

1 Einleitung

Freie Radikale und andere reaktive Spezies spielen eine wichtige Rolle in vielen lebenden Systemen. Sie sind an der Entstehung und Pathophysiologie vieler Krankheiten und dem Wirkungsmechanismus vieler Toxine beteiligt. Eine funktionstüchtige Zelle ist mit einer Grundausstattung an antioxidativen Schutzmechanismen versehen. Eine Imbalance zwischen anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und/oder freien Radikalen mit den Schutzmechanismen wird als oxidativer Stress bezeichnet. Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden ob Lungenzellen in der Lage sind, auf oxidativen Stress mit einer Erhöhung ihrer antioxidativen Enzymkapazität zu reagieren und ob sich die Kulturdauer auf die Expression der antioxidativen Enzyme in Alveolar TypII-Zellen und humanen Bronchialepithelzellen auswirkt. Zur Generierung von oxidativem Stress wurde das Herbizid Paraquat gewählt. Der PQ-Wirkungsmechanismus und die Generierung von reaktiven Spezies, insbesondere von Hydroxylradikalen durch Paraquat, werden im zweiten Teil der Arbeit näher untersucht.

1.1 Sauerstoff, reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale

Ein freies Radikal ist jedes Atom oder Molekül, welches in der Lage ist unabhängig zu existieren und ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzt.¹ Ein ungepaartes Elektron ist ein Elektron, das ein Atom- oder Molekülorbital allein belegt. Die Anwesenheit von einem oder mehreren ungepaarten Elektronen bewirkt, dass Radikale paramagnetisch sind und so von einem Magnetfeld angezogen werden können. Das einfachste bekannte freie Radikal ist der atomare Wasserstoff, er besitzt nur ein Elektron. Radikale sind sehr reaktionsfreudig. Auf Grund des einzelnen Elektrons zeigen sie eine starke Tendenz ein zweites Elektron von einem potenziellen Reaktionspartner zu extrahieren, um eine höhere chemische Stabilität zu erreichen. Die Interaktion mit Zellbestandteilen und die Möglichkeit bestimmte Kettenreaktionen auszulösen, kann zur Bildung sekundärer Radikale aus Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren führen.

Der atmosphärische, molekulare Sauerstoff wird von den Zellen aller höheren (heterotrophen) Organismen als Oxidationsmittel in Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt. In Form energiereicher Phosphate wird diese Energie benötigt, um alle Lebensprozesse zu sichern. Dabei wird das Reduktionsäquivalent NADPH_2 durch Luftsauerstoff oxidiert und die dabei freiwerdende Energie zur ATP-Synthese genutzt. Auf diesem Wege liefern beim oxidativen Abbau 1 Mol Glukose 38 Mol ATP, bei der anaeroben Gärung werden dagegen nur 2 Mol ATP gebildet. Seitdem Sauerstoff durch erste sauerstoffproduzierende Bakterien und durch die Photosynthese

¹Diese Elektronen werden mit einem bzw. mehreren Punkten symbolisiert.

von Pflanzen produziert wurde, haben Lebewesen gelernt, die chemische Reaktionsfreudigkeit des Sauerstoffs auszunutzen.

Der molekulare Sauerstoff ist ein Biradikal, da beide Sauerstoffatome in den zwei äußeren Molekülorbitalen (π^* Orbitalen) je ein ungepaartes Elektron besitzen. Dennoch ist dies die stabilste Form von zwei Sauerstoffatomen und wird Grundzustand genannt. Da die zwei äußeren Elektronen parallel ausgerichtet sind, d.h. sie besitzen einen parallelen Spin, sorgen sie aus Spinverbotsgründen für den relativ stabilen, reaktionsträgen Zustand des molekularen Sauerstoffs. Jede andere Anordnung der äußeren Elektronen führt zu reaktionsfreudigeren Sauerstoffderivaten, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt werden. Der Begriff beinhaltet aber nicht nur freie Radikale, sondern auch Nicht-Radikale, welche sich direkt vom Sauerstoff ableiten.

Zu den radikalischen ROS zählen Superoxid [$O_2^{\bullet-}$], das Hydroxylradikal [OH^{\bullet}], das Peroxylradikal [RO_2^{\bullet}], das Alkoxyl-Radikal [RO^{\bullet}] und das Hydroperoxyl-Radikal [HO_2^{\bullet}]. Nicht radikalische ROS sind Wasserstoffperoxid [H_2O_2], hypochlorige Säure [$HOCl^a$], Ozon [O_3], Singulett Sauerstoff [$^1\Delta_g$ singlet] und Peroxynitrit [$ONOO^{-b}$].

Es gibt drei prinzipielle Möglichkeiten der Entstehung von freien Radikalen:

- 1. Der Verlust eines Elektrons von einem Nichtradikal, es entsteht ein Radikal-Kation.
- 2. Die Aufnahme eines Elektrons durch ein Nichtradikal, es entsteht ein Radikal-Anion.
- 3. Die homolytische Aufspaltung einer kovalenten Bindung, der sogenannten Radiolyse, es entstehen ungeladene Radikale.

Die verschiedensten physikalischen, chemischen und physiologischen Reaktionen können Ausgangspunkt für die Entstehung von ROS sein. Viele Enzymsysteme generieren bei physiologischen Vorgängen ROS. Einige davon sind die mikrosomalen und mitochondrialen Elektronentransportketten, die enzymatischen Umsetzungen in Peroxysomen oder im Zytosol wie durch das Xanthin/Xanthinoxidase-System [127], die Prostaglandin-Synthese oder das Cytochrom-P450-System im endoplasmatischen Retikulum, welches sauerstoffkonzentrationsabhängig Superoxidanionen produziert [65]. Eine weitere bedeutende Quelle ist der Stoffwechsel vieler Xenobiotika im Mechanismus der (Ent-) Giftung, als Beispiel wäre das Chemotherapeutikum Bleomycin zu nennen [96, 148]. Viel komplexer und unüberschaubarer wird die Situation bei komplexen Stoffgemischen mit einer großen Anzahl verschiedenster Inhaltsstoffe und Wechselwirkungen wie z.B. beim Tabakrauch.

Aber auch eine Reihe physikalischer Einflüsse, wie die verschiedenen Strahlungsarten oder mechanische Reizungen, können zur Bildung von ROS führen. So entstehen bei der homolytischen Wasserspaltung, der Radiolyse, aus einem Wassermolekül ein Wasserstoffradikal (H^\bullet) und ein Hydroxylradikal (OH^\bullet), die für das Auslösen der akuten Strahlenkrankheit verantwortlich gemacht werden. Selbst die kleinen Partikel (PM10) in Dieselabgasen, welche wegen ihrer geringen Größe tief eingeatmet werden können und in der Lunge verbleiben, da sie von ihren Reinigungssystemen nicht erfasst werden, sind in der Lage Hydroxylradikale zu generieren [45]. Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wurde für Asbestfasern nachgewiesen, welche in unmittelbarem Zusammenhang mit der Induktion von Lungenfibrosen, Lungenkarzinomen oder Pleuramesotheliomen stehen [112]. Ebenso wird die Hautalterung (UV-Licht) und die Entstehung verschiedenster anderer Tumore mit dem Wirken reaktiver Spezies in Zusammenhang gebracht [24, 58, 57].

Reaktive Sauerstoffspezies sind aus mehreren Gründen zellpathogen. Sie können DNA-Strangbrüche induzieren, Onkogene aktivieren bzw. Tumorsuppressorgene inhibieren, Enzyme und Proteine inaktivieren oder zur Lipidperoxidation führen. Wegen ihrer hohen Reaktivität können sie praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zellen reagieren, was je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis zum Zelltod führen kann. In den Nukleinsäuren, insbesondere in der DNA kann es durch oxidative Veränderungen zu Fehlpaarungen und in der Folge zu Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen kommen [44]. Solche Erscheinungen sind mutagen und spielen bei der Tumornitiation und -promotion eine Rolle. Wichtig ist hierbei, inwieweit durch die zelleigenen Schutz- und Reparatursysteme einmal entstandene Schäden erkannt und repariert werden können. Bei irreparablen Schäden kann außerdem ein Signal in Richtung programmierten Zelltod (Apoptose) induziert werden, wodurch geschädigte Zellen aus dem Gesamtorganismus entfernt werden können. Biologische Membranen und subzelluläre Organellen sind durch die dort vorhandenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranphospholipide gegenüber oxidativen Prozessen empfindlich. Oxidanzien reagieren dabei mit Fettsäuren und können über radikalische Zwischenstufen das Peroxyradikal generieren. Dieser als Lipidperoxidation beschriebene Vorgang kann zur völligen Zerstörung von Zellmembranen führen. Im Rahmen der Lipidperoxidation entstehen Aldehyde, welche weitere reaktive Eigenschaften besitzen und die Molekülstruktur von Proteinen, Enzymen, RNA und DNA schädigen können. Ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation der Membranlipide ist Malondialdehyd (MDA). Die Empfindlichkeit der Proteine hängt im wesentlichen von ihrer Aminosäurezusammensetzung ab, da bestimmte Aminosäuren besonders leicht angreifbar sind (Zystein, Histidin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin). Außerdem spielt, in Bezug

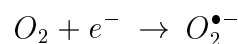
der funktionellen Beeinträchtigung durch die Schädigung z.B. einer wichtigen Bindungsstelle, auch der Ort der oxidativen Veränderung am Protein ein ausschlaggebende Rolle [1].

Doch nicht nur die direkte Oxidation von Zellbestandteilen kann zur Beeinflussung der Zellhomöostase führen: über die Beeinflussung des intrazellulären Kalziumhaushalts kann es zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Endonukleasen kommen, welche in der Lage sein können, DNA-Moleküle zu fragmentieren [20, 71, 120].

Die verschiedenen ROS sind nicht nur durch ihre zelltoxische Wirkung bekannt, sondern sie spielen auch eine Rolle bei der Erfüllung von essenziellen biologischen/physiologischen Aufgaben und Reaktionen des Organismus. So wird Superoxid bei Entzündungsreaktionen der unspezifischen Abwehr, wie dem “respiratory burst”, in phagozytierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten zur Bekämpfung von Bakterien benutzt. In das extrazelluläre Milieu abgegebene Superoxidanionen gelten darüber hinaus als Teil von chemotaktischen Faktoren für andere Entzündungszellen [32]. Als endogene Aktivatoren der phagozytären Superoxidradikalbildung gelten z.B. der Komplementfaktor C5a, Leukotrien B4 sowie der Tumorpromotor Phorbolmyristylacetat (PMA) [149]. Desweiteren sind sie bekannt als Ereignis der Signaltransduktion bei verschiedenen Regulationsmechanismen wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen, z.B. EGF, TNF-, TGF- oder als Second-Messenger-System über die Aktivierung von NF- κ B [7, 85, 100, 115].

Bei der schrittweisen Reduktion des molekularen Sauerstoffs entstehen auf verschiedenen Reduktionsstufen drei reaktive Spezies: Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale (Abb. 1).

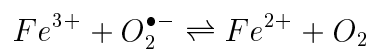
Das Superoxidradikalanion $\text{O}_2^{\bullet-}$



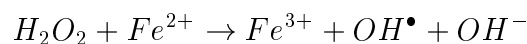
Besetzt ein Elektron eines der beiden freien π^* -Orbitale des molekularen Sauerstoffs, entsteht das Superoxidradikalanion. Es besitzt also nur noch ein ungepaartes Elektron. Vorzugsweise wird $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch die Elektronentransportketten in den Mitochondrien gebildet, dieser Weg als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmung ist direkt proportional zur Sauerstoffspannung und wird daher auch als wesentlicher Mechanismus der Sauerstofftoxizität diskutiert. Die Entstehung von Superoxidanionen beim Stoffwechsel von Fremdstoffen steht oft in einer Beziehung zum toxikologischen Erscheinungsbild. Besonders ausgeprägt ist diese Bildung bei Vergiftungen mit dem Herbizid Paraquat [5, 56, 73].

Die Superoxidanionen sind polare Moleküle, welche schlecht Membranen permeieren kön-

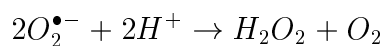
nen. Sie können sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein und werden durch Superoxiddismutasen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert. Die effektive Halbwertszeit liegt im Bereich von Millisekunden. $O_2^{\bullet-}$ haben eine geringe Reaktivität; eine direkte Interaktion mit DNA, Lipiden oder Aminosäuren ist möglich, doch nur mit geringer Effektivität.² Als Folgeprodukte können Wasserstoffperoxid, Peroxynitrite und Hydroxylradikale entstehen. Hydroxylradikale können nicht direkt aus Superoxid generiert werden. Das Superoxidanion ist jedoch in der Lage, das dreiwertige Eisen in die fentonfähige zweiwertige Form zu überführen [67, 70]. Diese Reaktion wird Superoxid-assistierte-FENTON-Reaktion genannt.



Reaktion vom FENTON-Typ:



Wasserstoffperoxid H_2O_2 Wasserstoffperoxid ist bei der schrittweisen Reduktion des molekularen Sauerstoffs das zweite Zwischenprodukt und entsteht direkt aus Superoxid durch Dismutation.



Wasserstoffperoxid aus der Gruppe der nichtradikalischen ROS entsteht unter physiologischen Bedingungen vorrangig in den Peroxisomen, bei verschiedenen Enzymreaktionen als Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen [26]. Es ist gut wasserlöslich und sehr gut membranpermeabel. Die biologische Halbwertszeit ist abhängig von den H_2O_2 -abbauenden Enzymen wie Katalase und Glutathionperoxidase, welche für ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau sorgen. Es kann sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein, ist aber selbst wenig reaktiv. Nur ein Teil der Schäden, welche durch H_2O_2 ausgelöst werden, kann auf eine direkte Wirkung zurückgeführt werden, da DNA-Moleküle, Lipide und die meisten Proteine nach einer Inkubation mit H_2O_2 keine Oxidationschäden zeigen [71].³

Wasserstoffperoxid kann aber metallionenkatalysiert über die FENTON-Reaktion Hydroxylradikale generieren und so z.B. für indirekte DNA-Schädigungen sorgen [129, 138].

²So können Superoxidanionen Ribonukleotidreduktasen inaktivieren [62].

³Nur für Proteine mit bestimmten -SH Gruppen, so für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase sind Inaktivierungen durch H_2O_2 beschrieben [19].

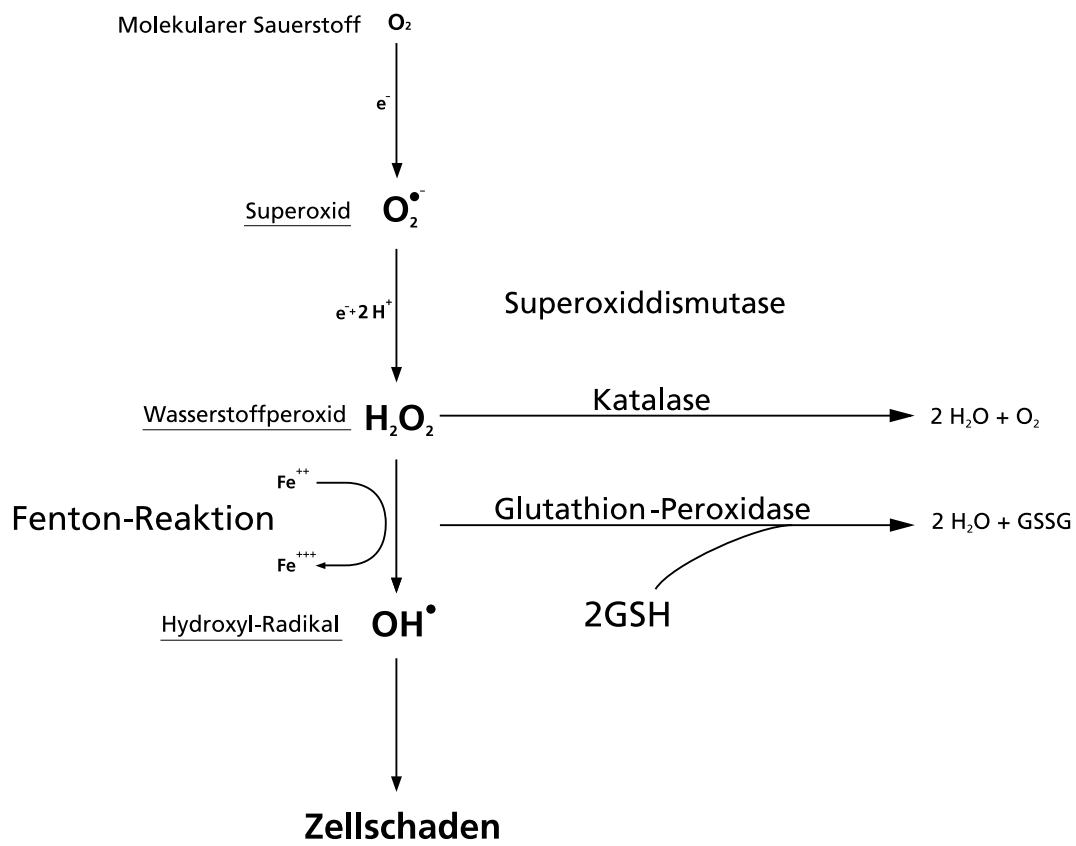


Abbildung 1: **Die schrittweise Reduktion des molekularen Sauerstoffs:** Der molekulare Sauerstoff (O_2) ist selbst ein Biradikal, er besitzt zwei freie Elektronen. Die Ein-Elektronen-Reduktion (ein Elektron wird auf Sauerstoff übertragen) führt zum Superoxid ($O_2^{\bullet-}$). Eine Zwei-Elektronen-Reduktion führt zum Wasserstoffperoxid (H_2O_2), der vollprotonierten Form des Sauerstoffs. Ist zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) vorhanden, wird aus Wasserstoffperoxid das reaktivste Radikal, das Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) gebildet. Dies ist die FENTON-Reaktion. Superoxid ist in der Lage Fe^{3+} in Fe^{2+} zu überführen (nach [66]).

Das Hydroxylradikal OH^{\bullet}



Das Hydroxylradikal entsteht durch die Metallionen (Me) katalysierte Spaltung von Wasserstoffperoxid, der sogenannten FENTON- oder FENTON-ähnliche-Reaktion, aber auch bei metallionenunabhängigen Reaktionen wie der Radiolyse von Wasser [136], z.B. beim Bestrahlen der Haut mit UV-Licht⁴. Das Hydroxylradikal ist das stärkste bekannte reaktive Sauerstoffradi-

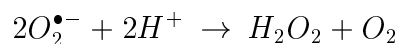
⁴Selbst bei medizinischen Ultraschalluntersuchungen lässt sich die Entstehung von Hydroxylradikalen nachweisen [36].

kal und kann nur ein einziges Mal reagieren. Durch sein hoch positives Reduktionspotential ist es extrem reaktionsfreudig und kann praktisch mit allen Molekülen in einer Zelle sehr schnell reagieren. Auf Grund dessen können Schäden fast nur am eigenen Entstehungsort verursacht werden⁵. Die biologische Halbwertszeit wird auf ca. 1 Nanosekunde geschätzt. Auf Grund der großen Reaktionskraft ist es in der Lage, direkt an DNA- und Membranmolekülen Schäden zu verursachen [17, 126, 136].

1.2 Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen

Da die Bildung von ROS eine Begleiterscheinung aerober Lebensweise darstellt, besteht bei normalen Bedingungen in Säugetierzellen ein Gleichgewicht zwischen Oxidanzien und antioxidativ wirkenden Substanzen, zu denen Enzyme (z.B. Superoxiddismutasen, Katalasen, das Glutathionredoxsystem) und nicht enzymatische Antioxidanzien (z.B. Glutathion, Vitamin A, C, und E, Harnstoff, Bilirubin u.a.m.) gezählt werden. Sie sind die Gegenspieler für Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, aus denen wie oben beschrieben entweder spontan oder über enzymatische Reaktionen wesentlich zelltoxischere Sauerstoffradikale entstehen können. Oxidativer Stress entsteht also immer dann, wenn die ROS-Generierung die antioxidative Kapazität vorübergehend übersteigt. Zwei der antioxidativen Enzymsysteme wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Dies sind Superoxiddismutasen und Katalasen.

Superoxiddismutase Das Vorkommen von Superoxiddismutasen ist ubiquitär, sie sind in vielen Spezies nachgewiesen, wobei die Konzentrationen organspezifisch schwanken. Hohe Konzentrationen finden sich vor allem in den stoffwechselaktiven Organen wie Lunge, Herz, Leber und Niere. Es sind verschiedene Metallenzyme mit unterschiedlichen katalytischen Zentren. Sie werden nach dem zentralen Metallanteil in Mangan- (Mn-SOD), Eisen- (Fe-SOD), und Kupfer/Zink-Superoxiddismutasen (Cu/Zn-SOD) unterteilt und sind spezies-, gewebe- und zellorganellspezifisch verteilt und katalysieren die Dismutation von Superoxidanionen [56]:



Diese Reaktion läuft sehr schnell ab (Reaktionskonstante $2 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$), so dass intrazellulär gebildete Superoxidanionen gleich am Ort des Entstehens abgefangen werden können.

Die Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD) besitzt zwei Proteinuntereinheiten mit je

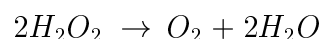
⁵Der Aktionsradius liegt bei ca. 1nm. Vergleich: eine durchschnittliche Zelle hat einen Durchmesser von 10.000nm.

einem Metallion als Zentrum: ein Cu-Ion als eigentliches katalytisches Zentrum und ein Zn-Ion zur Stabilität des Moleküls. Es ist ein für Hitze und Proteasen relativ unempfindliches Molekül. In eukaryontischen Zellen findet sich die Cu/Zn-SOD vorrangig im Zytosol, ist aber auch in Lysosomen, Peroxysomen, im Kern und in der äußeren mitochondrialen Membran zu finden. Je nach Spezies und Gewebe, aber auch ethnisch und regional bedingt, gibt es verschiedene Isoenzyme [35, 98, 134].

Die Mangansuperoxiddismutase (Mn-SOD) besitzt bei neutralem pH-Wert die gleiche Dismutationsrate wie die Cu/Zn-SOD. Sie ist relativ instabil gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen, besteht aus vier Proteinuntereinheiten und besitzt als katalytisches Zentrum Mn-Atome. Die Mn-SOD wurde fast ausschließlich in Prokaryonten und in der Matrix von Mitochondrien nachgewiesen.⁶

Die relativen Aktivitäten sind spezies- und gewebeabhängig unterschiedlich. So sind in humanem Leber- und Lungengewebe über 95% der gesamten SOD-Aktivität auf die Cu/Zn-SOD zurückzuführen. Erythrozyten besitzen keine Mn-SOD, da sie auch keine Mitochondrien besitzen [56]. Superoxiddismutase mit Eisen (Fe-SOD) als Metallion befindet sich vor allem in Bakterien, Algen und höheren Pflanzen. Des Weiteren gibt es nickelhaltige Superoxiddismutasen Ni-SOD [86].

Katalase Ein weiteres Enzym der antioxidativen Abwehr ist Katalase. Sie katalysiert die Umsetzung von Wasserstoffperoxid in eine Dismutation zu Sauerstoff und Wasser. Dabei dient Wasserstoffperoxid selbst als Elektronendonator zur Reduktion.



Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dismutation ist sehr hoch und von der vorhandenen H_2O_2 -Konzentration abhängig. Sie wird nur durch die Diffusion von H_2O_2 an das katalytische Zentrum begrenzt. Ebenso können weitere Peroxidase-Reaktionen katalysiert werden (Methanol, Ethanol, Formaldehyd, aber auch Nitrit zu Nitrat). Ein irreversibler Inhibitor für die Katalase ist Aminotriazol [39].

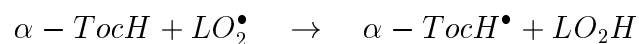
Die Katalase ist ein tetrameres Hämprotein mit je einer zentralen Eisen-Häm-Gruppe. Sie ist ubiquitär im Säugergewebe vorhanden, doch besonders in den Peroxisomen, wo eine Reihe von H_2O_2 -generierenden Enzymreaktionen stattfinden, lokalisiert. Im Zytosol, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien finden sich dagegen nur geringe Katalaseaktivitäten. Die

⁶Die Aminosäuresequenzen stimmen in allen Pflanzen, Bakterien und Tieren überein, was die Theorie der endosymbiotischen Aufnahme der Mitochondrien stützt.

relativen Aktivitäten sind organspezifisch verteilt. So sind im Lebergewebe besonders hohe, im Gehirn, Herz- und Skelettmuskel dagegen geringere Aktivitäten nachweisbar [99].

Die Takahara-Krankheit oder Akatalasämie ist ein Krankheitsbild, welches durch einen kompletten Katalasemangel hervorgerufen wird. Die Patienten dieser autosomal rezessiven Erbkrankheit (Japanischer Typ) leiden häufig an ulcerierender Stomatitis, während andere (Schweizer Typ) symptomlos bleiben und nur zufällig entdeckt werden. Die Prognose dieser Krankheit ist im Allgemeinen gut, es bleibt zu vermuten, dass das anfallende Wasserstoffperoxid durch andere Enzyme, wie z.B. der Glutathionperoxidase kompensatorisch abgebaut wird.

Antioxidanzien Die Antioxidanzien sind im weitesten Sinne Verbindungen, welche in der Lage sind, die Bildung von ROS einzuschränken bzw. die toxischen Wirkungen von einmal gebildeten ROS zu mindern. Sie schützen die Zellen, indem sie ein Elektron an das Radikal abgeben und es dadurch “neutralisieren”. Doch dabei können sie selbst zum organischen Radikal werden und oxidative Schäden verursachen⁷. So kann VitE ($\alpha - TocH$) die Kettenreaktion der Lipidperoxidation abbrechen, indem es das Lipidperoxyradikal (LO_2^\bullet) “einfängt”, es wird dabei aber selbst zum Radikal und kann durch VitC zurückgeneriert werden.



Regulierung der Genexpression Normale Zellen tolerieren milden oxidativen Stress. Sie sind mit einer “Grundausstattung” an antioxidativen Schutzsystemen ausgestattet, welche bei der Entgiftung und/oder Dämpfung oxidativer Schädigungen zusammenspielen. Dennoch ist eine Überexpression eines Gens für ein antioxidatives Enzym oft mit einer Steigerung des protektiven Effektes gegenüber oxidativem Stress verbunden. So zeigen Experimente mit transgenen Mäusen, welche hohe humane Mn-SOD in den Mitochondrien der Lunge (AII-Zellen) exprimieren, eine stärkere Resistenz gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen [155]. Transfizierte Hamster-Trachea-Epithelzellen mit einer gesteigerten Mn-SOD-Expression zeigen eine höhere Resistenz auf Asbest induzierten Stress [103]. Auch transgene Drosophila, welche hohe Expressionsraten von Rinder-Cu/Zn-SOD haben, sind somit besser gegen oxidativen Stress durch Paraquat oder Hyperoxie gewappnet [117]. Dagegen reagieren Mäuse ohne Cu/Zn-SOD empfindlicher auf Schäden durch Hyperoxie, Paraquat und andere Superoxid generierende Substanzen. Sie werden nicht so alt wie Mäuse mit normalem Enzymstatus und zeigen neurologische und kardiologische Ausfälle sowie eine reduzierte Fertilität [79, 114].

⁷So sind z.B. die “Überdosierung” mit Vitamin C und oxidative Schäden durch Vitamin A beschrieben [84, 104].

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in Induktionsexperimenten versucht, über eine Steigerung der Expressionsraten der antioxidativen Enzyme (AOE), eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress zu erreichen. Die Mechanismen der Regelungen der Genexpression sind jedoch für die einzelnen Enzyme sehr unterschiedlich. Sie sind einer Vielzahl verschiedenster Faktoren und Variablen unterlegen und nicht nur davon abhängig, welches ROS gebildet wird, wie und wo es gebildet wird und welches Target-Molekül einer potenziellen Schädigung unterliegt. In der Literatur finden sich als Reaktion auf oxidativen Stress durch ROS und andere Radikale gleichsinnige, aber auch gegenteilige sowie unbeeinflusste Expressionsmuster für die AOE. So zeigen Induktionsexperimente in *E.coli* die Induzierbarkeit von Mn-SOD durch Superoxid generierende Substanzen wie Streptomycin, Pyozyanide, Metylen-Blau oder auch Paraquat [56]. In Säugern lässt sich die AOE-Expression ebenfalls durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration, z.B. in Ratten oder durch Inkubation mit Oxidanzien steigern [30, 54]. So reagieren tracheo-bronchiale Epithelzellen nach einer Inkubation mit H_2O_2 mit einem Anstieg ihrer Mn-SOD und KAT mRNA-Expression, aber nicht für GPX- und Cu/Zn-SOD mRNA [132]. Auch in humanen Retinaepithelzellen lässt sich die Expression von Katalase durch H_2O_2 steigern [142]. Werden dagegen humane Bronchialepithelzellen unter steigenden Konzentrationen von Sauerstoff kultiviert, adaptieren sie zwar an diese Bedingungen, verändern aber nicht ihre Enzymexpressionsmuster für die AOE [107]. Die Fibroblasten aus der Leber neugeborener Hamster werden sogar durch geringe H_2O_2 -Konzentrationen ($1 \mu M$) in ihrem Wachstum stimuliert und erst bei höheren Konzentrationen ($100 \mu M$) inhibiert [21].

Nicht nur diese Mechanismen, welche unmittelbar mit der Generierung von ROS in Verbindung gebracht werden können, beeinflussen die Expression von AOE in Geweben oder Zellen. Es ist ebenso möglich mit Zytokinen wie Interleukin I und XI, die mRNA-Expression von Mn-SOD in primären Rattenhepatozyten oder Lungenepithelzellen selektiv zu steigern [150].

Auffällig ist weiter, dass die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten nicht zwingend auf die *in vivo* Situation übertragbar sind, da gleiche oder ähnliche Zelltypen unter verschiedenen Bedingungen, aber auch verschiedene Zelltypen eines Organverbandes in unterschiedlicher Art und Weise mit einer Veränderung ihres Enzymstatus reagieren können. So induzieren Lipopolysaccharide, ein bakterielles Endotoxin, *in vivo* in der Rattenleber zwar die Expression von Mn-SOD, doch in primären Rattenhepatozyten-Kulturen finden sich diese Effekte nicht mehr [46]. Ebenso zeigen pulmonale Epithelzellen einen Anstieg der Mn-SOD auf Lipopolysaccharide, Interleukin I und TNF, wogegen Fibroblasten aus der Lunge diesen Effekt nicht zeigen [150].

Es gibt eine Reihe weiterer Arbeiten, welche die Induzierbarkeit der AOE in unterschiedlichsten Zelltypen durch verschiedene Stimulanzen belegen. Eine Beeinflussung der Regulation findet sich häufig für die mRNA-Expression und die Aktivität der Mn-SOD Enzyme, vergleichsweise wenig dagegen für die anderen antioxidativen Enzyme wie Cu/Zn-SOD, Katalase und Glutathionperoxidase [132, 157].

1.3 Lunge und ROS

Auf Grund ihrer strukturellen und funktionellen Zusammenhänge als Gasaustauschorgan ist die Lunge das Hauptkontaktorgan inhalativ aufgenommener Noxen. Über die Zeitspanne eines ganzen Lebens wird der Respirationstrakt mit jedem Atemzug einem breiten Spektrum fester Partikel, gasförmiger und flüssiger Stoffe konfrontiert. Es ist eine Fülle von inhalativ lungenpathogenen und tumorinitiierenden Fremdstoffen vor allem aus der Arbeitsmedizin bekannt⁸. Eine Biotransformation der verschiedensten Xenobiotika findet nicht nur in der Leber als Hauptstoffwechselorgan statt. Die Lunge selbst besitzt eine Vielzahl von Enzymsystemen, um den unterschiedlichen Belastungen gerecht zu werden. Ein besonderes Problem stellen dabei ROS und freie Radikale dar, die entweder extern über die Atemluft aufgenommen werden, systemisch mit dem Blutkreislauf in die Lunge gelangen oder vor Ort durch anorganische Reaktionen bzw. durch aktivierte Entzündungszellen (Alveolarmakrophagen bei der Phagozytose) entstehen. Eine ätiologische Mitbeteiligung von ROS ist für die unterschiedlichsten pulmonalen Erkrankungen und pathophysiologischen Zustände nachgewiesen. Als Beispiele wären die Effekte von Zigarettenrauchen, Emphysem, COPD (chronic obstructive lung disease), Hyperoxie, bronchopulmonale Dysplasie, Exposition durch Luftverschmutzung und Reizgasen (O_3 , NO_2 , SO_2 , Dieselabgasen), ARDS (adult respiratory distress syndrome), Mineralstäube, Pneumoconiosen, die Asbest-Karzinogenese, Asthma oder die zystische Fibrose zu nennen [71].

Die Lunge ist auf Grund ihrer Funktion den höchsten Sauerstoffpartialdrücken im Körper ausgesetzt (Normalatmosphäre 21% O_2). Höhere O_2 -Konzentrationen führen zu eindeutig toxischen Effekten [29, 41, 54]. Es kommt zu Schädigungen der Alveolen und zur Entstehung von Ödemen mit Störung des alveolären Gasaustausches. Die Endothelzellen der Blutgefäße reagieren dabei besonders schnell. Im Weiteren kommt es zum Absterben der Alveolarepithelzellen und zur Penetration von Proteinen in die Alveolen. Können diese Schäden nicht mehr repariert werden, kommt es zur Ausbildung von fibrotischen Umbauvorgängen und zur dauerhaften Stö-

⁸Zur Zeit bedingen die Karzinome der Lunge den größten Teil der Mortalitätsrate durch Tumore bei Männern. Bei den Frauen ist es mit steigender Tendenz Platz vier. Bei 90% dieser Männer und 78% der Frauen ist diese Tumorentstehung mit dem Tabakrauchen assoziiert.

rung des Gasaustausches [110].

Die Lunge besitzt eine komplexe Gewebsarchitektur mit einer starken Kompartimentierung und Polarisierung. Es sind mehr als vierzig verschiedene Zelltypen beschrieben, doch nur sechs sind bis jetzt als Targetzellen bei einer pulmonalen Schädigung bekannt. Dies sind Alveolar TypI-Zellen, Alveolar TypII-Zellen, Alveolarmakrophagen, Kapillar-Endothelzellen, zilientragende Bronchialepithelzellen und nichtzilientragende Bronchialepithelzellen. Einige dieser Zelltypen reagieren stärker auf initiiierende Einflüsse, diese sind scheinbar die Zielpopulationen für die Induktion maligner Tumore. Für nur wenige Zelltypen ist eine aktive Beteiligung an der Biotransformation von Xenobiotika nachgewiesen [37, 66]. Drei dieser Zelltypen wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

Nischenzellen, Alveolar TypII-Zellen Das Epithel der Alveolen besteht in der Hauptsache aus den Alveolar TypI-Zellen (ca. 95%), welche die Funktion des Gasaustausches von den Alveolen zu den Kapillaren des Blutgefäßsystems erfüllen. Sie sind sehr empfindlich für Verletzungen jeglicher Art und besitzen keine eigene Mitose- und Proliferationsmöglichkeiten oder Reparaturmechanismen. Zwischen diesen Typ-I-Zellen existieren eingestreute Alveolar TypII-Zellen (AII-Zellen). Diese Zellen besitzen eine irreguläre kuboidale Form, unter dem Elektronenmikroskop werden auf der Oberfläche zahlreiche kurze Mikrovilli sichtbar. Ein Hauptmerkmal sind die Lamellar-Körperchen im Cytoplasma der Zellen, dies sind osmiophile Einschlüsse mit regelmäßig angeordneten Lamellen. Diese osmiophilen Körperchen enthalten das Surfactant-Lipid, welches als Oberflächenlipid für die Aufrechterhaltung/Stabilität der Lungenbläschen verantwortlich ist. Schäden an Typ-I-Zellen werden durch proliferierende AII-Zellen ersetzt, welche sich in AI-Zellen differenzieren. AII-Zellen sind weniger empfindlich, können aber trotzdem durch erhöhten Sauerstoff oder andere Mechanismen vor allem in ihrer Surfactantproduktion gestört werden [12, 13, 29, 37, 92, 109, 121, 156].

Clarazellen Die Clarazellen sind die nichtzilientragenden Bronchialepithelzellen des distalen Bronchialbaums. Sie befinden sich am Übergang von den Bronchiolen zum gasaustauschenden Alveolar-Epithel, den Acini, sowie auch im höheren Respirationstrakt bis zur Nasenschleimhaut. Es sind kuboide, säulenartige Zellen, frei von Zilien, mit langen apikalen Mikrovilli und neurosekretorischen Granula. Im Elektronenmikroskop zeigen sie ein ausgeprägtes agranuläres endoplasmatisches Retikulum, große Mitochondrien und osmiophile Granula. Immunhistochemische Studien an histologischem Sektionsmaterial und an isolierten Zellen haben belegt, dass Clarazellen Cytochrom P-450 Isoenzyme als Indiz für eine Xenobiotika-Stoffwechselaktivität exprimieren [12, 29, 37, 92].

Zilientragende Bronchialepithelzellen Zilientragende Bronchialepithelzellen werden rein morphologisch von den Clarazellen getrennt. Sie finden sich vorrangig im oberen Respirationstrakt. Die Zilien sorgen für einen ständigen Abtransport von Schleim und so für die Reinigung der Atemwege. Über die Stoffwechselaktivitäten dieses Zelltypus ist bis jetzt wenig bekannt [29, 34, 37, 92].

1.4 Paraquat

Ein Generator von ROS ist Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid oder Methylviologen), ein quarternäres Ammonium-Herbizid aus der Gruppe der Bispyridilium-Verbindungen, zu der ebenfalls Deiquat und Morfamquat gehören. Diese Verbindungen zählen zu den wirkungsvollsten und toxischsten Herbiziden. Paraquat (PQ) ist ein schnell wirksames Kontaktherbizid, das seine Wirkung vor allem auf oberirdische Pflanzenteile entfaltet. PQ wurde im späten 19. Jahrhundert beschrieben, als Redoxindikator genutzt und ist seit den fünfziger Jahren als Methylviologen bekannt. Seitdem findet es eine breite Anwendung als schnell wirkendes Kontaktherbizid. Es wird im Boden in Abhängigkeit von verschiedenen Mikroorganismen inaktiviert. Die biologische Wirksamkeit dieser Verbindungen resultiert aus der Reduktion, welche im Prozess der Photosynthese in den Chloroplasten stattfindet (Übertragung eines Elektrons in Verbindung mit dem Photosystem I oder über eine Ferredoxin-NADPH⁺ Reduktase). Das reduzierte PQ ist in der Lage, ein Elektron auf molekularen Sauerstoff zu übertragen, wobei Superoxid entsteht. Das in den Chloroplasten über diesen Redoxzyklus generierte Superoxid wird zu einem Hauptteil durch SOD in H₂O₂ umgewandelt. Das entstehende und akkumulierende H₂O₂ ist für das schnelle Absterben der Pflanzen verantwortlich, da Chloroplasten keine eigene Katalase besitzen und die hohen H₂O₂-Spiegel nicht durch Glutathion inaktiviert werden können [140].

Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Toxizität in Tieren angenommen. Sie ist ein Resultat der Reduktion von PQ durch verschiedene Enzymsysteme. Die Addition eines einzelnen Elektrons an das PQ-Dikation (PQ²⁺) führt zum Methylviologen, dem PQ-Radikal mit blauer Farbe (PQ^{•+}). PQ^{•+} kann wiederum ein Elektron auf den molekularen Sauerstoff übertragen, was zum Superoxid führt und das PQ-Dikation regeneriert. Der Zyklus kann neu beginnen und läuft ununterbrochen solange ein elektronenübertragendes System, PQ und O₂ vorhanden sind.

Die Aufnahme von PQ erfolgt durch Absorption (Haut), Inhalation oder Ingestion. Es wird gut und schnell vom Gastrointestinal-Trakt resorbiert, Vergiftungserscheinungen können dadurch bereits vor Ablauf einer Stunde auftreten. Da PQ einen extrem kleinen Dampfdruck besitzt, ist die Gefahr einer Vergiftung durch Inhalation relativ gering. Durch die unverletzte Haut können nur kleinere Mengen absorbiert werden. Aufgenommenes PQ verursacht ein breites Spektrum

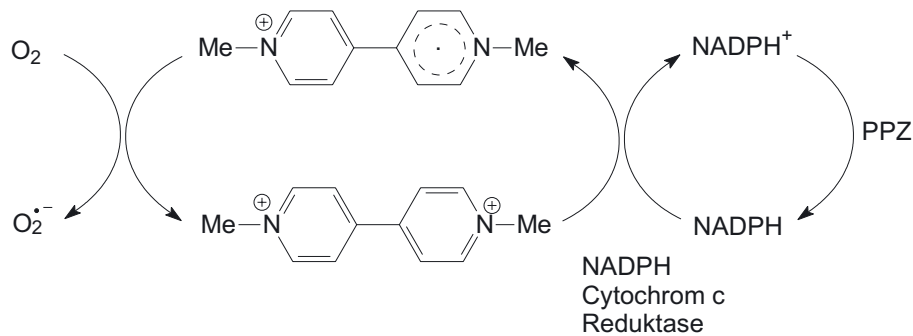


Abbildung 2: **Allgemein akzeptierter Mechanismus der PQ-Toxizität:** Als elektronenübertragendes System hier NADPH cytochrome c Reduktase (Mikrosomenfraktion). Die Übertragung eines Elektrons auf PQ (unten) führt zum PQ-Radikal (oben). Das zusätzliche Elektron "kreist" in einem der beiden Pyridinringe und kann auf Sauerstoff (O_2) übertragen werden, wodurch Superoxidanionen entstehen ($O_2^{\bullet -}$) [102]. PPZ=Pentose-Phosphatzyklus.

toxischer Effekte in Säugern. Betroffen sind vor allem die stoffwechselaktiven Organe wie Nieren, Leber, Nervensystem, Herz und Muskelgewebe. Im Mittelpunkt der Schädigungen steht die Lunge, in der die höchsten Konzentrationen von PQ gefunden werden. PQ wird in den Alveolar TypI- und TypII-Zellen sowie Clarazellen über einen energieabhängigen Transportmechanismus akkumuliert, welcher physiologisch für bestimmte biogene Amine wie Putrescin ist. Die Konzentrationen in der Lunge steigen dadurch bis zu fünfzigmal höher als im Blutplasma. Diese selektive Anreicherung und Persistenz im Lungengewebe ist verantwortlich für die vordergründige Schädigung der Lunge. Die Patienten entwickeln eine Dyspnoe und Tachypnoe sowie einen nichtproduktiven Husten. Der fibrotische Prozess entwickelt sich dann sekundär zur proliferativen Alveolitis. Er kann bis zum Tode führen [2, 9, 27, 75, 80, 133, 135].

1.5 Problemstellung - Zielsetzung

Induktion von AOE in Lungenzellen Das Zusammenspiel der verschiedenen antioxidativen Abwehrmechanismen und die Reaktionsmöglichkeiten der Zellen sind in den einzelnen Spezies, Geweben und Zelltypen unterschiedlich und begrenzt. Schädigungen können reversibel sein, d.h. die Zelle findet einen Mechanismus zur Abwehr oder sie führen zum Tod der Zelle. Es ist relativ schwierig, die Schädigungsmechanismen und Reaktionsabläufe durch ROS zu entschlüsseln. Einzig die Quantifizierung von Endprodukten, den sogenannten "footprints", lassen einen Rückschluss auf die abgelaufenen Reaktionen zu. Dafür kommen u.a. Malondialdehyd oder DNA-Strangbrüche in Frage. Die zweite Möglichkeit zur Aufklärung ist die Untersuchung der Genexpression und folgender Transkriptionsprodukte oder Proteine und deren Aktivitäten,

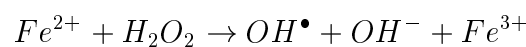
um daraus Rückschlüsse auf die Schädigungsmechanismen zu ziehen.

Es ist bekannt, dass verschiedene eukaryontische und prokaryontische Zellen durch Oxidanzien in der Expression ihrer AOE unterschiedlich beeinflusst werden können. [139, 122, 123]. Über die Regulationsmechanismen in Zellsystemen der Lunge ist wenig bekannt.

Vor dem beschriebenen Hintergrund eines ausgewogenen Oxidanzien-/ Antioxidanzien-Gleichgewichtes bei prooxidativer Belastungssituation soll im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Oxidanzien auf die AOE in Epithelzellen der Lunge in vitro untersucht werden. Es soll geprüft werden, ob sich die mRNA-Expression und die Enzymaktivitäten für Katalase, Cu/Zn- oder Mn-Superoxiddismutase durch ROS und daraus generierte Radikale induzieren lassen. Als Untersuchungssysteme wurden ein Primärzellkultursystem von AII-Zellen aus der Ratte, normale humane Bronchialepithelzellen aus OP-Resektionsmaterial und zwei Human-Tumorzelllinien H322 (clarazellähnlich) und H358 (AII-zellähnlich) gegenübergestellt. Wegen seiner Lungenspezifität wurde als ein Induktor für ROS das Herbizid Paraquat gewählt. Als Referenzsubstanz diente Wasserstoffperoxid. Zur Quantifizierung einer radikalischen Schädigung wurde ein Vitalitätstest und als Abbauprodukt der Lipidperoxidation Malondialdehyd im Kulturmedium bestimmt.

Der Wirkungsmechanismus von Paraquat und das Hydroxylradikal Der Mechanismus der Paraquattoxizität über die Generierung von ROS mit Hilfe eines Redoxzyklus ist allgemein anerkannt. Dabei wird Paraquat (PQ^{2+}) über einen Ein-Elektronen-Transfer zu dem Monokation ($PQ^{\bullet+}$) reduziert. In Gegenwart von O_2 kann $PQ^{\bullet+}$ dieses Elektron auf den Sauerstoff übertragen, gebildet werden Superoxidanionen und in der Folge Wasserstoffperoxid. Findet ein ständiger Elektronentransfer auf PQ^{2+} statt und ist genügend Sauerstoff verfügbar, wird dieser Redox-Zyklus mit einer kontinuierlichen Bildung von Superoxidanionen aufrechterhalten [74, 94, 135].

Auf Grund der limitierten Schäden durch Superoxidanionen im Kontrast zu den relativ schweren Schäden nach einer PQ-Intoxikation und der Möglichkeit DNA-Schäden zu verursachen (weder Superoxid noch Wasserstoffperoxid interagieren direkt mit DNA), wird dem Hydroxylradikal eine entscheidende Rolle im Wirkungsmechanismus von PQ zuerkannt. Die Bedeutung von Übergangsmetallen wird in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Von den meisten Autoren wird die Hydroxylradikalgenerierung mittels Übergangsmetallen als einziger Weg vertreten. Dabei werden über die FENTON-Reaktion aus Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale gebildet [135, 154, 161].



In anderen Arbeitsgruppen wurde dagegen vermutet, dass eine direkte Reaktion von $PQ^{\bullet+}$ und Wasserstoffperoxid möglich ist [153, 163], indem das Paraquatradikal H_2O_2 direkt als Elektronenakzeptor verwendet und analog dem Eisen bzw. Kupfer Hydroxylradikale generiert.



In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss das fentonfähige Eisen auf die Generierung von Hydroxylradikalen durch das Herbizid Paraquat hat.