

## Referat und bibliographische Beschreibung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale spielen eine wichtige Rolle in lebenden Systemen. Sie sind bei der Entstehung und Pathophysiologie von Krankheiten und dem Wirkungsmechanismus vieler Fremdstoffe beteiligt. Die funktionstüchtige Zelle ist mit einer Grundausstattung an antioxidativen Schutzmechanismen versehen. Eine Imbalance zwischen anfallenden ROS und/oder freien Radikalen mit diesen Schutzmechanismen wird als oxidativer Stress bezeichnet. Es ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen auf oxidativen Stress mit einer Erhöhung ihrer antioxidativen Enzymkapazität reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob verschiedene Lungenzelltypen in der Lage sind ihre Enzymkapazität anzupassen. Zur Generierung von ROS wurde das Herbizid Paraquat (PQ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), eingesetzt. Als Untersuchungsobjekt dienten humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ), primäre AII-Zellen (Ratte) und zwei humane Tumorzelllinien. Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mit Northern-Blot-Analytik und RT-PCR-Technik. Es wurden die Grundexpressionsmuster für Katalase, Mangan-Superoxiddismutase und Kupfer/Zink-Superoxiddismutase im Kulturverlauf bestimmt. Die absoluten Enzymaktivitäten der Tumorzelllinien und der Lunge wurden mittels Enzymassays bestimmt. Nach einer Inkubation der Kulturen mit PQ oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Toxizitätsdaten mit einem Vitalitätstest (MTT) und die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Abbauprodukt der Lipidperoxidation im Kulturmedium. Nach einer Inkubation mit PQ oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  fand sich in keinem der untersuchten Zellsysteme eine signifikante Erhöhung der Expressionsraten der mRNA für die untersuchten Enzyme.

Durch verschiedene Enzymsysteme kann Paraquat in Form von  $\text{PQ}^{2+}$  zum Paraquatradikal ( $\text{PQ}^{\bullet+}$ ) überführt werden. Der Hauptschädigungsmechanismus von PQ wird über die Generierung von Superoxidationen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ , Einelektronübertragung von  $\text{PQ}^{\bullet+}$  auf  $\text{O}_2$ ) angenommen. Um den Mechanismus der Paraquattoxizität zu untersuchen, wurden einige Aspekte der PQ-Radikal-Generierung näher betrachtet. Dazu wurde in einem Mikrosomensystem (Ratte) die Generierung von Superoxidationen (Lucigenin und Nitro-Blue-Tetrazolium als Detektormoleküle) und der Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch durch den Zusatz von PQ untersucht. PQ steigerte den Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch, aber nicht die Generierung von Superoxidationen. Wegen des schweren klinisch/pathologischen Bildes nach einer Paraquatvergiftung wird eine Mitbeteiligung von Hydroxylradikalen diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass Übergangsmetallionen für die Generierung von Hydroxylradikalen, im Sinne einer Fenton-Reaktion, erforderlich sind. Das reduzierte  $\text{PQ}^{\bullet+}$  lässt sich unter anaeroben Bedingungen stabilisieren. Mit dem chemischen Reduktionsmittel Natriumdithionit (NDT) und einem enzymatischen System, bestehend aus Xanthin und Xanthinoxidase (XO/X), wurden zwei Reduktionssysteme unter anaeroben Bedingungen etabliert. Die Generierung von PQ-Radikalen wurde mittels UV-VIS- und ESR-Spektroskopie untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen, in Abwesenheit von freien Metallionen,  $\text{PQ}^{\bullet+}$  aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  Hydroxylradikale generieren kann.  $\text{PQ}^{\bullet+}$  akzeptiert molekularen Sauerstoff besser als  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Elektronenakzeptor. Über eine Verschiebung des intrazellulären Milieus, z.B. durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch nach einer PQ-Vergiftung, kann es zu einer quantitativen Umverteilung der Reaktionswege kommen.

Weidauer, Enrico: Der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme von Lungenzellen und Aspekte zum Mechanismus der Paraquattoxizität.  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sauerstoff, reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale . . . . .	1
1.2	Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen . . . . .	7
1.3	Lunge und ROS . . . . .	11
1.4	Paraquat . . . . .	13
1.5	Problemstellung - Zielsetzung . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1	Versuchstiere . . . . .	17
2.2	Normale humane Bronchialepithelzellen . . . . .	17
2.3	Zelllinien . . . . .	18
2.4	Chemikalien und Biochemikalien . . . . .	18
2.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	19
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Sterilisation von Materialien und Lösungen . . . . .	21
3.2	Alveolar TypII-Zellen, NHBEC, H322 und H358 . . . . .	21
3.3	Bestimmung der Zytotoxizität . . . . .	23
3.4	HPLC-Analytik von Malondialdehyd . . . . .	23
3.5	Proteinbestimmung . . . . .	24
3.6	Mikrosomen-Präparation . . . . .	24
3.7	Enzymassay . . . . .	24
3.8	Untersuchungen der mRNA-Expression . . . . .	27
	3.8.1 Northern Blot-Analytik . . . . .	28
	3.8.2 Reverse Transkription und PCR . . . . .	30
3.9	Spektrophotometrische Methoden . . . . .	31
	3.9.1 Systeme zur PQ-Reduktion . . . . .	33
3.10	Polarographische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs . . . . .	35
3.11	Lucigeninchemolumineszenz im Bioluminator . . . . .	35
3.12	ESR-Technik und Spin-Trap . . . . .	36
3.13	Auswertung der durchgeführten Experimente . . . . .	37

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	Untersuchungen zur Vitalität . . . . .	38
4.2	Malondialdehydbestimmung im Kulturmedium . . . . .	40
4.3	Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium . . . . .	40
4.4	Enzymaktivitätsbestimmungen . . . . .	41
4.4.1	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase . . . . .	42
4.4.2	Katalase . . . . .	42
4.5	Untersuchungen zur mRNA-Expression . . . . .	42
4.5.1	Über die Kulturdauer in Alveolar TypII-Zellen . . . . .	42
4.5.2	Nach PQ- oder H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inkubation in Alveolar TypII-Zellen . . . . .	43
4.5.3	Über die Kulturdauer in NHBEZ . . . . .	45
4.5.4	Nach PQ- oder H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inkubation in NHBEZ . . . . .	45
4.5.5	Nach PQ- oder H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inkubation in humanen Karzinomlinien H322 und H358 . . . . .	46
4.6	Untersuchungen im Mikrosomensystem . . . . .	46
4.6.1	NADPH-Verbrauchsmessung . . . . .	46
4.6.2	Sauerstoffverbrauchsmessung . . . . .	47
4.6.3	Superoxidquantifizierung . . . . .	48
4.7	Untersuchungen zur Paraquat vermittelten Radikalgenerierung . . . . .	49
4.7.1	Generierung des PQ-Radikals . . . . .	50
4.7.2	Hydroxylradikalnachweis mit Spin-Trap . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Primäre AII-Zellen, humane NHBEC und Tumorklinien H358/H322 . . . . .	56
5.2	Radikalische Schädigung durch Paraquat und Wasserstoffperoxid . . . . .	57
5.3	Die AOE in AII-Zellen, NHBEC und Lungentumorklinien . . . . .	61
5.4	Untersuchungen im Mikrosomensystem . . . . .	64
5.5	Untersuchungen zur Radikalgenerierung durch Paraquat . . . . .	66
5.6	Zusammenfassung . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Quellenangaben</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>84</b>

<b>A Anhang</b>	<b>87</b>
A.1 Lebenslauf . . . . .	87
A.2 Selbstständigkeitserklärung . . . . .	89
A.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche . . . . .	90
A.4 Publikationen . . . . .	91
A.5 Danksagung . . . . .	92

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°	Grad	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Δ	Delta	mV	Millivolt
ε	Epsilon/Extinktionskoeffizient	n	Anzahl der Versuche
λ	Lambda/Wellenlänge	NADPH <sub>(2)</sub>	Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat
Abb.	Abbildung	NDT	Natriumdithionit
Abk.	Abkürzung	nm	Nanometer
allg.	allgemein	NHBEZ	normale humane Bronchial-epithelzellen
AOE	antioxidative Enzyme	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidanionen
ADP	Adenosin-5-diphosphat	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ATP	Adenosin-5-triphosphat	pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
bzw.	beziehungsweise	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ca.	circa	PQ	Paraquat
d	dies/Tag	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
DEMEM	Dulbeccos's modified Eagle's medium	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	reverse Transkription
DNA	desoxiribonucleid acid	s	Sekunde/n
e	Elektron	S <sub>D</sub>	Standardabweichung
EGF	epidermal growth factor	S <sub>E</sub>	Standardfehler
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie	SOD	Superoxiddismutase
et al.	et alie, und andere	sog.	sogenannt
E/Ext	Extinktion	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
GPX	Glutathionperoxidase	TNF	Tumornekrosefaktor
h	hora/Stunde	Tris	2-Amino-2-hydro-methyl-propan-1,3-diol
IE	internationale Einheiten	UV	Ultraviolette Strahlung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	V	Volt
KAT	Katalase	Vit.	Vitamine
kb	kilo Basen	z.B.	zum Beispiel
M	Molar (Mol pro Liter)	X	Xanthin
max.	maximal	x g	mal Erdbeschleunigung
MDA	Malondialdehyd	XO	Xanthinoxidase
Mill.	Millionen		
min	Minute/n		
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		
MOPS	4-Morpholionopropan-sulfonsäure		