG ACC GAG CCG AAC AGC TCC AGC CGC GCC ATC CAC GTG CAC      5432
```

FIG. 24 (Fortsetz.)

```
Gly Phe Pro Thr Glu Pro Asn Ser Ser Ser Arg Ala Ile His Val His
                105                     110                 115

CAG TTC GGG GAC CTG AGC CAG GGC TGC GAG TCC ACC GGG CCC CAC TAC      5480
Gln Phe Gly Asp Leu Ser Gln Gly Cys Glu Ser Thr Gly Pro His Tyr
            120                 125                 130

AAC CCG CTG GCC GTG CCG CAC CCG CAG CAC CCG GGC GAC TTC GGC AAC      5528
Asn Pro Leu Ala Val Pro His Pro Gln His Pro Gly Asp Phe Gly Asn
        135                 140                 145

TTC GCG GTC CGC GAC GGC AGC CTC TGG AGG TAC CGC GCC GGC CTG GCC      5576
Phe Ala Val Arg Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala
    150                 155                 160

GCC TCG CTC GCG GGC CCG CAC TCC ATC GTG GGC CGG GCC GTG GTC GTC      5624
Ala Ser Leu Ala Gly Pro His Ser Ile Val Gly Arg Ala Val Val Val
165                 170                 175                 180

CAC GCT GGC GAG GAC GAC CTG GGC CGC GGC GGC AAC CAG GCC AGC GTG      5672
His Ala Gly Glu Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly Asn Gln Ala Ser Val
                185                 190                 195

GAG AAC GGG AAC GCG GGC CGG CGG CTG GCC TGC TGC GTG GTG GGC GTG      5720
Glu Asn Gly Asn Ala Gly Arg Arg Leu Ala Cys Cys Val Val Gly Val
            200                 205                 210

TGC GGG CCC GGG CTC TGG GAG CGC CAG GCG CGG GAG CAC TCA GAG CGC      5768
Cys Gly Pro Gly Leu Trp Glu Arg Gln Ala Arg Glu His Ser Glu Arg
        215                 220                 225

AAG AAG CGG CGG CGC GAG AGC GAG TGC AAG GCC GCC T GAGCGCGGCC         5815
Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Glu Cys Lys Ala Ala
    230                 235                 240

CCCACCCGGC GGCGGCCAGG GACCCCCGAG GCCCCCCTCT GCCTTTGAGC TTCTCCTCTG    5875

CTCCAACAGA CACCTTCCAC TCTGAGGTCT CACCTTCGCC TCTGCTGAAG TCTCCCCGCA    5935

GCCCTCTCCA CCCAGAGGTC TCCCTATACC GAGACCCACC ATCCTTCCAT CCTGAGGACC    5995

GCCCCAACCC TCGGAGCCCC CCACTCAGTA GGTCTGAAGG CCTCCATTTG TACCGAAACA    6055

CCCCGCTCAC GCTGACAGCC TCCTAGGCTC CCTGAGGTAC CTTTCCACCC AGACCCTCCT    6115

TCCCCACCCC ATAAGCCCTG AGACTCCCGC CTTTGACCTG ACGATCTTCC CCCTTCCCGC    6175

CTTCAGGTTC CTCCTAGGCG CTCAGAGGCC GCTCTGGGGG GTTGCCTCGA GTCCCCCCAC    6235

CCCTCCCCAC CCACCACCGC TCCCGCGGCA AGCCAGCCCG TGCAACGGAA GCCAGGCCAA    6295

CTGCCCCGCG TCTTCAGCTG TTTCGCATCC ACCGCCACCC CACTGAGAGC TGCTCCTTTG    6355

GGGGAATGTT TGGCAACCTT TGTGTTACAG ATTAAAAATT CAGCAATTCA GTACTGCGTC    6415

GAGGTCTTGG TTACTTTTTT GTTTGTTTGT TTTAGGCTTC TCTCCCAAGC TGAGCTTTTT    6475

TTTGTTTTGT TTTCGTTTTC CTTTTTTTTC TTTTTTTTGG GAGTGGCAAA CATGCTTCCC    6535

AAATCCCTAC AGGACTTCTC CTTATCCTCT GCCCCCACCT CCCTAACCCT GCTGGCAACA    6595

ACGTTCAGCC ACTGCTTGTC TTGCCCTTCA GTGTGGCTCC AAGAGGAAGA TCACCAGAAT    6655

CACTCAGGGA AGTTAAAAAA AAAAATACAG CTTCCTGGGC TACATCCCAG AGCTGTGGAA    6715
```

FIG. 24 (Fortsetz.)

TCCAAAGGGA GAAGAGAAAG TGAATTTGCG ACAAGCGTCG GGATGATTCT GGCACTGGAC 6775
CCTCTGGCCT GAGAGGGGAA GAGGCCTTCC ATCTCACCTG GGCTGGTAGC TTGTCACATC 6835
TGCCTCCGAG TACAGCCTTA GGTCCATTTC CCAGATATCA GAGACAGTGC CAGGGAAGCC 6895
AGGTGACTGC ATCTTGCCTA GGCACAGAAG AGTAGGGTTG GAATGTGACG TTGTTAGCAT 6955
TTGGCAGGAC CAAAACCAGA GGCAAACGGA GGCAGTGGGA TGGAAAGGCA GTTGATTTTG 7015
ATGAAGGCTT GTTGGGAGTT CAGCTTTCTT TTGAAACTTA TAATCTATAC CCAGGCTAGA 7075
ACAGTCTTGT GTATACACCT TCATTCATGG AATAAACGTA CTTGCAATAA CTTTTTAGCC 7135
TCCCAGGGTA GCCTCACTTC CTAGCTGTGA CTTTTCCACC CTGGTTACTG GGAGGCAGCT 7195
TCCATTTCTC CCAGACTAGC TAGGCAGTGC GTCCAACTGA ACCGCAGCCA GAAACCTGTC 7255
TCCAGGGGTT ATTTTTACCT CTAACTAGGA CTAACTTATT TTAAAATCTT TCCTTGAGCC 7315
CAAGTGACAA CTGAAGAGAA AGGCTATTGC CTGGTGATTT TGCTCCACCA GTTGGTTCTC 7375
ACTGGTTTGA ATACTAACTT GAACTGTACT CATCGACACT GAAAGGGGAT GAGCAAACAG 7435
TGTCTCTAAA TCTCCTGATC CTGATCTCAA ATATCCCCCT AATTACAAGT TGCAACAAGG 7495
CAGCTATTAC ACGGGGACAC AGGATGGAGA GGATGGGTGC CAAACACCCA TCGTCTACTC 7555
TGCTGCCTCG GTTATGGTGA ATTCAGGACC ATCAAGGCAG GTGTGGACCT TTTTTTTCAG 7615
AAGGAGGCTG ACACTTCTTG TCAATTGCAT TGTGTTCTTA GTTTTGCTCT TCACAACCCT 7675
TGACCCCGTA GATGGGGGCT GAAGAGGCAC CCTGGCCGAC TCACTCTATT TCTGTTTTGG 7735
GAATGGGATG GATAAACTAT CCCATGGCCT CCAGAGCCAA AAAACCAAAA CGAAACAAAA 7795
CAAAAAACCC CAAAACAAAA AAGCAAAAAG CAAACAAGAA AAAAAAAAAA AGAGGAAATA 7855
ATAGGCAGAC AATTTACAGT TCATTGTAAG GGCAAAGATA TGCATATAGC ATGATGGTTA 7915
ACAGGTCAGG CTCAGGTAGA AAGGCCCATT TGAACCCCAG CTCTGCCACA CTCAGAAACT 7975
GTGTGACCCG AACAAGTCAC TTAACCTCTC TGAGCATAGG TAAAATAAGA TCATCATACC 8035
AGATTGTTTT GAAGATTAAA TCAAGTGTTA TTCACGAGAG GTGCACAGCA TAGCATGCAC 8095
AACAAATAAG GACCTGGTAA GTATCTAATT AATAACAATG GCTAAGATCC AAAAAACAGC 8155
TACCTACTAA TAAATAGATG GGGCTGCCTT GTAAGGCAGT GAGCATCATG CAACCAGGAT 8215
TCAAATGAAG GACAGTTGCT ACCTCTGAGG TTCCCGAGAA GGATTTCTCG ATCCATTGAG 8275
AGACTGAATG ACATGAACTC TGCGATCCCA TCTCTTGTGG GGAGGGAACC TAGAATGAAG 8335
GGAAGATTGT GGGCCATAAA GGCAGACATC TGGTTCCTGG GCACAGAACC ATATGTGTGC 8395
CACCAAAGCC ACCCACCGGA CCCCACTTGG CCCCTGGAGT CTATTTTTAC TCCTCTCATC 8455
TTACAAGATC TATTTTGTTA ATCTCCTTAT ATTTGCTGTT TTGACTTCCC AGCCAGCTTG 8515
CTAATCAGTT TGCCTATTTG ACTCACAGGG TTTGCATTTG TCACGGGGAC TGAAACACAC 8575
GCTTGTTTTG ATTTCTTTTT GTAAATTAGA AGCGTTGATG TAATGACTCT ACCTAGACAC 8635
AGCTGGTAAA GTGAGAATAA TGCTCAAGTT TGCACAGTTT AAACACAATG TAGACAATAA 8695

FIG. 24 (Fortsetz.)

TTAGAAATGC TATCTTTAGA TGTTTAGGAT AAGCTTTTCT CAGAATTGCA CTGATTTTTT 8755
TTTTCTGAGT GGGGCTTTTT AGTGCATATA TACAGAAATA CTAAAAACGT AAGAAAATAG 8815
AGCAAATCAG TGAGTGCTTT GGTCAACTTG AAAGACTGCA GGAAATAAAC CAACTGATTT 8875
TAGATCTGCC TTTTTTTGAC TGAATGCATA AAATCTTTAC ATTCTCCATA TTTTTCATGA 8935
CTACCATATG ATCAAATAGT TTTAGGTGAC AGATTGCAAC TGATAAGTTG CTGCAATATG 8995
GCAGAAGTCA TGCTCAGCCT CCGCTTGCCC GGTGGTGAGG GTGGAATATG AAGCAAACAA 9055
TAAAGATAAT TCATCATCTC TATCAGGAAA ATTGCCACAT GTTTATTTCA GGTAACAAAA 9115
AAGATATAGT TATGATATAC AATGACCATA GAATCCAATA AAGCAACTTC TGCAAATGAA 9175
TAGAAGGTAC TTTTTCTTTA AATGAAACTA CAAAATAGCA GCTGGTTTTA AAAACAAAGC 9235
CAATTGTTTT AGATTTAATA GGCTACCACT GGCCTCTGCT AAGATCCCCA AATATATTCC 9295
TGAGCTCACA TAGATTCCAG AAAGTCAAAC TTTTCAATAT TATGCAAACT TTCCCTATGC 9355
ATCCAAAAAA TTCTCATTTA GTAAAGAGGT GATATGAAAT GTAAGGCAGC ATGTCCATAT 9415
CTATCATTTT AAATTGCCTT CATGCTGTAT CAACTGGTTT TGTTTTGGGA AGCAACCATA 9475
ATATTGAGAG ACGGGTCTTT CCTATTTTTT CTGCTACTCA TTTCTAACTA GATTCACTAC 9535
GGAGCTCCCA ATTGCATCTC TCTGATCTAC AAATTTTTCT CTCTTCAGGA AGACACCTGG 9595
AAAGAAGGGA CTACATTAAA GGAGTGTGTT GGGGGCAATG CTTTGGCCTT TTGACATCCT 9655
ATCTAGTCTG AAGGGACCCT CACTATTGCT AAGGAGGAGG AGTGTTTTAA ATGGAGGCTT 9715
CAGAATGAAA GCAGAGGAAG AAGGTACTCT CTTTTTCAAA AAGAAGGAGG GTACAGGCCG 9775
GGCGCAGCTG TCACGCCTGC AATCCCAGCA CTTTGGGAGG CCGAGGAAGG CAGATCACGA 9835
GGTTGGGAGT TTGAGCCAGC CTGGTCAACA TAGTGAAACC CCGTCTCTAC TAAAAATACA 9895
AAAATTAGCC AGCATGGTGG TGCATGCCTG TAGTCCCAGT TACTCGGGAG GCTGAGGCAG 9955
GAGAATCGCT TGAACTCGGG AAGTGGAGGT TGCAGTGAGC CGAGATCATG CCACTGCACT 10015
CCACCCTGGG TGACAGAGTG AGACTCTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGAAGTAGGG 10075
TACC 10079

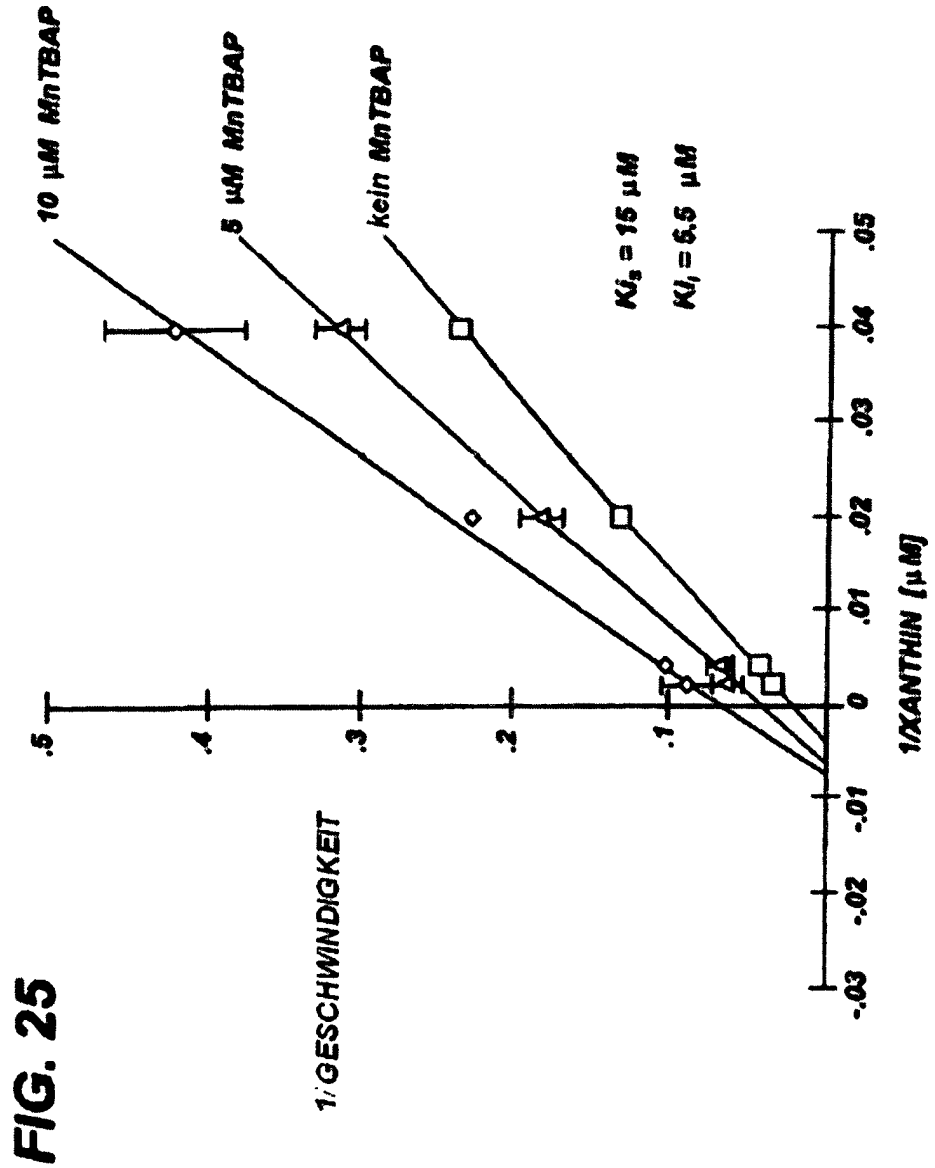

10 µM MnTBAP
5 µM MnTBAP
kein MnTBAP
K_{i_s} = 15 µM
K_{i_i} = 6.5 µM
1/GESCHWINDIGKEIT
1/XANTHIN [µM]
.5
.4
.3
.2
.1
0
-.01
-.02
-.03
.01
.02
.03
.04
.05

FIG. 25

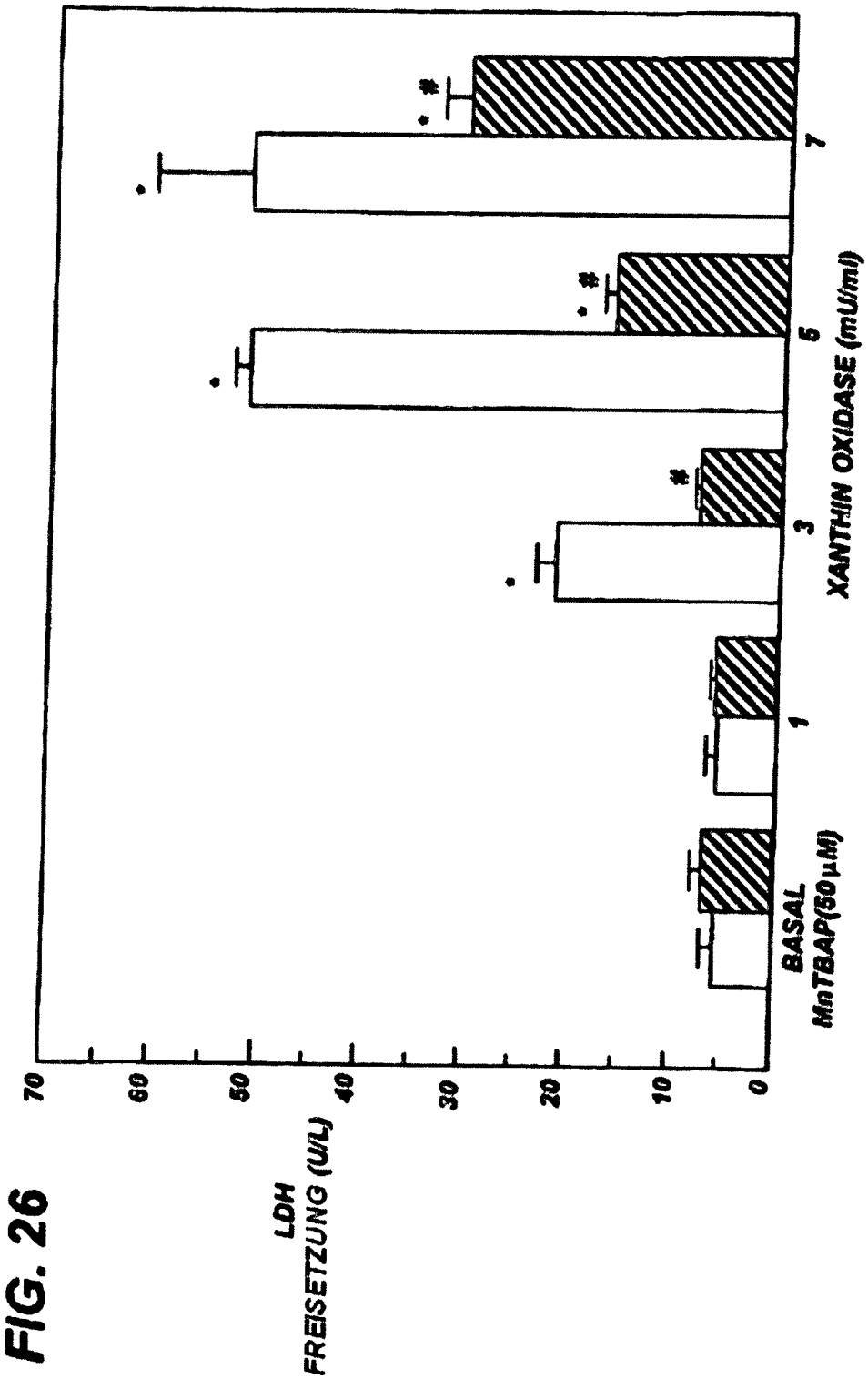
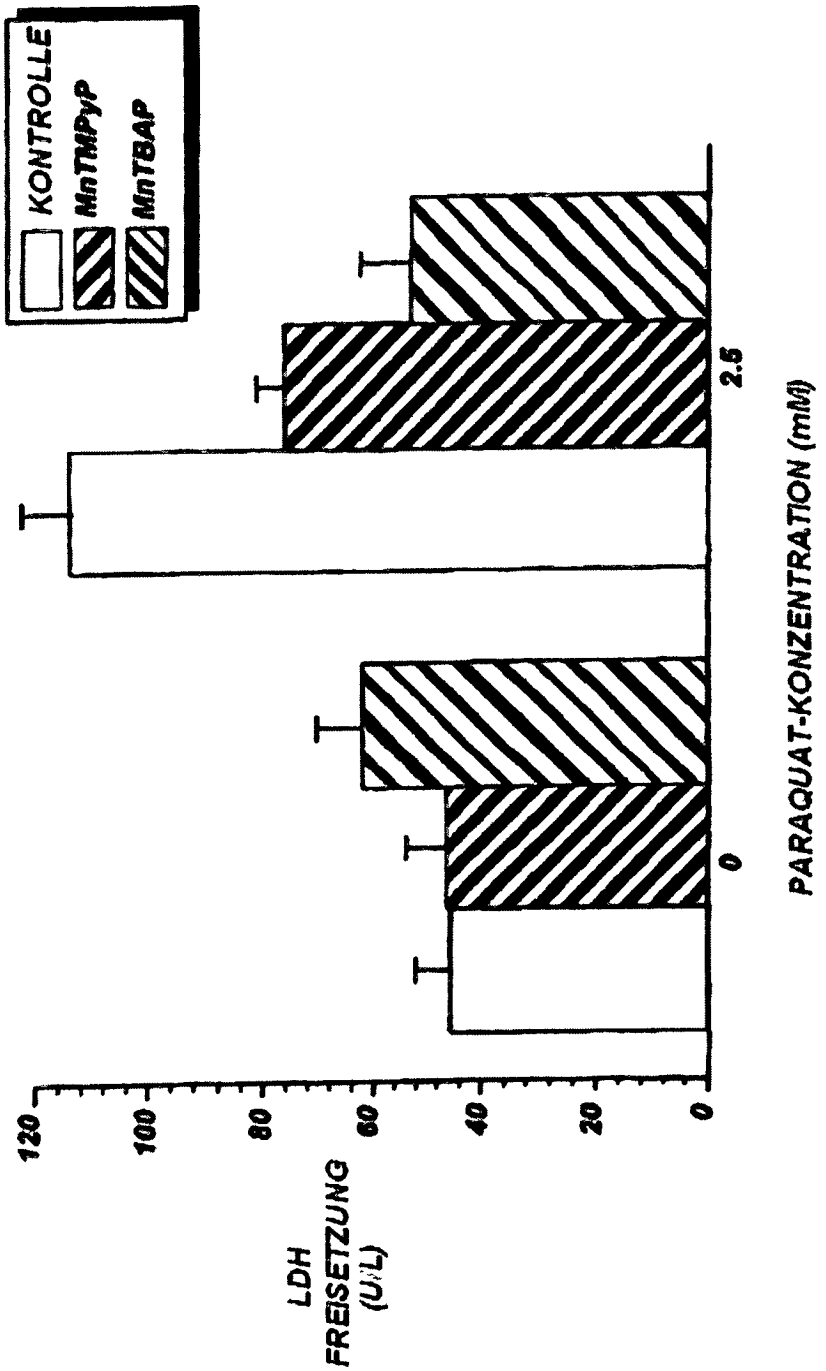

LDH
FREISETZUNG (U/L)
70
60
50
40
30
20
10
0
BASAL
MnTBAP(50 µM)
1
3
5
7
XANTHIN OXIDASE (mU/ml)

FIG. 26

FIG. 27


KONTROLLE
MnTMPyP
MnTBAP
LDH FREISETZUNG (U/L)
120
100
80
60
40
20
0
0
2.5
PARAQUAT-KONZENTRATION (mM)

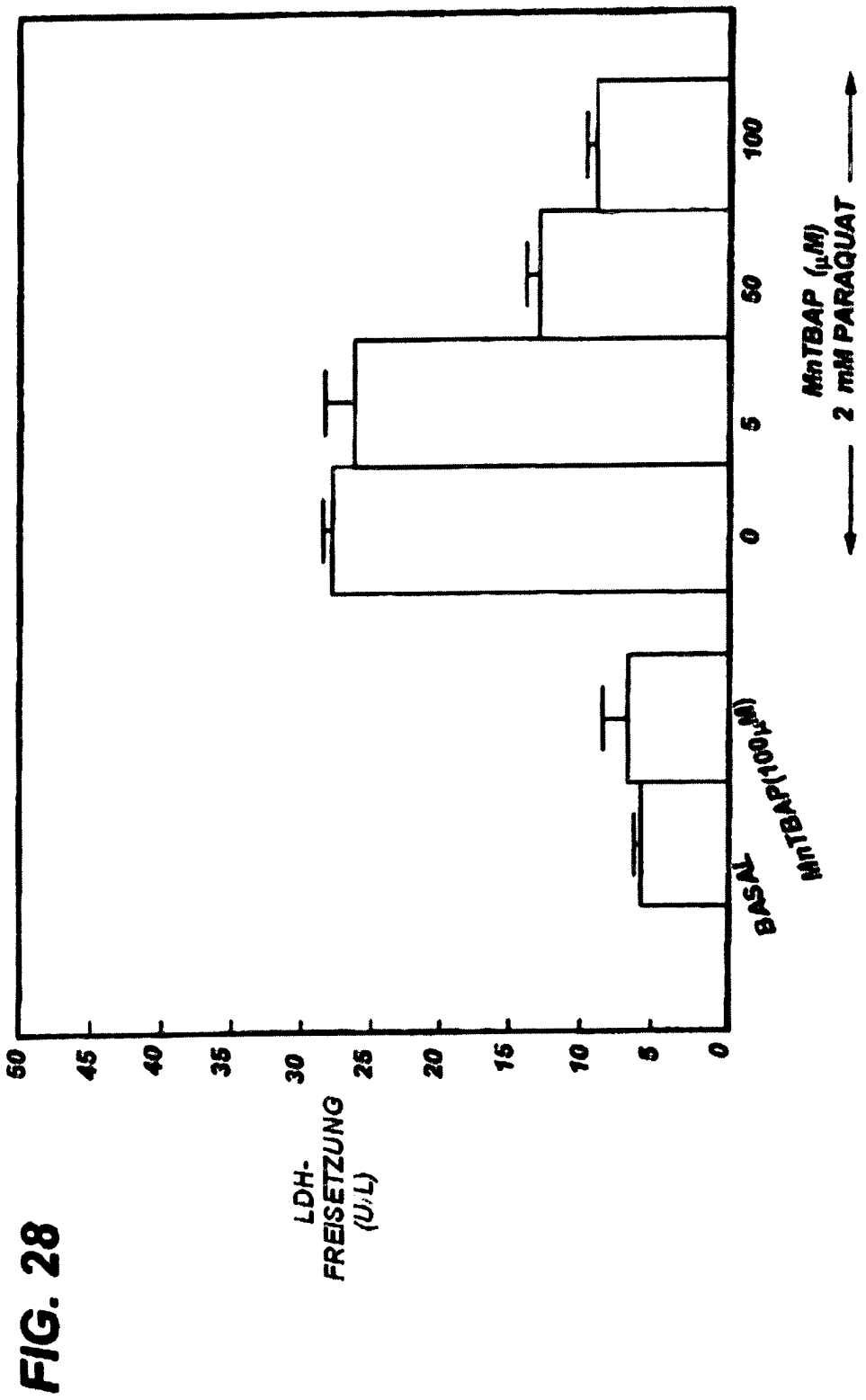

LDH-FREISETZUNG (U/L)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
BASAL
MnTBAP(100μM)
0
5
50
100
MnTBAP (μM)
2 mM PARAQUAT

FIG. 28

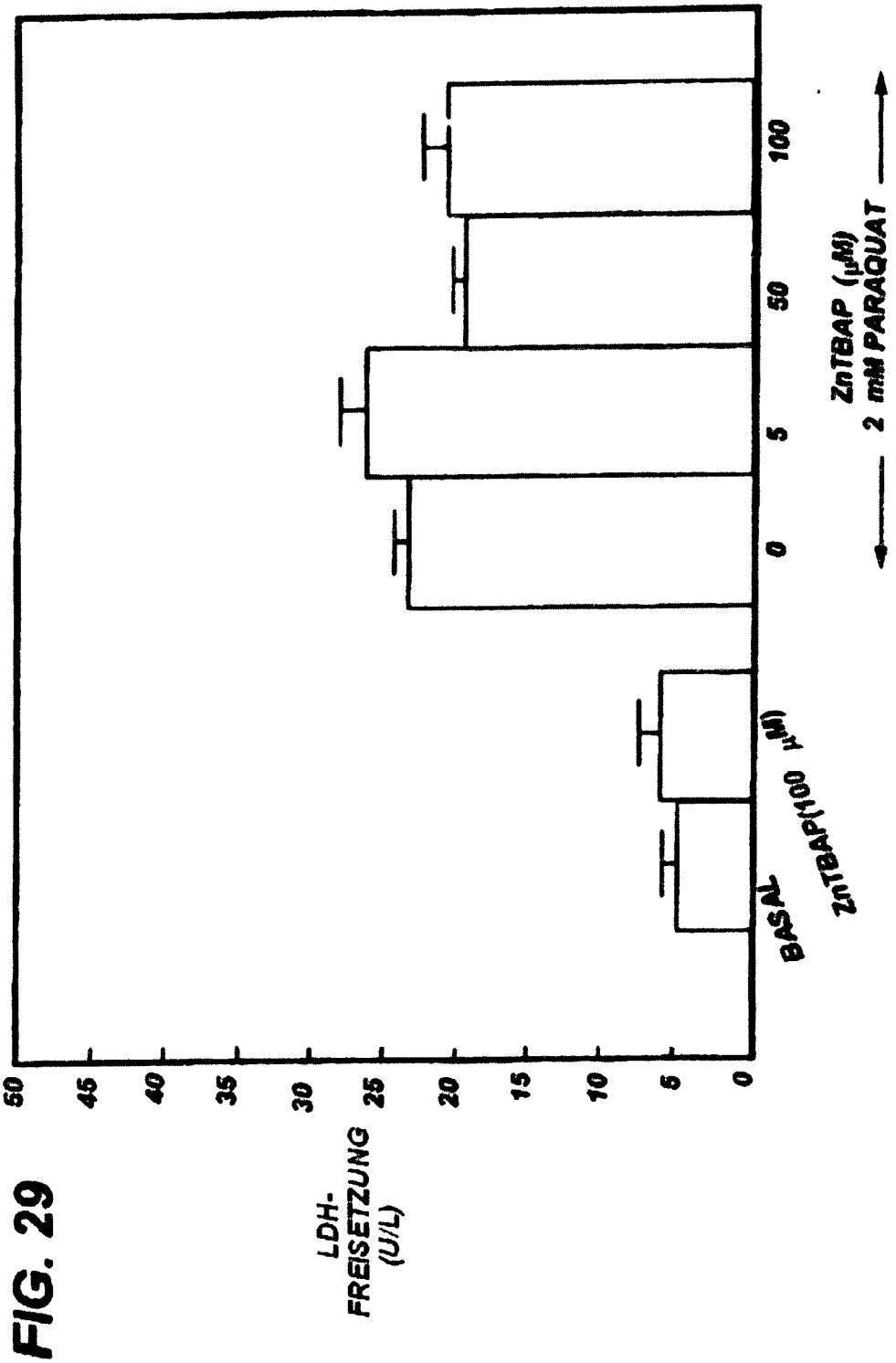
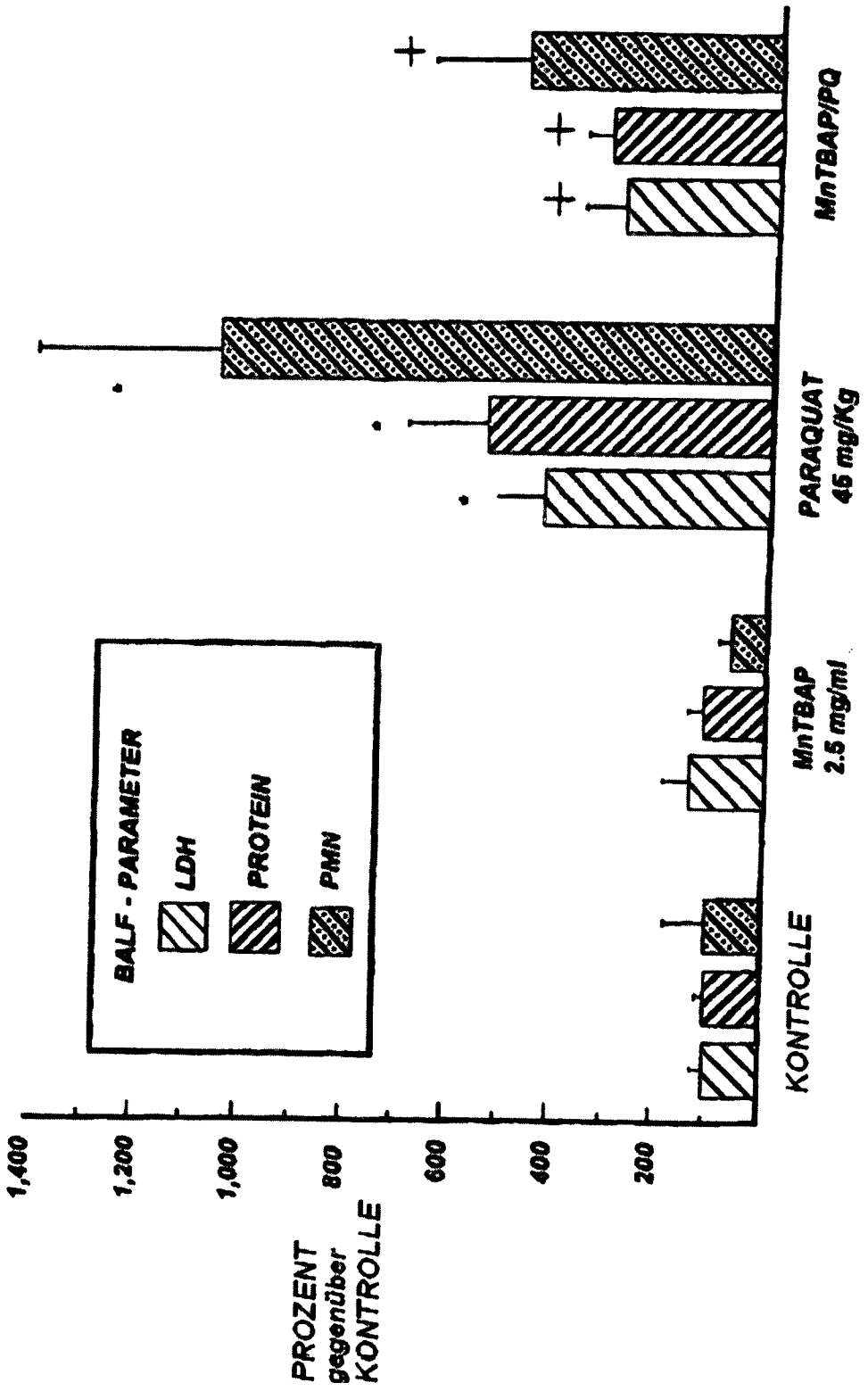

LDH-FREISETZUNG (U/L)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
BASAL
ZnTBAP(100 µM)
ZnTBAP (µM)
2 mM PARAQUAT
0
5
50
100

FIG. 29

FIG. 30


BALF - PARAMETER
LDH
PROTEIN
PMN
PROZENT gegenüber KONTROLLE
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
KONTROLLE
MnTBAP 2.5 mg/ml
PARAQUAT 45 mg/Kg
MnTBAP/PQ