

4 Ergebnisse

Verschiedenste Zelltypen reagieren in Kultur auf oxidativen Stress mit einer Veränderung in der Expression der antioxidativen Enzyme. So reagieren primäre Rattenhepatozyten nach einer Inkubation mit PQ mit einer Erhöhung ihrer Expressionsraten für Katalase und Mn-SOD mRNA [123]. Ob sich in Lungenzellen die antioxidativen Enzyme durch oxidativen Stress induzieren lassen, ist bisher weitgehend unklar. In den vorliegenden Experimenten wurde deshalb untersucht, ob oxidativer Stress durch Paraquat oder Wasserstoffperoxid zu einer Veränderung der Expression von Katalase, Cu/Zn-SOD oder Mn-SOD führen. Zuerst wurden in den Zellmodellen die zytotoxischen Eigenschaften und die Bildung von Malondialdehyd im Kulturmedium bestimmt. Danach wurde versucht, die Aktivität von Katalase und Cu/Zn-SOD in Lungengewebe zu bestimmen.

4.1 Untersuchungen zur Vitalität

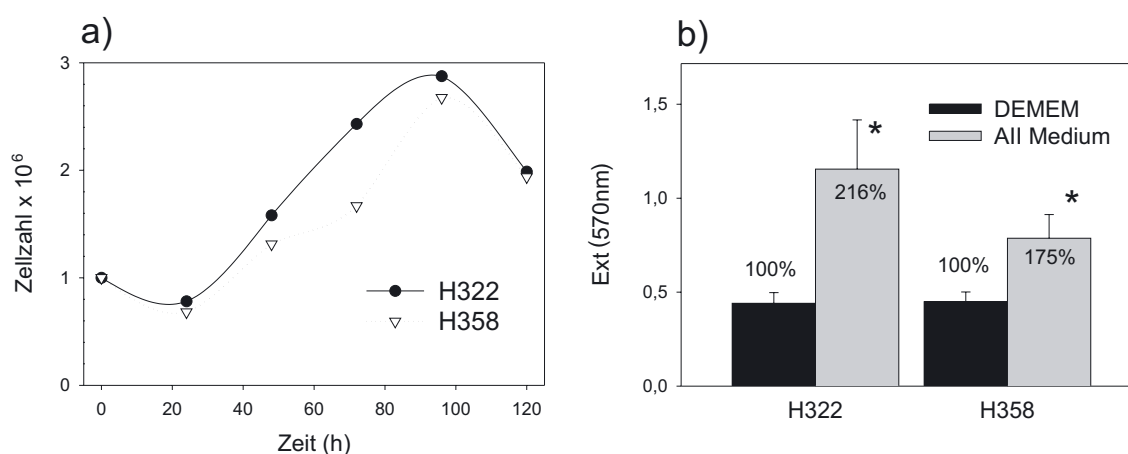


Abbildung 10: **Wachstumskurve und Einfluss von verschiedenen Kulturmedien auf die Vitalität von H322 und H358:** **a)** Es wurden eine Million Zellen auf eine 21 cm² Kulturschale in 5 ml Medium eingesät. Die Zellzahlen wurden vom 1. bis 5. Kulturtag mittels Auszählung in einer Fuchs-Rosenthalkammer bestimmt. Gezeigt ist die Gesamtzahl in der Kulturschale über die Zeit. **b)** Die Kulturen von H322 und H358 wurden in DEMEM kultiviert. Für 20 h erfolgte eine Subkultivierung in AII-Zellmedium. Kontrollkulturen erhielten ausschließlich DEMEM. Der Nachweis der Vitalität erfolgte mit dem MTT-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten Extinktionswerte des umgesetzten Formazans bei 570 nm (n=5), * p < 0,05 zur Kontrolle.

Die Abbildung 10a zeigt die Wachstumskurve der Tumorkulturen H322 und H358 in einer 21 cm² Kulturschale. Werden diese Kulturen für 20 h mit dem Kulturmedium für AII-Zellen kultiviert, findet man gegenüber mit DEMEM kultivierten Kulturschalen eine Steigerung der

Zellproliferation; in Kulturen von H322 um 116% und in Kulturen von H358 um 75% gegenüber DEMEM, bei sonst konstanten Kulturbedingungen (Abb. 10b).

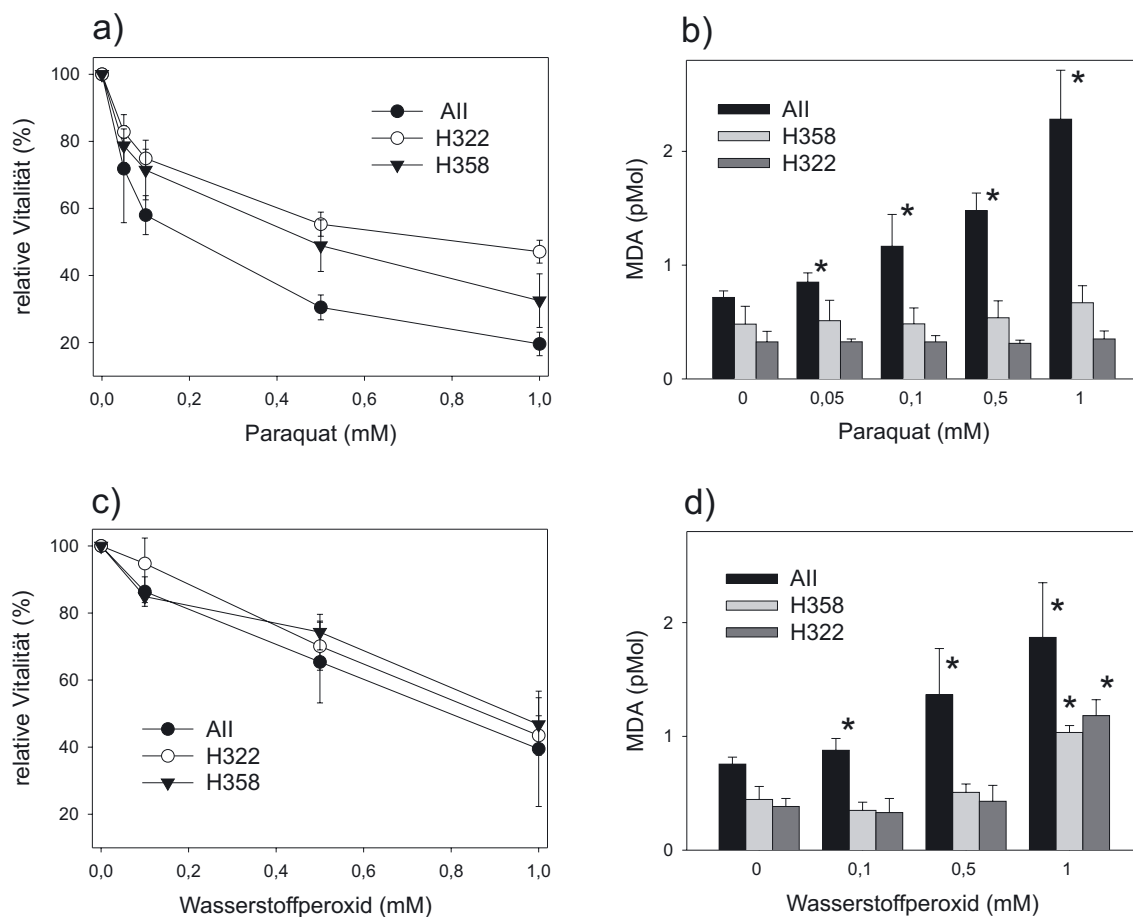


Abbildung 11: Einfluss von PQ- und H_2O_2 -Inkubation auf die Vitalität und die Malondialdehyd-Entstehung (MDA) im Kulturmedium von Alveolar TypII-Zellen und Kulturen von H322 und H358. Zellkulturen von Alveolar TypII-Zellen, H322 und H358 wurden für 20 h mit PQ oder H_2O_2 inkubiert. Die Kontrollen erhielten ausschließlich Normalmedium. **a) und c):** Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der relativen Messwerte ($n=5-7$). Kulturen mit Normalmedium sind Kontrollen gleich 100%. **b) und d):** Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der Messwerte in pMol ($n=3$), * $p<0,05$ zur Kontrolle ohne Behandlung.

Um einen Anhaltspunkt für die in den Inkubationsexperimenten einzusetzenden Konzentrationen zu erhalten, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Es wurde der MTT-Test (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) genutzt. Der Nachweis erfolgt über die Bildung von Formazan aus Methyltetrazolium durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Die Inkubation der Kulturen von primären Alveolar TypII-Zellen und den Tumorkulturen unter Standardbedingungen mit PQ (zwischen $50 \mu M$ und 1 mM) sowie H_2O_2 (zwischen

100 μM und 1 mM) über 20 h, führt zur konzentrationsabhängigen Verminderung der Vitalität (Abb. 11a, c). Dabei sind die Tumorkulturen etwas resistenter als die Primärkulturen von Alveolar TypII-Zellen der Ratte. Die in den Induktionsexperimenten benutzten Konzentrationen wurden aus diesen Daten festgelegt. Dabei wurde eine Überlebensrate von über 90% angestrebt. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erlangen, wurden in allen Untersuchungssystemen die gleichen Konzentrationen eingesetzt.

4.2 Malondialdehydbestimmung im Kulturmedium

Als Marker für eine radikalische Schädigung wurde Malondialdehyd (MDA), ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation, im Kulturmedium der Zellkulturen bestimmt. Zur Analytik von MDA im Kulturmedium wurde eine auf der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) basierende Methode eingesetzt.

Nach Behandlung mit PQ (0,05; 0,1; 0,5; und 1 mM) sowie H_2O_2 (0,1; 0,5; 1 mM) für je 20 h wurde MDA im Kulturmedium bestimmt (Abb. 11b, d). In den Kulturmedien der Alveolar TypII-Zellen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg von MDA nach PQ und H_2O_2 gemessen werden. In den Karzinomlinien H358 und H322 wurde erst ab 1 mM H_2O_2 eine signifikante Erhöhung des MDA-Spiegels auf etwa 1 pMol gemessen. Auch bei Konzentrationen bis 5 mM und entsprechenden Überlebensraten unter 10% blieb die gemessene MDA-Konzentration ebenfalls auf diesem Niveau (Daten sind nicht dargestellt). In den Medien der mit PQ behandelten Tumorkulturen wurde kein Anstieg von MDA gemessen. In den Kontrollen, also den Kulturen ohne Behandlung zeigte sich, dass die basalen MDA-Spiegel bei den Karzinomlinien signifikant kleiner sind als in der Primärkultur von AII-Zellen. Die MDA-Konzentrationen der Karzinomlinien untereinander zeigten nur geringe Unterschiede.

4.3 Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium

Um das Verhalten von PQ im Kulturmedium von Zellkulturen zu untersuchen, wurde die PQ-Konzentration im Medium spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden Kulturen von H358 und H322 mit PQ in Konzentrationen von 50 μM , 100 μM und 500 μM inkubiert. Die Konzentration von PQ, gemessen wurde zu den Zeitpunkten 1/2, 1, 2, 8, 24 und 48 h, bleibt im Kulturmedium von H322 (nicht dargestellt) und H358 über 48 h konstant (Abb. 12a).

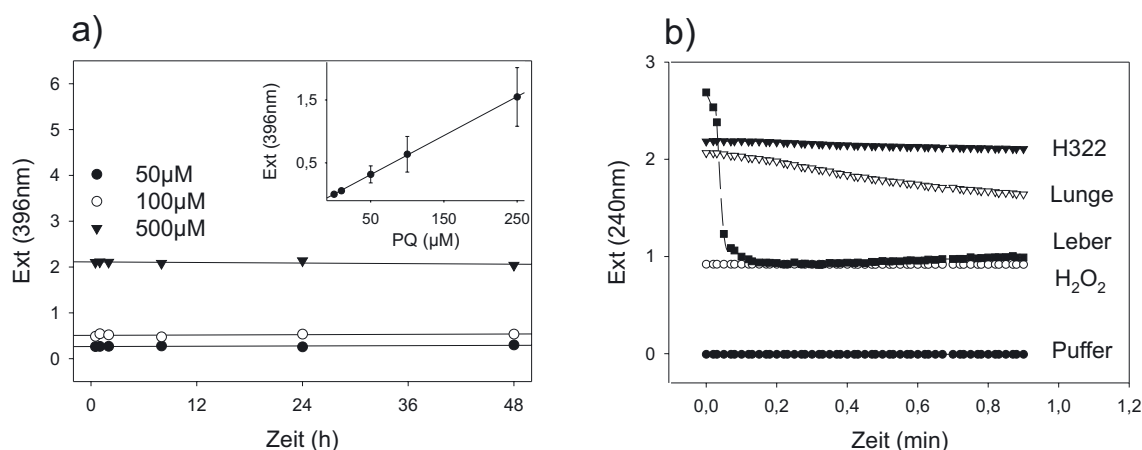


Abbildung 12: **a) Einfluss der Kulturdauer auf die PQ-Konzentration im Kulturmedium von H358:** Zellkulturen von H358 wurden mit PQ inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 2; 8; 24 und 48 h, danach erfolgte die Bestimmung der PQ-Konzentration im Kulturmedium spektrophotometrisch. Gezeigt sind die Extinktion bei 396 nm zur Zeit in Stunden. **Insert:** Kalibrierungsgerade der quantitativen PQ-Bestimmung; PQ-Verdünnungen 25; 50; 100 und 250 μM wurden je drei mal angesetzt und vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten Extinktionswerte zur eingesetzten PQ-Konzentration. **b) Wasserstoffperoxidverbrauch von Leber-, Lungenhomogenaten aus der Ratte und Homogenat aus H322-Zellen als Maß für die Katalaseaktivität:** Dargestellt ist die Extinktion bei 240 nm zur Zeit in min nachdem H₂O₂ (24 mM) zum Ansatz gegeben wurde. Eingesetzt wurden 625 μg H322 und Lungenhomogenat, aber nur 36,5 μg Leberhomogenat. Zum Vergleich sind die Extinktionen von KCl-Puffer/Ethanol und KCl-Puffer/Ethanol/ H₂O₂ über die Zeit aufgetragen.

4.4 Enzymaktivitätsbestimmungen

Um die Ergebnisse aus den mRNA-Expressionsexperimenten mit der funktionellen Aktivität der untersuchten Enzymsysteme zu vergleichen, wurden die Enzymassays für Katalase und Cu/Zn-SOD gewählt (Abb. 13). Die Sensitivitätsschwellen dieser photometrischen Assays liegen relativ hoch, so dass hohe Aktivitäten bzw. viel Ausgangsmaterial benötigt werden. Die maximal einsetzbare Menge an Zellhomogenat wird durch die höhere Eigenabsorption schnell begrenzt. Auf Grund der geringen Aktivitäten in Lungenzellen und der begrenzten Zellausbeute aus der Alveolar TypII-Zellpräparation konnten die Aktivitäten der Katalase und Cu/Zn-SOD in diesem Zelltyp nicht bestimmt werden. Um die Messmethoden zu optimieren bzw. nahe der Bestimmungsgrenze reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde mit Homogenat aus Gesamtleber bzw. Lungengewebe begonnen.

Für die Superoxiddismutasebestimmung konnten auch für Homogenate aus Zellkulturansätzen der H322 und H358 reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die Messung der Katalaseaktivität in H322 und H358 war nicht reproduzierbar, da die Aktivitäten im maximal einsetzbaren

Zellhomogenat an der Nachweisgrenze der Messmethode lagen (Abb. 12b).

4.4.1 Kupfer/Zink-Superoxiddismutase

Die Cu/Zn-SOD-Aktivitäten differieren zwischen den Organsystemen. Das Gesamtlebergewebe zeigt die höchste Grundaktivität, die Homogenate aus dem Gesamtlungengewebe besitzen nur etwa die Hälfte der Leberaktivität. Bei der vergleichweisen Messung in Schnitten aus der Rattenlunge wurde eine Abnahme der Enzymaktivität über die Kulturdauer gefunden (nach fünf Tagen nur noch 60% der Aktivität nach 12 h). Die Kulturen von H322 hatten eine vergleichbare Superoxiddismutaseaktivität wie Gesamtlungengewebe. Kulturen von H358 lagen etwas darunter (Abb. 13a). Werden Kulturen von H322 und H358 über 20 h mit PQ (50 μ M) oder H₂O₂ (100 μ M) inkubiert, findet sich eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität in beiden Tumorzelllinien. Dabei ist die Aktivitätssteigerung durch PQ geringfügig höher (Abb. 13c).

4.4.2 Katalase

Die Enzymaktivität von Katalase ist in Homogenaten aus Lebergewebe 25 mal höher als in Lungengewebe. Auch hier fiel die Aktivität des Enzymes über die Kulturdauer in Lungenschnitten vom 1. zum 5. Kulturtag um ca. die Hälfte. Die Tumorkulturen H322 und H358 zeigten nur Aktivitäten zwischen 0,4% und 0,5% der Leberaktivität (Abb. 13b). Eine reproduzierbare Messung war nicht möglich. Nach einer Inkubation mit PQ (50 μ M) bzw. H₂O₂ (100 μ M) über 20 h konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 13d).

4.5 Untersuchungen zur mRNA-Expression

4.5.1 Über die Kulturdauer in Alveolar TypII-Zellen

Um den Einfluss der Kulturdauer auf die AOE zu erfassen, wurde die mRNA-Expression für Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und Katalase untersucht. Die Zellen wurden maximal vier Tage kultiviert, da es bei längerem Kulturverlauf zu fortschreitendem Absterben der Alveolar TypII-Populationen kam. Bis zum vierten Kulturtag blieb die β -Aktin mRNA-Expression konstant, wodurch eine unspezifische Veränderung des allgemeinen RNA-Expressionsmusters durch die Kulturdauer ausgeschlossen werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede für die Enzymexpression für Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und Katalase bis zum vierten Kulturtag gefunden werden (Abb. 14b).

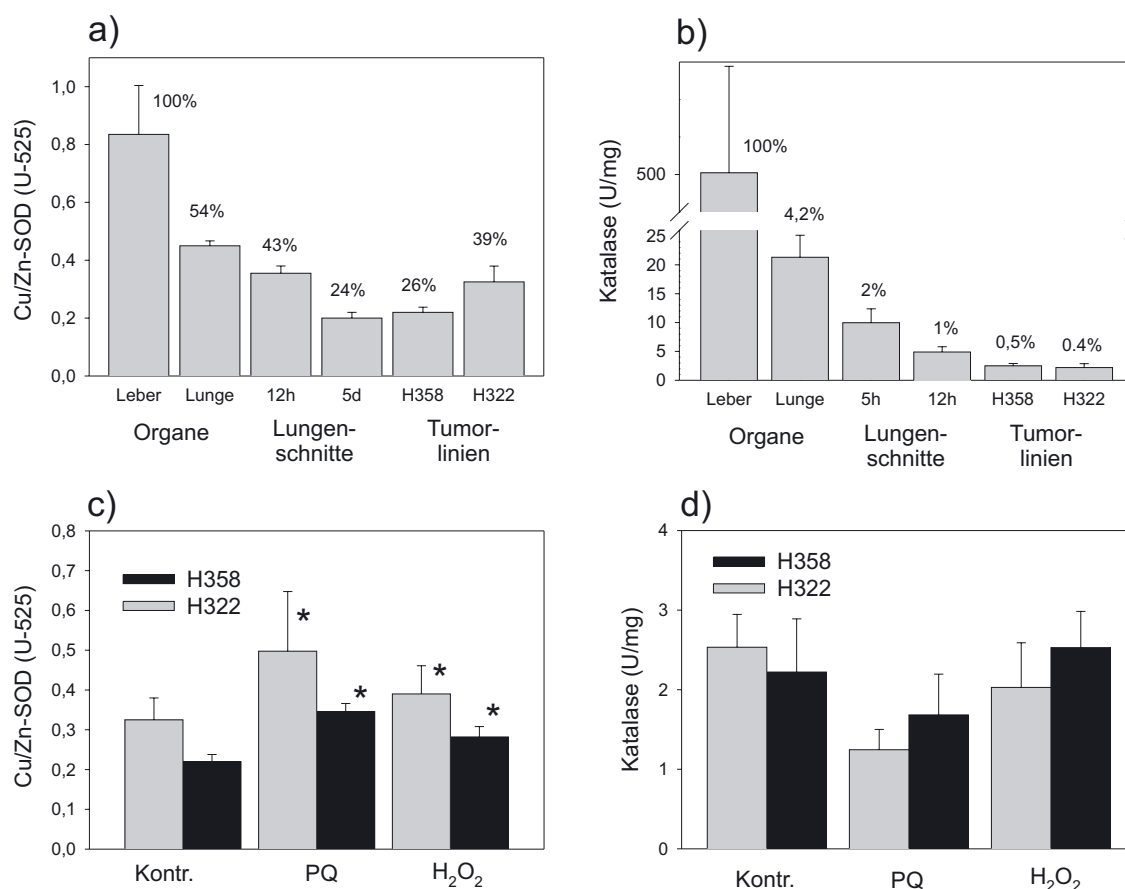


Abbildung 13: **Cu/Zn-SOD- und Katalaseaktivitäten in Homogenaten von Gesamtleber, Gesamtlunge, Lungenschnitten in Kultur aus der Ratte und Zellen der Tumorklinien H322 und H358. Einfluss von PQ und H₂O₂ in Kulturen von H322 und H358 auf die Enzymaktivitäten:**
a) und c) Cu/Zn-SOD: Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten Aktivitäten in U-525 und die prozentualen Aktivitäten zu Gesamtlebergewebe bei einem Homogenateinsatz von 625 μg Gesamtprotein Leber- (n=5), Lungen- (n=5), Lungenschnittpräparationen (n=2), Kulturansätzen H322/H358 (n=5). Zellkulturen von H322 und H358 wurden für 20 h mit PQ (50 μM) oder H₂O₂ (100 μM) inkubiert. Die Kontrollen erhielten ausschließlich Normalmedium. Dargestellt sind die absoluten Messwerte $\pm S_E$ der Cu/Zn-SOD- Aktivitäten in U-525 bei einem Homogenateinsatz von 626 μg Gesamtprotein, (n=4), * p < 0,05 zur jeweiligen Kontrolle ohne Behandlung.
b) und d) Katalase: Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten Katalase-Aktivitäten in U/mg aus den negativen Anstiegen des H₂O₂-Verbrauchs und die prozentualen Aktivitäten zu Gesamtlebergewebe, Leber- (n=4), Lungen- (n=5), Lungenschnittpräparationen (n=2), H322 (n=10), H358 (n=4). Zellkulturen von H322 und H358 wurden für 20 h mit PQ (50 μM) oder H₂O₂ (100 μM) inkubiert. Die Kontrollen erhielten ausschließlich Normalmedium. Dargestellt sind die absoluten Messwerte $\pm S_E$ in U/mg, H322 (n=7), H358 (n=5).

4.5.2 Nach PQ- oder H₂O₂-Inkubation in Alveolar TypII-Zellen

Um den Einfluss von ROS auf die Expression von AOE in Alveolar TypII-Zellen zu untersuchen, wurden Primärkulturen am dritten Kulturtag mit H₂O₂ (50 μM , 100 μM) sowie PQ (10 μM , 50

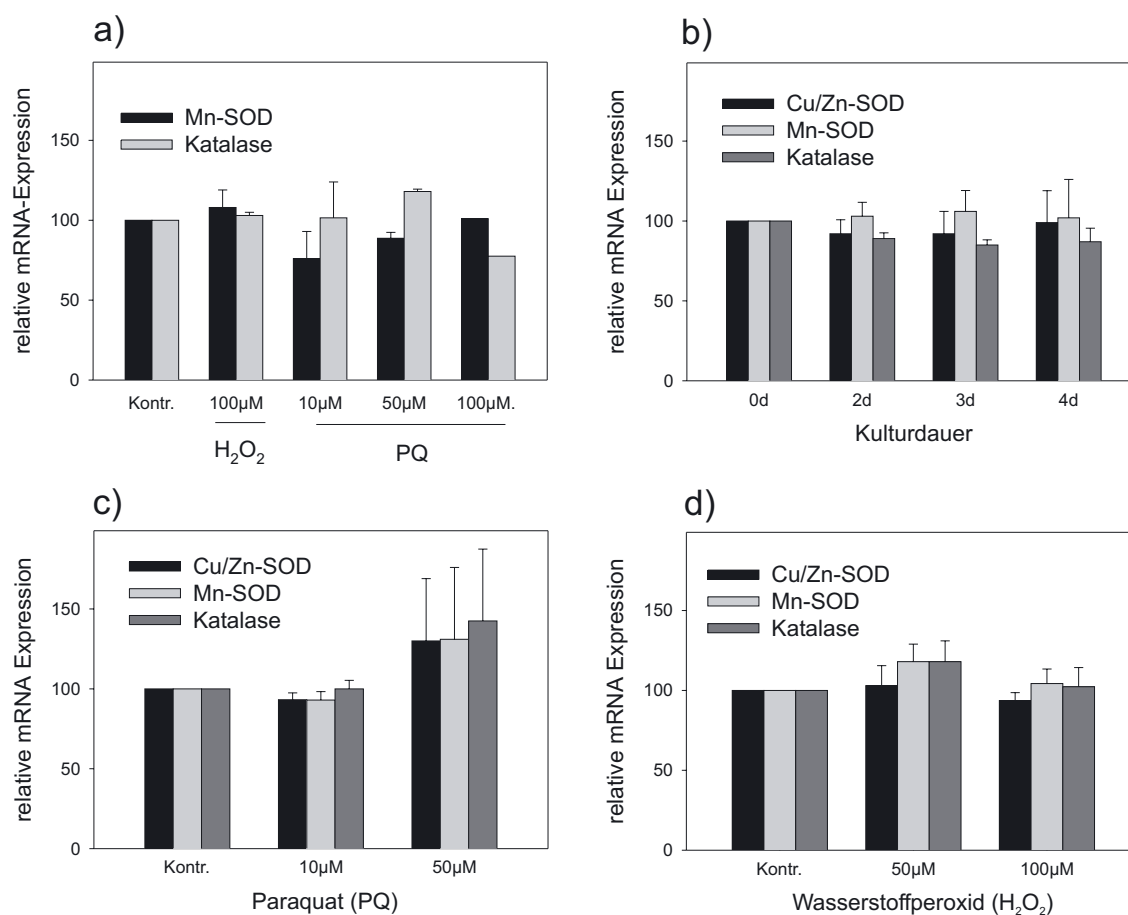


Abbildung 14: Einfluss der Kulturdauer und PQ oder H_2O_2 -Inkubation über 20 h auf die mRNA-Expression von Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD in Primärkulturen von Alveolar TypII-Zellen. **a) Northern-Blot-Analytik:** Pro Probe wurden 20 μg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Katalase und Mn-SOD mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer 32 Phosphor-markierten Katalase bzw. Mn-SOD-spezifischen Sonde. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der resultierenden Northern-Blot-Analysen aus den Mittelwerten $\pm S_E$ PQ 50 μM (n=3), H_2O_2 100 μM (n=2), PQ 10 μM (n=2), PQ 100 μM (n=1). **b)-d) PCR-Analytik:** Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte für Katalase, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD und β -Aktin an **b)** den Kulturtagen 0 bis 4 und nach **c)** PQ- (10 μM , 50 μM) oder **d)** H_2O_2 - Inkubation (50 μM , 100 μM). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der relativen Expression zum Präparationsstag aus drei unabhängigen Präparationen (Tag 0-3 n=3, Tag 4 n=2), bzw. die relativen Expressionsänderungen zu Zellkulturen ohne Behandlung (n=3, für PQ 50 μM n=2). Eingerechnet ist das jeweilige Verhältnis zur β -Aktin-Expression.

μM) in schwach toxischen Konzentrationen für 20 h inkubiert. Die Vitalität lag in diesem Bereich bei 85 - 95%. Mittels RT-PCR wurden die Expression von Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und Katalase untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Enzym-Expression (Abb. 14c, d). In der mit der Northern-Blot-Analytik untersuchten mRNA konnten ebenso keine

signifikanten Differenzen für die Mn-SOD- und die Katalase-Expression gefunden werden (Abb. 14a).

4.5.3 Über die Kulturdauer in NHBEZ

In den Kulturen von NHBEZ finden sich mittels RT-PCR-Analytik starke interindividuelle Unterschiede für Katalase und Mn-SOD über den Verlauf der verschiedenen Kulturgenerationen. Es wurde eine Steigerung der Katalase- und Mn-SOD-Expression zwischen der ersten und zweiten Generation (erste Auswachskultur ca. 2 - 3 Wochen, zweite Auswachskultur nach weiteren 2 - 3 Wochen) gefunden. Die Signifikanzniveaus lagen für Katalase bei $p=0,124$ und für Mn-SOD $p=0,645$ ($n=4$), sie sind den interindividuelle Unterschiede und den geringen Patientenzahlen geschuldet (Abb. 15a).

4.5.4 Nach PQ- oder H₂O₂-Inkubation in NHBEZ

Wurden Kulturen von NHBEZ in der ersten Generation mit Paraquat (50 μM) oder H₂O₂ (100 μM) für 20 h inkubiert, fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD (Abb. 15b).

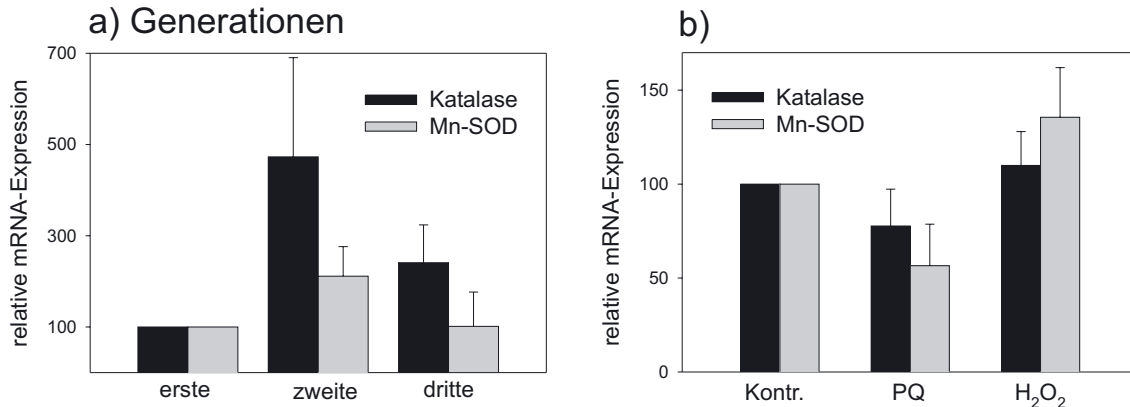


Abbildung 15: **Einfluss a) der Generationen und b) der PQ- oder H₂O₂-Inkubation (20 h) auf die mRNA-Expression von Katalase und Mn-SOD Kulturen von NHBEZ mit PCR-Analytik:** Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte für Katalase und Mn-SOD bis zur dritten Generation und nach PQ- (50 μM) oder H₂O₂-Inkubation (100 μM). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der relativen Expression zur ersten Generation aus vier unabhängigen Präparationen (erste $n=4$, zweite $n=4$, dritte $n=2$), bzw. die relativen Expressionsänderungen zu Zellkulturen ohne Behandlung ($n=3$). Eingerechnet ist das jeweilige Verhältnis zur β -Aktin-Expression.

4.5.5 Nach PQ- oder H₂O₂-Inkubation in humanen Karzinomlinien H322 und H358

Nach einer Inkubation 90% konfluente Kulturen von H322 und H358 mit PQ (50 μ M) und H₂O₂ (100 μ M) für 20 h, fanden sich in beiden Zelllinien keine Veränderungen der mRNA Expression für KAT und Mn-SOD, weder in der Northern-Blot-Analytik (nicht dargestellt) noch in der RT-PCR- Analytik (Abb. 16).

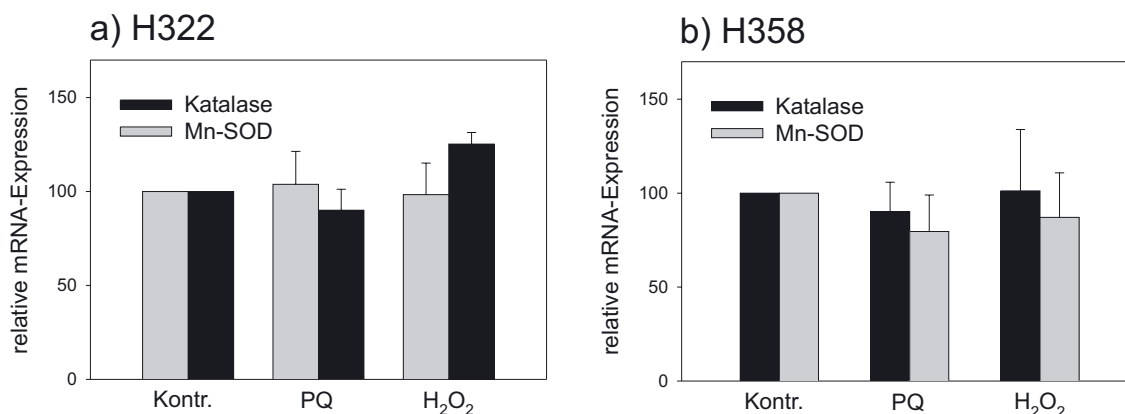


Abbildung 16: **Einfluss der Kulturdauer und PQ oder H₂O₂ (20 h) auf die mRNA-Expression von Katalase und Mn-SOD in den Tumorzelllinien H322 und H358 mit PCR-Analytik:** Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte für Katalase und Mn-SOD nach PQ- (50 μ M) oder H₂O₂- Inkubation (100 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ der relativen Expressionsänderungen zu Zellkulturen ohne Behandlung (H322 n=4, H358 n=5). Eingerechnet ist das jeweilige Verhältnis zur β -Aktin-Expression.

4.6 Untersuchungen im Mikrosomensystem

4.6.1 NADPH-Verbrauchsmessung

Die NADPH-Verbrauchsraten mit und ohne PQ von Mikrosomenpräparationen aus Leber- und Lungengewebe wurden in einem Ansatz aus PBS-HEPES (ad 1000), Mikrosomenfraktion (50 μ g Gesamtprotein), NADPH (300 μ M) und PQ (100 μ M oder 1 mM) bestimmt. Die Zugabe von Mikrosomenfraktionen zum Ansatz aus PBS und NADPH führt zum sofortigen, wenn auch nur geringem Verbrauch von NADPH. Es gibt also noch andere NADPH-verbrauchende Enzymsysteme in der Mikrosomenpräparation. Befindet sich nur PQ und NADPH im Ansatz, findet keine Reaktion statt. Die Anwesenheit von PQ führt zu einem konzentrationsabhängigem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, so stieg sie bei einer Endkonzentration von 1 mM Paraquat um das 5-fache (Tab. 3). Die Lebermikrosomenfraktionen zeigen eine deutlich stärkere Reaktionskraft

als Lungenmikrosomenfraktionen (Abb. 17a). Die Zugabe von SOD hatte keinen Einfluss auf diese Reaktion (nicht dargestellt).

4.6.2 Sauerstoffverbrauchsmessung

Die Sauerstoffverbrauchsraten von Mikrosomenpräparationen aus Leber- und Lungengewebe mit und ohne PQ wurden in einem Ansatz aus PBS-Hepes (ad 1600), Mikrosomenfraktion (50 μg Gesamtprotein), NADPH (300 μM) und PQ (1 mM) im Oxygraph bestimmt. Im Ansatz aus Mikrosomen und Puffer wurde ohne NADPH kaum Sauerstoff verbraucht. Die Zugabe von NADPH startete die Reaktion, welche aber schnell wieder abflachte. Die mehrmalige Zugabe von NADPH führte immer wieder zum Anschlag der Reaktion (Abb. 8). Mikrosomen aus dem Lebergewebe verbrauchten 1,7 mal mehr Sauerstoff als Lungenmikrosomen. Die Zugabe von PQ führte in beiden Untersuchungsobjekten zu einer deutlichen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit: um Faktor 2,7 für Lunge und 2,8 für Leber (Tab. 3, Abb. 17b). Die Zugabe von SOD im Überschuss beeinflusste die Reaktion nicht. Der Zusatz von Katalase bewirkt einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Reaktionsansatz. Die Zugabe von NDT führt zum sofortigen Verschwinden von Sauerstoff (nicht dargestellt).

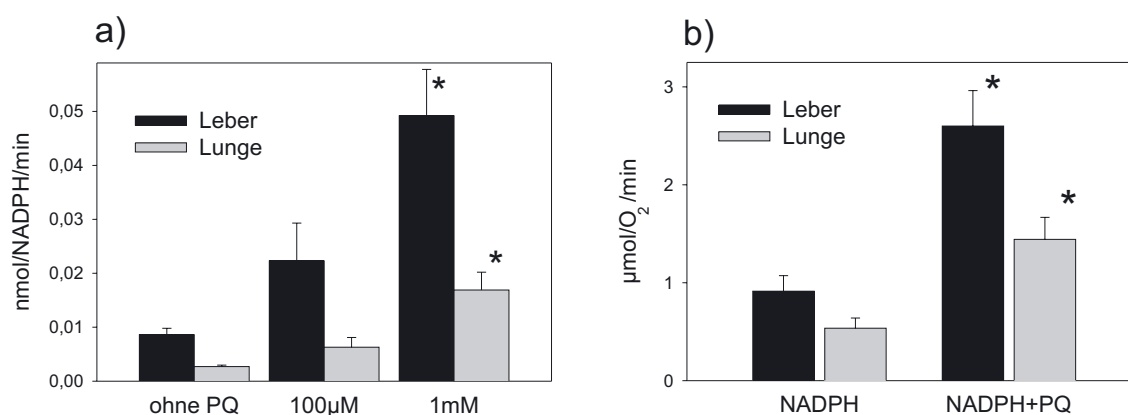


Abbildung 17: **a) Einfluss von PQ auf den NADPH-Verbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Leber- und Lungengewebe der Ratte:** Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten NADPH-Verbrauchsraten in nmol pro Minute ($n=3-5$) * $p < 0,05$ zur Kontrolle. **b) Einfluss von PQ auf den Sauerstoffverbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Leber- und Lungengewebe der Ratte:** Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten Sauerstoffverbrauchsraten in nmol pro Minute ($n=5-6$), * $p < 0,05$ zur Kontrolle ohne PQ.

4.6.3 Superoxidquantifizierung

Lucigeninchemolumineszenz Der Zusammenhang der Entstehung von Chemolumineszenz (CL) durch Mikrosomenfraktionen in Abhängigkeit von PQ wurde in einem Bioluminat mit Hilfe von Lucigenin untersucht. Erst die Zugabe der Mikrosomen bzw. von NADPH startete die Reaktion in einem Ansatz aus Mikrosomenfraktionen aus Rattenleber (50 μg , Gesamtprotein), PBS-Hepes (pH 7,4, ad 1000 μl), Lucigenin (50 μM) und NADPH (300 μM). Befand sich PQ (50 μM) im Ansatz, konnte bei den untersuchten Konzentrationen keine Veränderung der Chemolumineszenz festgestellt werden (Abb. 18a). Im Bereich von 0,1 mM bis 5 mM PQ ließ sich ebenfalls keine Konzentrationsabhängigkeit auf PQ nachweisen, tendenziell wurde aber eine Hemmung der CL von Mikrosomenfraktionen ohne PQ festgestellt (Daten sind nicht dargestellt). Die Mikrosomen aus Lebergewebe führten zu einer stärkeren CL als Mikrosomen aus dem Lungengewebe. Die Zugabe von SOD im Überschuss (5 μl u.v.) führte mit und ohne PQ zu einer Hemmung der CL um ca. 30%. Wurde Katalase (10 μl u.v.) hinzugegeben, zeigte sich keine Änderung.

DPI (Diphenyleiodonium Sulfat) ist ein spezifischer Hemmer für NADPH-Reduktasen [89]. Eine DPI-Vorinkubation des Reaktionspuffers über 10 min zeigte einen gleichen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, führte aber zu einem rascheren Abfall der CL. Nach einer DMSO-Vorinkubation (Dimethylsulfoxid) über 10 min halbierte sich die CL bei gleichen Anstiegen (Abb. 18b).

	LEBER (50 μg)		LUNGE (50 μg)	
	OHNE PQ	PQ (final 1mM)	OHNE PQ	PQ (final 1mM)
NADPH (nmol/min)	0,0086 \pm 0,0012 (n=4)	0,0492 \pm 0,0086 (n=5)	0,0027 \pm 0,00027 (n=5)	0,0169 \pm 0,0033 (n=5)
O₂ (nmol/min)	0,913 \pm 0,159 (n=5)	2,6 \pm 0,362 (n=5)	0,535 \pm 0,104 (n=6)	1,443 \pm 0,224 (n=6)
FORMAZAN (nmol/min)	0,00922 (n=1)	0,0083 (n=1)	0,00198 (n=1)	0,00147 (n=1)

Tabelle 3: **Gegenüberstellung der NBT, NADPH und O₂ Raten:** Angabe der Mittelwerte $\pm S_E$. Ansatz aus 50 μg Mikrosomenfraktionen in PBS (pH 7,4), NADPH (0,2 mM), ohne PQ oder mit PQ (1 mM).

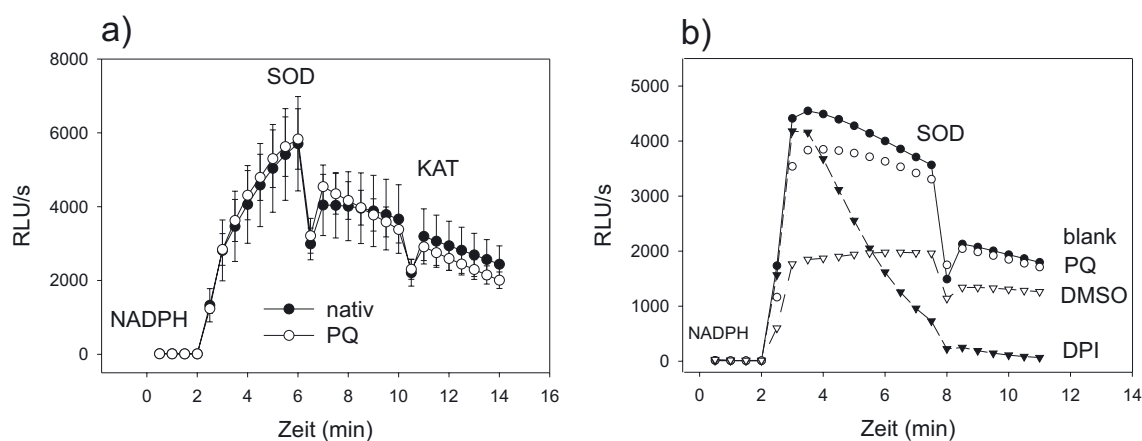


Abbildung 18: **a) Einfluss von PQ, SOD und Katalase auf die Lucigeninchemolumineszenz von Mikrosomenfraktion aus Rattenleber:** Mikrosomenfraktion aus Rattenleber (50 μg Gesamtprotein) in PBS-Hepes (pH 7,4 ad 1000 μl), Lucigenin (50 μM), NADPH (300 μM), SOD (5 μl uv) und Katalase (10 μl uv) einmal mit PQ (50 mM) und einmal ohne PQ. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm S_E$ von drei unabhängigen Messungen. **b) Einfluss von DPI und DMSO-Vorinkubation auf die Lucigeninchemolumineszenz von Mikrosomenfraktion aus Rattenleber:** Mikrosomenfraktion aus Rattenleber (50 μg Gesamtprotein) in PBS-Hepes (pH 7,4 ad 1000 μl), Lucigenin (50 μM), NADPH (300 μM), SOD (5 μl uv) und Katalase (10 μl uv) einmal mit PQ (50 mM) und einmal ohne PQ und je einmal mit DPI-Vorinkubation 10 μl für 10 min, DMSO-Vorinkubation 10 μl für 10 min.

Nitrobluetetrazolium (NBT) Der Einfluss von Paraquat und Superoxiddismutase auf die Formazanbildung aus NBT durch Leber- oder Lungenmikrosomen aus der Ratte wurde im Spektrophotometer bei 570 nm untersucht. Leber- und Lungenmikrosomenfraktionen der Ratte (50 μg Gesamtprotein), in PBS-Hepes (pH 7,4, ad 1000 μl), NBT (10 μM) und NADPH (300 μM) wurden mit PQ (1 mM) und ohne PQ untersucht. Die Zugabe von NADPH oder Mikrosomen zum Ansatz startete die Reaktion. Die Lebermikrosomen besaßen eine 5-fach stärkere Aktivität als die Lungenmikrosomen (Tab. 3). Die Zugabe von SOD (5 μl u.v.) im Überschuss, führte zu einer Hemmung der Reaktion um maximal ein viertel. PQ in einer Endkonzentration von 1 mM hemmte die Reaktion um 10% - 25% (Daten sind nicht dargestellt).

4.7 Untersuchungen zur Paraquat vermittelten Radikalgenerierung

Eine Möglichkeit freie Radikale direkt nachzuweisen, ist die spektroskopische Technik der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR). Die z.T. extreme Kurzlebigkeit reaktiver Strukturen begrenzen jedoch deren Detektionsmöglichkeiten. Nur stabile bzw. sehr langsam reagierende Radikale sind direkt nachweisbar. Bestimmte Radikale lassen sich unter besonderen Bedingungen wie unter

stark alkalischem pH-Wert, unter anaeroben Verhältnissen oder bei niedrigen Temperaturen stabilisieren. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises kurzlebiger Radikale ist das Binden an Detektormoleküle, das sogenannte Einfangen (trapping) der Radikale. Das Radikal reagiert mit diesem Trap-Molekül und es entsteht ein relativ stabiles radikalische Produkt. Zum Nachweis der sehr kurzlebigen Hydroxylradikale wurde DEPMPO (5-Di-ethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid) verwendet.

4.7.1 Generierung des PQ-Radikals

Das blaue PQ-Radikal ($\text{PQ}^{\bullet+}$) wurde durch chemische Reduktion mittels Natriumdithionit (NDT) und durch ein Enzymsystem mittels Xanthin und Xanthinoxidase (X/XO) generiert. Das $\text{PQ}^{\bullet+}$ besitzt eine tiefblaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 603 nm und 396 nm und eine typische 35-gipflige Hyperfine-Struktur. Über den molaren Extinktionskoeffizienten bzw. den Vergleich mit einem bekannten Spin-Standard ist eine Quantifizierung des $\text{PQ}^{\bullet+}$ möglich. Als Spin-Standard diente das stabile paramagnetische Ultramarin mit einer Spinzahl von $3,61 \times 10^{16}$.

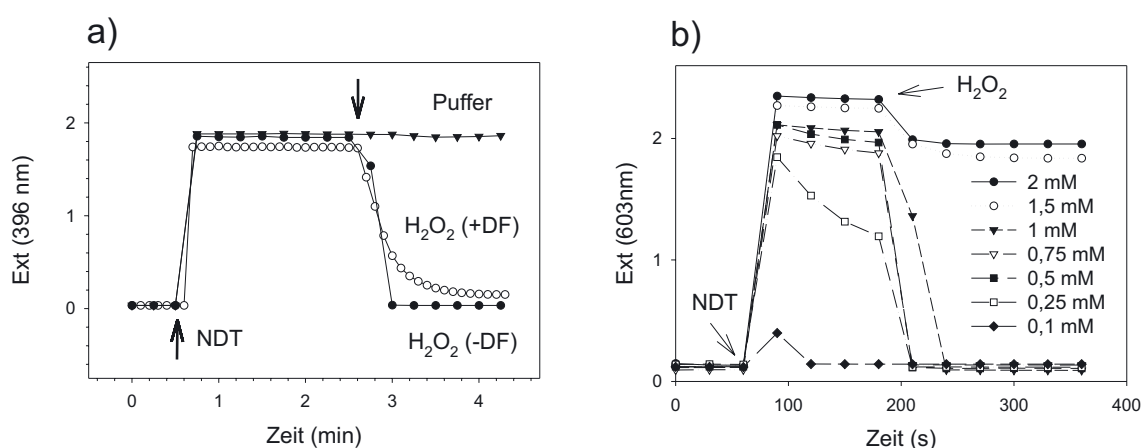


Abbildung 19: **a) Einfluss von Desferoxamin auf die Generierung des PQ-Radikals durch NDT und die Löschung des Signals durch H_2O_2 :** Ansatz aus PBS (pH 7,4 ad 1 ml), mit N_2 -Begasung in luftdichter Küvette, PQ ($50 \mu\text{M}$), Reaktionsstart mit NDT ($0,6 \text{ mM}$). Die Zugabe von H_2O_2 ($0,5 \text{ mM}$) oder Puffer nach 2,5 min. Desferoxamin Vorinkubation ca. 30 min 1 mM . **b) Entstehung des PQ-Radikals durch NDT in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration NDT:** Ansatz: PBS, PQ ($500 \mu\text{M}$), H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$), NDT ($0,1\text{-}2 \text{ mM}$).

Chemische Generierung mittels Natriumdithionit In Gegenwart von NDT wird PQ^{2+} zu $\text{PQ}^{\bullet+}$ reduziert. In einem Ansatz aus PBS (pH 7,3 ad $1000 \mu\text{l}$) und PQ ($50 \mu\text{M}$) wird PQ^{2+} unter anaeroben Bedingungen sofort nach der Zugabe von NDT ($0,5 \text{ mM}$) zu $\text{PQ}^{\bullet+}$ reduziert.

Dabei ist die reduzierte PQ-Menge von der eingesetzten NDT-Konzentration (0,1 mM bis 2 mM) abhängig. Um eine maximale Reduktion von PQ^{2+} zu erreichen, ist etwa die 3-fache NDT-Konzentration notwendig. In den Standardexperimenten wurde eine ca. 10-fache NDT-Menge eingesetzt (0,6 mM NDT und 50 μM PQ). Über den molaren Extinktionskoeffizienten ergibt sich eine rechnerische Konzentration von $41 \pm 1,0 \mu\text{mol}$. Die Zugabe von H_2O_2 (5 μl N_2 begast, final 500 μM) in die Küvette führte zum sofortigen Abfall der Extinktion. Eine analoge Zugabe von 5 μl PBS-Puffer änderte die Extinktion nicht. Die Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (1 mM) über 30 min zeigte keinen Einfluss auf diese Reaktionen.

Eine Natriumdithionitlösung (100 mM) zeigte in der ESR-Spektroskopie das typische eingipflige Signal für schwefelzentrierte Radikale (Abb. 26a). In einem Ansatz aus NDT (0,6 mM) und PQ (50 μM) zeigte sich unter anaeroben Bedingungen das $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Signal (Abb. 20a). Über die doppelte Integration der Fläche und dem Vergleich mit dem Ultramarinstandard errechnete sich ein Konzentration von $46,2 \pm 5 \mu\text{M}$ (Tab. 4). Die Zugabe von H_2O_2 (3 μl N_2 begast, 100 μM) direkt in die Messkammer der Flachzelle führte zum Auslöschen des $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Signals, wogegen die vergleichsweise Zugabe von 3 μl PBS-Puffer zu keiner Veränderung führte (Abb. 20b, c). Die Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (1 mM) über 30 min zeigte keinen Einfluss auf diese Reaktionen.

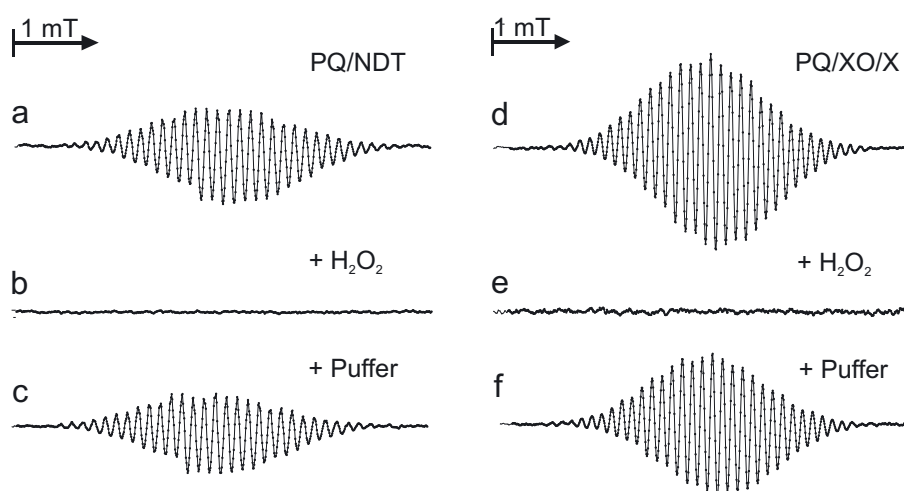


Abbildung 20: **Das PQ-Radikal in der ESR und der Einfluss von H_2O_2 a) bis c) durch Natriumdithionit (NDT):** Ansatz PQ^{2+} (50 μM) in PBS (pH 7,4) durch NDT (0,6 mM) zu **a)** $\text{PQ}^{\bullet+}$, **b)** Zugabe von 5 μl H_2O_2 (100 mM) direkt in den Messbereich der Flachzelle führte zum Auslöschen des Signals wogegen **c)** die Zugabe von 5 μl Puffer nur zur partiellen Löschung führte. **b) bis f) durch Xanthin und Xanthinoxidase (XO/X):** **a)** Ansatz aus PQ (1 mM), X (0,2 mM) und XO ca. 60 mU, **b)** Zugabe von 3 μl H_2O_2 (100 mM) direkt in den Messbereich der Flachzelle führte zum Auslöschen des Signals wogegen **c)** die Zugabe von 3 μl Puffer nur zur partiellen Löschung führte.

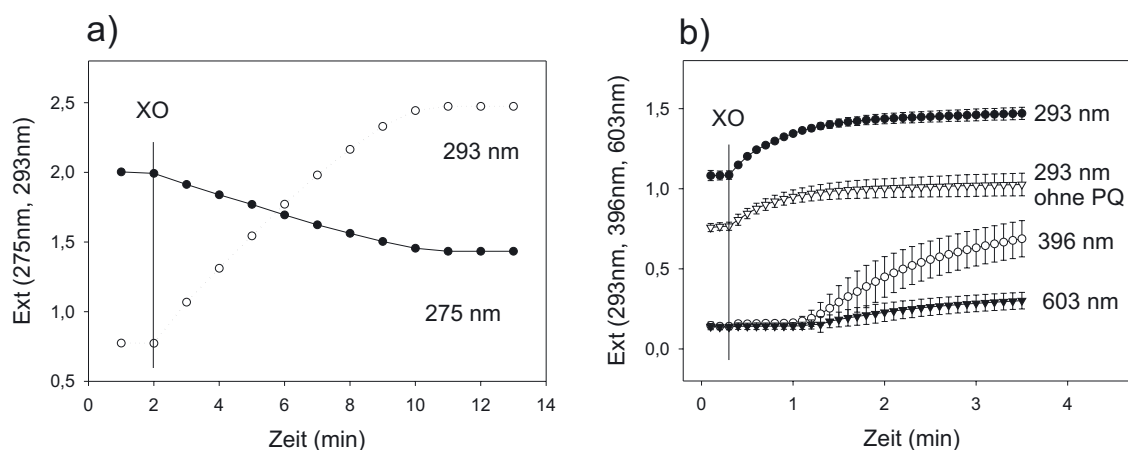


Abbildung 21: **Messung der Harnsäurebildung, des Xanthinverbrauchs und der PQ-Radikalbildung mittels XO/X:** a) Gezeigt ist der Verbrauch von Xanthin (275 nm) und die Entstehung von Harnsäure (293 nm) unter aeroben Bedingungen. b) Gezeigt ist die Extinktion bei 293 nm im Harnsäuremaximum, bei 396 nm und bei 603 nm für PQ^{2+} (PBS pH 7,4 ad 1 ml, X 0,2 mM, PQ (1 mM), Reaktionsstart mit 40 mU XO).

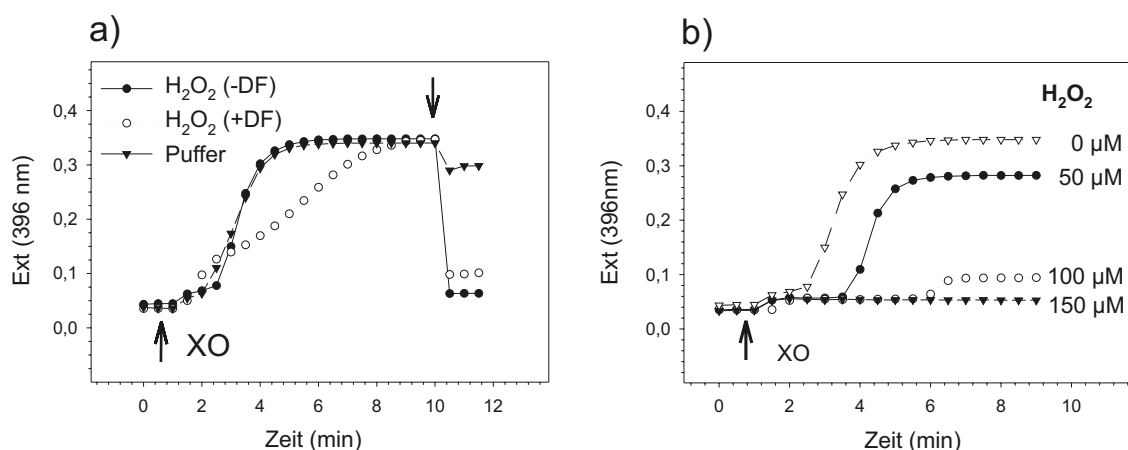


Abbildung 22: **a) Einfluss von Desferoxamin auf die Generierung des PQ-Radikals durch XO/X und die Löschung des Signals durch H₂O₂:** Ansatz PBS pH 7,4 ad 1000 µl, mit N₂-Begasung in Spezialküvette, PQ (50 µM), X (0,2 mM), Reaktionsstart mit XO (ca. 104 mU), Zugabe von 5 µl H₂O₂ (10 mM) oder 5 µl Puffer nach 10 min. Desferoxamin Vorinkubation ca. 30 min 1 mM. Gezeigt sind die Mittelwerte PBS n=4, Kontrolle Puffer n=2, Desferoxamin n=4.
b) Einfluss von H₂O₂ im Ansatz auf die Generierung des PQ-Radikals durch XO/X: Ansatz: PBS pH 7,4 ad 1000 µl, mit N₂-Begasung in Spezialküvette, PQ (50 µM), (0,2 mM), H₂O₂ (0 - 150 µM) Reaktionsstart mit XO (ca. 104 mU).

Enzymatische Generierung durch Xanthinoxidase Die Xanthinoxidase kann PQ^{2+} als Elektronenakzeptor verwenden und ein Elektron auf PQ^{2+} übertragen. In einem wässrigen System

		PQ^{•+} (μmol)		
		UV-VIS	ESR	
PQ²⁺/NDT	DF		vor H ₂ O ₂	nach H ₂ O ₂
1 mM/5 mM		n.b.	562 ± 25 (n=13)	0,0
0,05 mM/0,6 mM		41,0 ± 1,1 (n=5)	46,2 ± 5,0 (n=10)	0,0
0,05 mM/2,0 mM		39,3 ± 1,0 (n=5)	25,9 ± 5,4 (n=3)	17,2 ± 9,1 (n=3)
0,1 mM/2,0 mM	1,0 mM	73,8 ± 0,9 (n=5)	66,2 ± 10,1 (n=8)	7,6 ± 3,8 (n=3)
0,1 mM/2,0 mM		68,0 ± 0,9 (n=5)	67,4 ± 18,2 (n=4)	0,0
PQ²⁺/X/OX				
1,0 mM/0,2 mM/60 mU		70,3 ± 1,9 (n=5)	31,0 ± 3,5 (n=8)	0,0
0,1 mM/0,2 mM/60 mU		9,7 ± 0,7 (n=3)	13,0 ± 1,6 (n=3)	0,0

Tabelle 4: **PQ-Radikalkonzentration:** mittels UV-VIS und Berechnung über den molaren Extinktionskoeffizienten oder durch Vergleich mit einem Spin-Standard in der ESR (n.b. nicht bestimmbar).

aus Xanthin und Xanthinoxidase ließ sich die Harnsäureentstehung (Absorptionsmaximum 293 nm) und der Xanthinverbrauch (Absorptionsmaximum bei 275 nm) parallel spektrophotometrisch beobachten. Ein Standardansatz bestand aus PBS (pH 7,4, ad 1000 μl), Xanthin (200 μM), und Xanthinoxidase (ca. 40 mU) (Abb. 21a). Unter anaeroben Bedingungen wurde in diesem System nur wenig Harnsäure gebildet (Abb. 21b). Befand sich PQ im System, konnte im Oxygraph beobachtet werden, dass in einem Ansatz aus PBS (pH 7,4 ad 1600), Xanthin (200 μM), Xanthinoxidase (30 mU) und PQ (1 mM) innerhalb weniger Minuten sämtlicher Sauerstoff verbraucht wird. Durch die Zugabe von Katalase (5 μl u.v.) ließ sich über die entstehende O₂-Menge eine Aussage über die gebildete Menge H₂O₂ treffen (nicht dargestellt). Unter anaeroben Bedingungen ließ sich die Entstehung des blauen PQ-Radikals, parallel zur Harnsäurebildung spektrophotometrisch beobachten. In einem Ansatz aus PBS (pH 7,3 ad 1000 μl), PQ (50 μM), Xanthin (0,2 mM) und Xanthinoxidase (60 mU) wurde unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 10 min eine bestimmte Menge PQ²⁺ zu PQ^{•+} reduziert. Es fanden sich etwa 10% der eingesetzten PQ²⁺-Menge im reduzierten Zustand (Tab. 4). Die direkte Zugabe von H₂O₂ (final 50 μM) in die Küvette führte zum sofortigen Abfallen der Extinktion. Die analoge Zugabe von 5 μl PBS-Puffer änderte die Extinktion nicht. Eine Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (1 mM) über 30

min führte zu einer leichten Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit, die maximal reduzierbare Menge $\text{PQ}^{\bullet+}$ (10% von PQ^{2+}) wurde aber auch hier erreicht (Abb. 22a). Wurde bereits vor dem Reaktionsstart mit Xanthinoxidase, H_2O_2 zwischen 50 und 100 μM in den Ansatz gegeben, wurde eine konzentrationsabhängige Verzögerung der PQ-Reduktion und eine Verminderung der maximal erreichbaren $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Menge festgestellt (Abb. 22b).

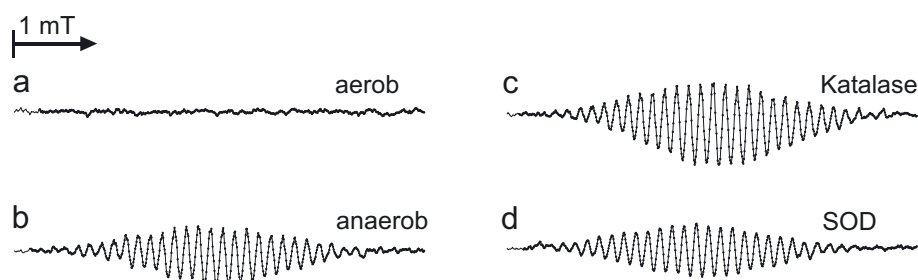


Abbildung 23: **Einfluss von Katalase und Superoxiddismutase auf das PQ-Radikal in der ESR-Spektroskopie.** Ansatz PQ (100 μM) in PBS, X (0,2 mM) und 60 mU XO. **a)** unter normal Luftsauerstoff, **b)** unter anaeroben Bedingungen, **c)** Zugabe von 10 μl Katalase (u.v.) oder **d)** 10 μl SOD (u.v.) direkt zum Reaktionsansatz.

In einem Ansatz aus PQ (1 mM) und Xanthin (0,2 mM) generierten 60 mU Xanthinoxidase unter anaeroben Bedingungen in der ESR-Spektroskopie das typische PQ-Signal (Abb. 20d). Eine Zugabe von 3 μl H_2O_2 direkt in die Messkammer der Flachküvette löschte diese Signal vollständig (Abb. 20e). Die analoge Zugabe von 3 μl Puffer verkleinerte das Signal dagegen nur um ca. 10% (Abb. 20f). Auch hier fand sich nur ein Teil der eingesetzten PQ-Konzentration in reduzierter Form wieder. Bei einem Einsatz von 1 mM PQ $31,0 \pm 3,5 \mu\text{M}$ und bei 0,1 mM PQ Einsatz $13,0 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (Tab. 4). Der Einfluss von antioxidativen Enzymen auf diese Reaktion wurde durch die Zugabe von Katalase und Superoxiddismutase im Ansatz geprüft. Beide führen zu keiner Veränderung des generierten PQ-Radikal-Signals (Abb. 23).

4.7.2 Hydroxylradikalnachweis mit Spin-Trap

Mit Hilfe der Spin-Trap DEPMPO ließ sich das Hydroxylradikal "einfangen", es zeigte ein typisches 8-gipfliges DEPMPO-OH \bullet -Addukt. Ein Standard-Addukt wurde durch NTA- Fe^{2+} und H_2O_2 generiert (Abb. 24a). Dieses Signal ließ sich nach einer Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (1 mM) nicht mehr darstellen (Abb. 24b). Mit einem Ansatz aus PBS (pH 7,4 ad 350 μl), PQ (0,1 mM), NDT (2 mM) und DEPMPO (12 mM), welcher geschüttelt wurde und dadurch Sauerstoff eingebracht wurde, ließ sich das DEPMPO-OH \bullet -Addukt gut darstellen (Abb. 24c). Befand sich kein PQ im Ansatz, konnte auch kein DEPMPO-OH \bullet -Addukt gefunden wer-

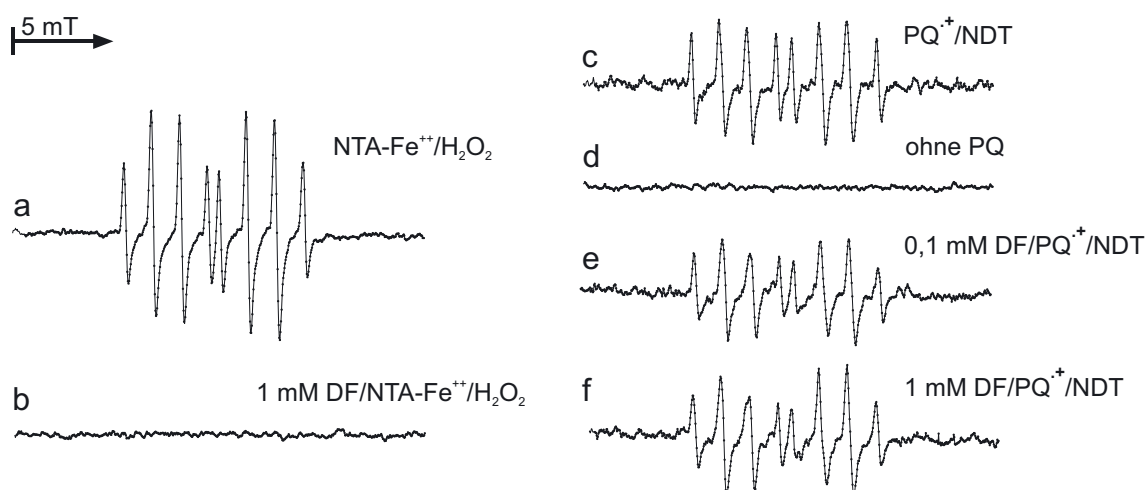


Abbildung 24: **DEPMPO- \bullet OH-Addukte Standard und mittels NDT und PQ: Standard a)** PBS (pH 7,4), DEPMPO (12 mM), H_2O_2 (0,1 mM), Reaktionsstart mit NTA-Fe^{2+} (je 0,6 mM final), **b)** gleicher Ansatz mit Desferoxamin (DF 1 mM) 30 min Vorinkubation des Puffers, **c)** PBS (pH 7,4 ad 1 ml), PQ (100 μM), NDT (2 mM), davon 330 μl plus DEPMPO (12 mM) vortexen und in die Flachzelle überführt. **d)** gleicher Ansatz wie c, nur ohne PQ, **e)** gleicher Ansatz, nur 0,1 mM Desferoxamin Vorinkubation 30 min, **f)** gleicher Ansatz, nur 1 mM Desferoxamin Vorinkubation 30 min.

den (Abb. 24d). Eine Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (0,1 oder 1 mM) über 30 min führte zu einer leichten Verminderung der Signalstärke des DEPMPO- OH^\bullet -Adduktes (Abb. 24e, f). Mit Hilfe des Standards Ultramarin war eine Quantifizierung der DEPMPO- OH^\bullet -Addukte möglich. Es errechnete sich eine DEPMPO- OH^\bullet -Addukt-Konzentration von $4,63 \mu\text{M} \pm 0,75$ ohne Desferoxamin und mit 1 mM Desferoxamin Vorinkubation von $4,21 \mu\text{M} \pm 0,82$ bei einem Verhältnis von PQ 0,1 mM und NDT 2 mM.

Eine direkte Zugabe von H_2O_2 in die Flachzelle führte dagegen nur zu sehr schwachen OH^\bullet -DEPMPO-Signalen, welche an der Nachweisgrenze des ESR-Gerätes lagen (nicht dargestellt).