

## 5 Diskussion

Im Respirationstrakt stehen die ROS und/oder freien Radikale in einem engen Zusammenhang mit der Inhalation von verschiedenen Gasen und Partikeln sowie dem systemischen Anfluten von Fremdstoffen. Zudem ist die Lunge den höchsten Sauerstoffpartialdrücken im Körper ausgesetzt. Da die ROS sehr reaktiv sind und als pathologische Faktoren wirken, haben Organismen verschiedene enzymatische und nichtenzymatische Schutzmechanismen entwickelt.

Die Beeinflussbarkeit der Expressionsmuster der antioxidativen Enzyme in der Lunge durch ROS stand in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt. Als *in vitro*-System dienten primär kultivierte Alveolar TypII-Zellen, humane Brochialepithelzellen und zwei Zelllinien aus humanen Lungenkarzinomen. Das Herbizid Paraquat wurde auf Grund seiner organspezifischen Toxizität als Generator für reaktive Sauerstoffspezies gewählt. Zum Vergleich wurde Wasserstoffperoxid in den Induktionsversuchen eingesetzt. Im weiteren wurde der Wirkungsmechanismus von Paraquat näher untersucht.

### 5.1 Primäre AII-Zellen, humane NHBEC und Tumorlinien H358/H322

Die Karzinome der Lunge bedingen den größten Teil der Gesamtmortalitätsrate durch Tumore bei Männern. Diese sind zu 90% mit der Inhalation von Tabakrauch assoziiert. Aus epidemiologischen Studien und der Arbeitsmedizin sind gewisse Risikofaktoren für bestimmte Berufsgruppen bzw. für den Umgang mit bestimmten Stoffen bekannt (z.B. Asbestarbeiter). Doch die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung in der Lunge liegen mit einer Vielzahl von Signalwegen, Transportern, Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, der gegenseitigen Beeinflussung und dem Wechselspiel mit den äußeren Einflüssen weitgehend im Unklaren [131]. In Kanzerogenitätsstudien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zellpopulationen innerhalb des Lungengewebes auf äußere Einflüsse sensitiver reagieren. Die durch NNK (4-(Methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butan), einem Nitrosamin aus dem Tabakrauch, induzierten Lungentumoren in Ratten und Mäusen gehen aus transformierten AII-Zellen oder Clarazellen hervor. Für diese beiden Zelltypen ist eine Beteiligung am Stoffwechsel von Fremdstoffen nachgewiesen [11, 12, 13, 141, 159].

Die Untersuchungen der Genexpression lassen nur einen kleinen Einblick in die zellphysiologischen Zusammenhänge zu. Es sind lediglich "Momentaufnahmen" möglich, die zudem durch die experimentellen Möglichkeiten nur eine beschränkte Aussagekraft besitzen. Um die Reaktionsmuster eines einzelnen Zelltypes separat zu untersuchen, stehen nur Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien zu Verfügung. In beiden Systemen kann die *in vivo* Situation nur annähernd nachgeahmt werden. So ist die basal-apikal-Ausrichtung von Epithelzellen, z.B. Al-

veolar TypII-Zellen (basal: Blutstrom, apikal: Luft) in einem Kulturgefäß nur mit einem hohem technischem Aufwand realisierbar. Meist muss mit einer Vereinfachung gearbeitet werden. Eine Schwierigkeit stellen dabei die phänotypischen Veränderungen als Anpassungsreaktion auf die Kulturbedingungen dar. Die Expressionsmuster und die Aktivitäten der verschiedenen Enzyme und Proteine unterliegen damit gewissen Unsicherheiten und relativ großen Schwankungen. Diese Tatsache erfordert eine möglichst konstante Einhaltung einmal festgesetzter Kulturbedingungen, da Veränderungen des Phänotyps durch die äußeren Bedingungen mit den entsprechenden Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse nur so minimiert werden können bzw. die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichbar bleiben.

Als die, der in vivo Situation am nächsten stehenden Zellkulturformen standen für diese Arbeit primär, isolierte Alveolar TypII-Zellen und humane Bronchialepithelzellen zur Verfügung. Die in vivo Kultivierung von Zellen, insbesondere von primären Kulturen, erfordert ein sehr komplexes Prozedere. Die Kulturbedingungen sollten, sofern sie einmal optimiert wurden, auf das peinlichste konstant gehalten werden, da selbst die Menge des Zellmediums einen Einfluss auf die Toxizität, z.B. von PQ zeigt [81].

Die Veränderung der metabolischen Parameter von verschiedenen Zelllinien und Primärkulturen ist in umfangreichen Studien belegt. Alveolar TypII-Zellen zeigen in der Primärkultur eine Reihe phänotypischer Veränderungen. Sie verringern die Anzahl ihrer Lamellarkörperchen, produzieren mehr Surfactant und zeigen eine Verringerung der Cytochrom P-450-Expressionsmuster [43, 64, 130].

Der Einsatz permanenter Zelllinien aus immortalisierten Zellen stellt die einfachste Möglichkeit der Zellkultur dar, da zudem auf Versuchstiere verzichtet werden kann. Doch haben permanente Zelllinien den Nachteil, dass sie primär aus Tumorzellen entwickelt werden und im Verlauf ihrer Kultivierung Veränderungen unterworfen sind, so dass die Ergebnisse nur mit Einschränkungen interpretierbar sind.

## 5.2 Radikalische Schädigung durch Paraquat und Wasserstoffperoxid

Da die reaktiven Produkte meist sehr kurzlebig sind und die zellulären Schäden von den Reparatursystemen der Zelle zum Teil sofort repariert werden, ist die Untersuchung eines radikalischen Schädigungsmechanismus relativ schwierig und stark abhängig von der gewählten Methode und dem Untersuchungssystem. Eine Möglichkeit, einen Einblick in den Wirkungsmechanismus zu bekommen, ist die Bestimmung von sog. "footprint's". Dabei werden die oxidativen Veränderungen an Molekülen, z.B. DNA (Strangbrüche) oder Folgeprodukte einer radikalischen Schädigung

gung, z.B. Lipidperoxidationsprodukte (MDA), erfasst. Die Sensitivitätsbereiche der einzelnen Methoden sind relativ unterschiedlich. So lassen sich DNA-Strangbrüche bedeutend früher als Lipidperoxidationsprodukte nachweisen, was nicht heißen muss, dass noch keine Lipidperoxidation stattgefunden hat.

In dieser Arbeit wurde Malondialdehyd (MDA) im Kulturmedium der Alveolar TypII-Zellen sowie H358 und H322 nach einer Inkubation mit PQ oder  $H_2O_2$  untersucht. MDA ist ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation und gibt Auskunft darüber, ob die verwendeten Stressoren und/oder daraus generierte ROS in der Lage sind, Lipidperoxidation an den Zellkulturen auszulösen.

Im Kulturmedium der Alveolar TypII-Zellen fand ein konzentrationsabhängiger Anstieg auf die Inkubation mit PQ und  $H_2O_2$  statt, selbst bei geringen Konzentrationen (PQ  $50 \mu M$ ,  $H_2O_2$   $100 \mu M$  mit einer Vitalität von 75% bis 85%) wurde eine signifikante Erhöhung von MDA im Kulturmedium gemessen, während sich in Kulturen der Tumorlinien H322 und H358 auf PQ kein, und auf  $H_2O_2$  erst ab 1 mM ein signifikanter Anstieg fand, welcher bei noch höheren Konzentrationen nicht weiter anstieg. Ab dieser Konzentration sind weniger als 50% der metabolischen Aktivität nachzuweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass MDA und damit die Lipidperoxidation auch in Kulturen ohne zusätzlichen oxidativen Stressor vorkommt. Primäre AII-Zellen zeigen dabei signifikant höhere MDA-Spiegel im Kulturmedium als die Tumorlinien H322 und H358. Die Tumorlinien sind demzufolge besser an den "Stress" der Kulturbedingungen angepasst. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass die Lipidperoxidation einen "normalen" Prozess in lebenden Systemen darstellt, immer und überall stattfindet und von den Reparatursystemen der Zellen erfasst werden muss. In diesen Untersuchungen mussten die Messungen der MDA-Spiegel in den Tumorlinien H322 und H358 in Alveolar TypII-Zellmedium erfolgen, da eine Messung in DEMEM, dem Standardmedium, mit der gewählten Untersuchungsmethode nicht möglich war. Auf Grund der Tatsache, dass Tumorlinien, wenn sie für 20 h im Medium für AII-Zellen kultiviert werden, fast die doppelte metabolische Aktivität wie Kontrollzellen in DEMEM zeigen, muss offen bleiben, ob das Ausbleiben von MDA typisch für diese Tumorlinien ist oder nur auf die verbesserten Kulturbedingungen zurückgeführt werden kann.

Eine Lipidperoxidation an Doppelten-Lipidmembranen ist nur möglich, wenn das reaktive Produkt in der Lage ist ein Wasserstoffatom von einer Methylengruppe der Membranfettsäuren zu entreißen. Das entstehende Kohlenstoffradikal kann wieder mit Sauerstoff reagieren und andere Peroxyl-Radikale können entstehen. Eine einzige Initiation kann, je nachdem wo das erste Wasserstoffatom abgespalten wurde, unterschiedliche Mengen an Hydroperoxidmolekülen

generieren. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid sind nicht, die Hydroxylradikale mit ihrer großen Reaktionskraft dagegen hervorragend in der Lage diese Kettenreaktion anzustoßen [61, 151]. Im Schädigungsmechanismus von PQ und  $H_2O_2$  müssen in jedem Fall Hydroxylradikale eine Rolle spielen.

Das Malondialdehyd ist nur ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation, es existiert in verschiedenen Formen und entsteht hauptsächlich bei der Peroxidation von Linolol- und Aramidolsäuren. Von Säugerzellen wird es sehr schnell zu Azetat über Malonsäure und Azetaldehyd verstoffwechselt [50]. MDA selbst besitzt noch toxische Eigenschaften und kann mit den verschiedensten Zellbestandteilen, sogar mit DNA reagieren [15]. Ein Nachweis im Kulturmedium kann nur unverstoffwechseltes und freies, außerhalb der Zellen befindliches MDA erfassen. Es muss entweder aus der intakten Zelle transportiert werden, direkt an der Oberfläche entstehen oder erst bei ihrer völligen Zerstörung freigesetzt werden. Im benutzten Untersuchungssystem ist nur die Summe dieser Vorgänge erfassbar. Aus diesem Grund spricht das Ausbleiben von MDA im Kulturmedium der Tumorlinien nicht zwingend gegen das Vorliegen eines radikalischen Schädigungsprozesses in den Zellen. Der treppenförmige Anstieg durch  $H_2O_2$  in den Tumorlinien kann eventuell mit dem vollständigen Auflösen des Zellverbandes erklärt werden.

In einem Mikrosomen-System ist die MDA-Bildung reziprok abhängig von den Konzentrationen von PQ, Sauerstoff und NADPH, der Inkubationszeit und umgekehrt reziprok dem Zusatz von SOD und VitE [146, 147]. Dies zeigt, dass die MDA-Bildung und damit Schädigung durch PQ vor allem organspezifisch ist. Das toxikologische Erscheinungsbild wird von der Enzymausstattung (PQ-reduzierendes kontra antioxidativ schützendes System), dem Sauerstoffpartialdruck und der erreichten PQ-Konzentration im Gewebe bestimmt. Die gefundenen Speziesunterschiede von Ratten- und Mausmikrosomen werden von dieser Arbeitsgruppe auf den relativen VitE-Gehalt zurückgeführt. Über die relativen VitE Mengen in humanem Gewebe ist wenig bekannt, doch sind die protektiven Effekte auf Lipidperoxidation hinreichend belegt [50, 61].

Die einzelne Zelle vermag bis zu einem gewissen Grad, oxidativen Stress zu tolerieren, Schäden zu reparieren oder sich mit einer Steigerung von Schutzmechanismen zu adaptieren. Die toxischen Wirkungen auf die Zelle können damit reversibel sein. Davon zu unterscheiden sind die irreversiblen die 1.) bleibende Veränderungen am Erbmateriale (z.B. Mutationen) bewirken oder 2.) zum vollständigen Untergang der Zelle führen. Prinzipiell gibt es dafür zwei Möglichkeiten: den programmierten Zelltod, die sog. Apoptose, für die es einen "point of no return" gibt oder die sofortige Nekrose [105].

In diesen Studien diente der MTT-Test als Zytotoxizitäts- bzw. Vitalitätstest, eine Differenzierung, ob die Zellen nekrotisch verändert sind oder in Apoptose übergegangen sind, ist dabei

nicht möglich. Der MTT-Test beruht auf der Reduktion von schwach gelben Tetrazoliumsalzen zu dunkelblauem Formazan. Dabei wird der Tetrazolinring durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen aufgebrochen. Proportional zur Aktivität der Dehydrogenasen bildet sich in den Zellen das unlösliche Formazan und dient als quantitativer Marker für die gesamte Vitalität/Stoffwechselaktivität einer Zellkultur. Eine Inkubation mit PQ oder  $H_2O_2$  für 20 h führte in Alveolar TypII-Kulturen und den Tumorkulturen H322 und H358 zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Reduzierungsfähigkeit des Formazans. Dabei reagieren Alveolar TypII-Primärkulturen etwas sensitiver auf beide Stoffe. Dieser Unterschied tritt bei den mit PQ behandelten Kulturen deutlicher hervor. Bei den Tumorkulturen untereinander treten keine zelltypspezifischen Unterschiede hervor. So zeigen die Alveolar-TypII-ähnlichen H358, welche in vivo die Hauptakkumulatoren für PQ darstellen, keine signifikanten Unterschiede zu den Clarculturen-ähnlichen H322 auf eine Inkubation mit PQ.

In vielen Zellsystemen ist die Induzierbarkeit des programmierten Zelltodes durch ROS und die Aufhebung bzw. Verlangsamung durch Antioxidanzien nachgewiesen [23]. Ein Vitalitätstest mit einer Coinkubation von Antioxidanzien oder antioxidativen Enzymen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Der Einfluss der äußeren Bedingungen, im speziellen des Kulturmediums, wurde durch die Steigerung des Wachstumsverhaltens während einer 20 h Inkubation der Tumorkulturen H322 und H358 im Alveolar TypII-Medium deutlich gezeigt.

Die Permanenz von PQ im Kulturmedium konnte über 48 h belegt werden, d.h. über den ganzen Inkubationszeitraum bleibt die Konzentration von PQ im Kulturmedium konstant. Chen et al. [27] haben belegt, dass die Aufnahme von PQ in Alveolar TypII-Zellen in Kultur zeitlich begrenzt ist und nur eine bestimmte maximale Menge aufgenommen wird. Diese Angaben liegen weit unter den von in vivo durchgeführten Versuchen, in denen in Alveolar TypII-Zellen bis zu 50-fach höhere Konzentrationen als im Blutstrom gefunden wurden. Warum derselbe Zelltyp in vivo solch hohe Paraquatmengen gegen einen Konzentrationsgradienten akkumuliert, in vitro dagegen nicht, ist weitgehend unklar. Ein Erklärungsansatz ist vielleicht die fehlende basal-apikale Ausrichtung, da PQ in vivo über einen aktiven Transportmechanismus aus dem Blut, also der basalen Seite aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu ist die gesamte Wasserstoffperoxidmenge innerhalb von ca. 30 min aus dem Zellmedium verschwunden.  $H_2O_2$  diffundiert sehr schnell in alle Zellen und wird dort verstoffwechselt [49, 76, 122]. Eine radikalische Schädigung kann also im Gegensatz zu PQ nur während dieser relativ kurzen Zeitspanne stattfinden. Die entstehenden Schädigungen an kultivierten Zellen durch  $H_2O_2$  sind in vielen Studien belegt, z.B. auch Mitochondrialen- und Kern-Genom-Veränderungen [44].

### 5.3 Die AOE in AII-Zellen, NHBEZ und Lungentumorlinien

Eine große Anzahl verschiedener Mechanismen wird mit dem Schutz vor ROS vermittelten Schädigungen in Verbindung gebracht. Eine Schlüsselrolle wird dabei den AOE zugeordnet [71]. Diese stehen oft in einem direktem Zusammenhang mit dem Resistenzverhalten der verschiedenen Zelltypen gegenüber oxidativem Stress. So zeigen mit bakterieller Katalase transfizierte Zellen bedeutend höhere Überlebensraten auf oxidativen Stress durch PQ und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [82]. Aus einigen Experimenten geht weiter hervor, dass durch einen direkten oxidativen Stimulus, z.B. mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation, die Expression von Mn-SOD reaktiv beeinflusst werden kann [132]. Ein ähnlich gutes Ansprechen ist für die Cu/Zn-SOD und die Katalase trotz verschiedener Induktionsversuche weitestgehend unbekannt [4, 128, 152]. Doch auch eine Reihe anderer Zellfunktionen werden durch oxidativen Stress beeinflusst. *E.coli* reagieren auf milden oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit der Hochregulierung von über 30 verschiedenen Proteinen [91]. Über die Mechanismen in Lungenzellen ist bis jetzt wenig bekannt.

Die Alveolar TypII-Zellen bilden je nach Spezies insgesamt nur etwa 10 - 15% der Lungenzellen. Diese geringe Zahl stellt für quantitativ vergleichende Untersuchungen der AII-zellspezifischen Genexpression eine der Hauptschwierigkeiten dar. Die geringe Zellausbeute, die demzufolge geringe Gesamt-mRNA-Menge und die Möglichkeit aus einer Tierpräparation nur einen einfachen Versuchsansatz aus Kontroll- und Stressorkulturschale zu gewinnen, führten im Verlauf der Versuche zu einem Methodenwechsel bzw. zu Methodenüberschneidungen von Northern-Blot-Analytik und RT-PCR-Technik. Ähnliche Schwierigkeiten mussten bei der Materialgewinnung für die NHBEZ überwunden werden.

Die Auswertung der mRNA-Expression erfolgte durch die Einbeziehung der  $\beta$ -Aktin-Expression.  $\beta$ -Aktin ist ein wichtiger Bestandteil der Mikrofilamente und ist somit am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt. Auf Grund der essenziellen Bedeutung des Cytoskelettes für die Zelle unterliegt  $\beta$ -Aktin einer hohen Expressionsrate, die zur Kontrolle des allgemeinen Zellstatus herangezogen werden kann. Um unspezifische Änderungen der mRNA-Expression in den Kulturen auszuschließen, wurden Kontrollansätze für  $\beta$ -Aktin in der RT-PCR hergestellt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Membranen der Northern-Blot-Analytik wurden mit einer  $\beta$ -Aktin spezifischen Oligonukleotidsonde rehybridisiert. Die Kontrolle einer gleichmäßigen Gelbeladung im Northern-Blot konnte durch Beurteilung der ribosomalen RNA (18S und 28S rRNA) gesichert werden. Für die Auswertung der densitometrischen Messungen wurden die relativen Änderungen mit den jeweiligen Kontrollen aus den  $\beta$ -Aktin bzw. rRNA Banden ins Verhältnis gesetzt.

Der Methodenaufbau für die Aktivitätsbestimmungen der Enzyme erfolgte mit Mikrosomen-

fraktionen aus präparierten Lebern der Ratte. Eine Messung in Alveolar TypII-Zellen und NHBEZ schied aus, da nicht genügend Material zur Verfügung stand. Zum Vergleich wurden präparierte Lungenschnitte nach 12 Stunden und nach 5 Tagen in Kultur in die Untersuchungen einbezogen. Die Messung der Cu/Zn-Aktivitäten in den Tumorlinien konnte durch den Einsatz hoher Gesamtproteinmengen in den Sensitivitätsbereich der Messmethode gebracht werden. Im Falle der Katalase war dies nicht möglich. Grundsätzlich hätte der Einsatz von Westernblottechniken eine höhere Sensitivität zum Nachweis der AOE möglich gemacht [108].

Die ermittelten Enzymaktivitäten für die Gesamtorgane Leber und Lunge der Ratte bestätigen die Ergebnisse von Stevens et al. [139]. Die Differenzen zwischen den beiden Organsystemen sind bei den Katalaseaktivitäten in weit höherem Maße als bei den Cu/Zn-SOD-Aktivitäten ausgeprägt. Dies ist bekannt und scheint auf Grund der besonderen Funktion der Leber als Hauptstoffwechselorgan und der Lokalisation von Katalase in den Peroxysomen sinnvoll. Die Aktivitäten der Tumorlinien zeigen für Katalase nur 10% der Lungenaktivität, bei der Cu/Zn-SOD ist dies nicht in diesem Maße ausgeprägt. Aus den Ergebnissen der Lungenschnitte, die eine Abnahme der Aktivitäten für beide Enzyme über die Kulturdauer zeigen, geht hervor, dass die Aktivitäten der AOE trotz des relativ gut erhaltenen Organverbandes *in vitro* einer Abnahme unterworfen sind. Auch für andere Zelltypen und Organverbände sind ähnliche Befunde in der Literatur beschrieben. So fällt die Grundexpression und die Enzymaktivität für Katalase in primäre Ratten-Hepatozyten über Kulturdauer von 3 Tagen beständig ab, wogegen die Cu/Zn-SOD-Expressionen und -Aktivitäten gleichbleibend sind, während die Mn-SOD bis zum zweiten Tag einen Anstieg auf 300% zeigt und erst danach abfällt [122]. Die Alveolar TypII-Zellen der Ratte zeigten keine Veränderung ihrer mRNA-Expression für Katalase, Cu/Zn-SOD oder Mn-SOD über die Kulturdauer von 4 Tagen. Bei den NHBEC fanden sich dagegen große individuelle Unterschiede, im Allgemeinen aber eine Steigerung der Katalase- und Mn-SOD-mRNA-Expression von der ersten zur zweiten Generation. Diese Steigerung war für Katalase in einem weit stärkerem Maße ausgeprägt. Solche individuellen Differenzen, welche auch in anderen Zellfunktionen anzutreffen sind (z.B. Enzyme der Cytochrom P450 Familie), lassen die Unterschiede im Auslösen und in der Ausprägung bestimmter Krankheiten verständlich erscheinen. So ist bekannt, dass z.B. bei Expositionen am Arbeitsplatz die individuelle Empfänglichkeit auf bestimmte Stoffe, in Verbindung mit individuell unterschiedlichen Reaktionen bestimmter Schutzgene oder Antioxidanzien auf bestimmte Reizstoffe erheblich differiert. In welchem Maße die antioxidativen Mechanismen der AOE in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, ist derzeit nicht bekannt.

Ein Wissen über die Regulationsmöglichkeiten der AOE würde das Verständnis für viele Entzündungsreaktionen und Oxidanzien assoziierte Lungenkrankheiten verbessern. Bei der Ver-

wendung von Katalase- und SOD-Derivaten, welche durch Targetmoleküle eine gewisse Organspezifität erhalten oder via rezeptorvermittelter Endozytose in vivo eingesetzt werden können, wird derzeit untersucht, ob bei verschiedensten Krankheitsbildern (Ischämie/Reperfusion Hirninfarkte) eine antioxidative Unterstützung möglich ist [8, 158]. Der protektive Effekt, insbesondere einer regulativen Mn-SOD-Überexpression, ist in der Vergangenheit in vitro Systemen oft dokumentiert worden. Primäre Hepatozyten und Hepatomzelllinien können nach  $H_2O_2$ - oder PQ-Inkubation mit einem Anstieg ihrer Mn-SOD und Katalase reagieren [122, 123]. Aus diesen Gründen sollte untersucht werden, ob sich die Expression von AOE in Lungenzellen im Sinne einer Anpassung beeinflussen lassen. Es war zu vermuten, dass PQ und  $H_2O_2$  zu einer Erhöhung von Mn-SOD- und Katalase-mRNA-Expression führen würden. In keinem der Kultursysteme konnte unter den untersuchten Konzentrations- und Zeitbedingungen eine signifikante Steigerung festgestellt werden. Die in diesen Untersuchungen beobachtete Unbeeinflussbarkeit der Katalase- und Mn-SOD-mRNA-Spiegel in Bronchialepithelzellen bestätigt im wesentlichen die von anderen Arbeitsgruppen erhaltenen Ergebnisse [53, 107]. In einer humanen Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B) ließen sich durch erhöhte  $O_2$ -Konzentrationen ebenfalls keine Veränderungen der Expressionsraten für Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Katalase und Glutathionperoxidase nachweisen [107]. In Alveolar TypII-Zellen ist dagegen unter vergleichbaren Bedingungen eine Erhöhung aller AOE zu finden [16]. Diese zelltypspezifischen Unterschiede konnten durch eine PQ- oder  $H_2O_2$ -Inkubation nicht bestätigt werden.

Die signifikante Aktivitätssteigerung um maximal 20 - 50% für Cu/Zn-SOD in den Tumorkulturen H322 und H358 nach PQ- oder  $H_2O_2$ -Inkubation deckt sich mit ähnlichen Ergebnissen aus anderen Zellsystemen. So finden Stevens et al. [139] in Gingivalzellen eine Aktivitätssteigerung für die zytosolische SOD und die Katalase durch eine PQ-Inkubation der Kulturen. Eine Aussage für das Verhalten der Katalase ist wegen der beschriebenen Schwierigkeiten nicht möglich. Dass diese Aktivitätssteigerung ohne eine Veränderung der entsprechenden mRNA einhergeht, liegt entweder an der zeitlichen Versetzung der mRNA- und Proteinsynthese oder an einer einfachen Aktivitätssteigerung der SOD ohne eine Proteinneusynthese. Es ist bekannt, dass die Expression auf mRNA-Ebene nicht in jedem Fall mit der funktionellen Aktivität und der Menge der Proteine korreliert [3]. Einige Autoren beschreiben sehr schnelle Reaktionen der mRNA-Expression der SOD mit einem Maximum nach bereits 30 min als Reaktion auf oxidativen Stress. Im Falle von  $H_2O_2$  könnte es durchaus möglich sein, dass aus diesem Grund nach 24 h keine Expressionsänderung mehr gefunden werden kann. Im Falle von PQ, welches über den ganzen Zeitraum konstant im Zellmedium nachweisbar ist, dürfte dies aber nicht zutreffen.

In humanem Gewebe ist die Katalaseaktivität weit niedriger als in anderen Spezies [71]. Die



relative "Bedeutungslosigkeit" der Katalase in humanem Gewebe wird durch das relativ leichte Krankheitsbild der Akatalasämie unterstrichen. Dies wird sich auch auf den Mechanismus der Genexpression auswirken.

Die nur mäßige Induktion der SOD-Aktivitäten in den Tumorzellen und das Fehlen einer signifikanten mRNA-SOD-Enzymsteigerung durch Oxidanzien veranlasst zu der Hypothese eines möglicherweise vermehrten Oxidanzien-getriggerten SOD-Enzymumsatzes, wofür z.B. auch die extrem schnellen Umsatzraten der Enzyme sprechen. Liochev et al. konnten in einem *E. coli*-System zeigen, dass ab einem bestimmtem Enzymstatus eine Verdopplung oder gar Verfünffachung der SOD-Menge keine Beschleunigung der Elimination von Superoxidanionen mehr möglich macht [93]. Vielleicht sind dies, zusammen mit einer bloßen Aktivitätssteigerung ohne neue Transkription, die Mechanismen, die eine Neusynthese für die einzelne Zelle unsinnig machen. Wegen dieses überaus schnellen Reaktionsumsatzes dürften die effektiven Konzentrationen von Superoxid und  $H_2O_2$  in der Zelle gering bleiben.

Das humane MnSOD-Gen enthält mehrere Kopien von sog. consensus Sequenzen, so eine NF- $\kappa$ B consensus Sequenz und zwei für die Transkriptionsfaktoren AP-2 und SP-1, dies weist auf eine potenzielle Regulationsmöglichkeit bei der Steuerung der Mn-SOD-Genexpression hin [152]. Über diesen Weg können Entzündungsmediatoren wie Zytokine in den Regulationsmechanismus der Mn-SOD-Transkription eingreifen. Die prinzipielle Möglichkeit dieses Reaktionsweges wird durch mehrere Induktionsexperimente belegt [72, 128, 150, 157]. Da verschiedene Lungenzellen in der Lage sind solche Mediatoren zu produzieren, dürften sie in der Lage sein mit ihren eigenen Mediatoren die Enzymexpression zu steuern, welches zum derzeitigen Kenntnisstand spekulativ ist. Ebenso wird seit kurzem die Aktivierung der Transkription von AOE über bestimmte Signal-Proteine untersucht. So führt eine Aktivierung von HRE (hydrogen peroxide-responsive element) oder HSE (heat shock element) zu einer SOD-Expressionssteigerung [162].

## 5.4 Untersuchungen im Mikrosomensystem

Das Herbizid Paraquat führt, bei Unfällen oder in suizidaler Absicht aufgenommen, zu einem schweren toxikologischen Erscheinungsbild. Der Wirkmechanismus über die Generierung von ROS wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und letztendlich von Hydroxylradikalen ist allgemein anerkannt [73, 93, 135]. Welche Rolle der Vermittlung von Übergangsmetallen in der Generierung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid zukommt, wird kontrovers diskutiert.

Um sich dem allgemein akzeptierten Mechanismus der PQ-Toxizität anzunähern, wurde ein mikrosomales System gewählt. In einem System aus Mikrosomenfraktionen der Lunge oder der

Leber wurde der NADPH-Verbrauch, der Sauerstoffverbrauch sowie die Generierung von Superoxidanionen durch PQ untersucht. In einem solchen System sollte die Zugabe von PQ zu einer Steigerung des NADPH- und Sauerstoffverbrauchs und zu einer Erhöhung der Superoxidanionenproduktion führen. Die Zugabe von Mikrosomenfraktionen zum Ansatz aus PBS und NADPH führte zum sofortigen, wenn auch nur geringem Verbrauch von NADPH. Das heißt, dass es noch andere NADPH verbrauchende Enzymsysteme in der Mikrosomenpräparation geben muss. Zwischen den Organen Leber und Lunge sind deutliche Unterschiede ausgeprägt (1 : 0,3). Das Hauptstoffwechselorgan Leber besitzt pro Proteinmenge auch die höhere Enzymausstattung. Die Anwesenheit von PQ führt zu einem konzentrationsabhängigem Anstieg des NADPH-Verbrauchs, bei einer Endkonzentration von 1 mM um den Faktor 5 in beiden Organsystemen. Die rapide Verringerung der NADPH-Reserven verstärkt die rein oxidativen Schädigungen bei einer PQ-Intoxikation, da der Zelle ein wichtiges Instrument im Kampf gegen die Schädigung entzogen wird. Bei der Sauerstoffverbrauchsmessung fanden sich ähnliche Ergebnisse und auch hier wurde der höhere Sauerstoffverbrauch im Lebersystem gemessen (Mikrosomen und NADPH, Leber : Lunge, 1 : 0,6). Es wurde eine Steigerung durch die Zugabe von PQ um den Faktor 2,7 in beiden Organsystemen festgestellt. Die Entstehung von Superoxidanionen im Mikrosomensystem sollte mittels zweier unterschiedlicher Techniken quantifiziert werden. Untersucht wurde die lucigeninvermittelte Chemolumineszenz und die Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium. Lange Zeit galt die lucigeninvermittelte Chemolumineszenz als Methode der Wahl, um die Entstehung von Superoxidanionen in biologischen Systemen besonders durch phagozytierende Zellen zu quantifizieren [18, 116]. Die Hemmbarkeit der Chemolumineszenz durch Superoxiddismutase wurde als Spezifitätsnachweis herangezogen.

Im Mikrosomensystem führt die Zugabe von NADPH zur raschen Entstehung von Chemolumineszenz. Mikrosomen aus Lebergewebe sind dabei bedeutend wirksamer als Lungenmikrosomen. Die Zugabe von Superoxiddismutase führt in beiden Systemen zu einem Abfall der CL um 30 - 50%. Befindet sich PQ mit im Reaktionsansatz wird das messbare chemoluminometrische Verhalten der Mikrosomenfraktionen nicht beeinflusst.

Die Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium als indirekter Nachweis für Superoxidanionen zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Lucigenin-CL. In den Lebermikrosomen wurde eine 5-fach stärkere Aktivität als in den Lungenmikrosomen gemessen. Eine Zugabe von Superoxiddismutase oder PQ hemmte diese Reaktion um maximal 25%.

Die Versuche zur NADPH- und Sauerstoffverbrauchsmessung sind mit den aus in vivo Experimenten bekannten toxikologischen Effekten durch PQ vereinbar. Besonders betroffen sind die stoffwechselaktiven Organe und es besteht ein Zusammenhang mit der PQ-Konzentration

im Gewebe. Die Entstehung von PQ-Radikalen ist demnach also direkt abhängig von der Enzymausstattung (dem reduzierenden System) und der intrazellulären PQ-Konzentration [66]. Verstärkend zum aktiven Transportmechanismus in Alveolar TypII-Zellen kommt der höchste Sauerstoffpartialdruck des Gesamtorganismus in diesem Zelltyp hinzu. Ob der erhöhte Sauerstoffverbrauch durch die Zugabe von PQ ein Ausdruck der Elektronenübertragung vom PQ-Radikal auf Sauerstoff ist oder ob die Enzymsysteme in Verbindung mit PQ als Substrat mehr Sauerstoff benötigen, bleibt unklar. Aus dem gebildeten  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$  entsteht spontan oder über Superoxiddismutasen, Katalasen und/oder andere Enzyme neben  $H_2O_2$  auch wieder Sauerstoff, deshalb müssen die absoluten Verbrauchsraten höher sein. Im Oxygraph ist nur die Summe dieser Vorgänge erfassbar.

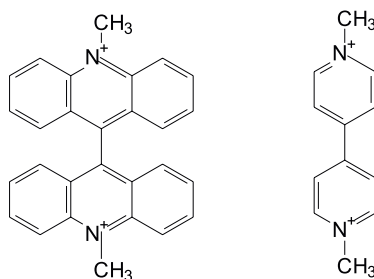


Abbildung 25: Lucigenin und Paraquat

Die Ergebnisse der CL und NBT Superoxidquantifizierung könnten zu der Vermutung Anlass geben, dass PQ keinen Einfluss auf die Superoxidanionenbildung im Mikrosomensystem hat. In jedem Fall müssen zusätzliche Faktoren am Entstehen der CL und des Formazans beteiligt sein. Dass beide Methoden im gewählten Untersuchungssystem nicht spezifisch für Superoxidanionen sind, wird durch die unvollständige Hemmbarkeit der Reaktionen durch Superoxiddismutase deutlich. Die Enzymsysteme in den Mikrosomenfraktionen werden selbst in der Lage sein, in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration, Lucigenin bzw. NBT direkt zu reduzieren [51, 93]. Auf Grund der relativen Strukturähnlichkeit von PQ und Lucigenin, dem Detektormolekül, sind auch direkte Interaktionen zwischen PQ und Lucigenin nicht auszuschließen (Abb. 25).

## 5.5 Untersuchungen zur Radikalgenerierung durch Paraquat

Bei vielen enzymatischen Umsetzungen entstehen unter physiologischen Bedingungen reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale. Diese sind Teil des normalen Lebens einer Zelle. Auch Paraquat kann durch verschiedene Enzymsysteme reduziert werden. Einige in der Literatur beschriebene sind die mikrosomalen NADPH-Cytochrom P450 c Reduktasen [66, 71, 145, 164],

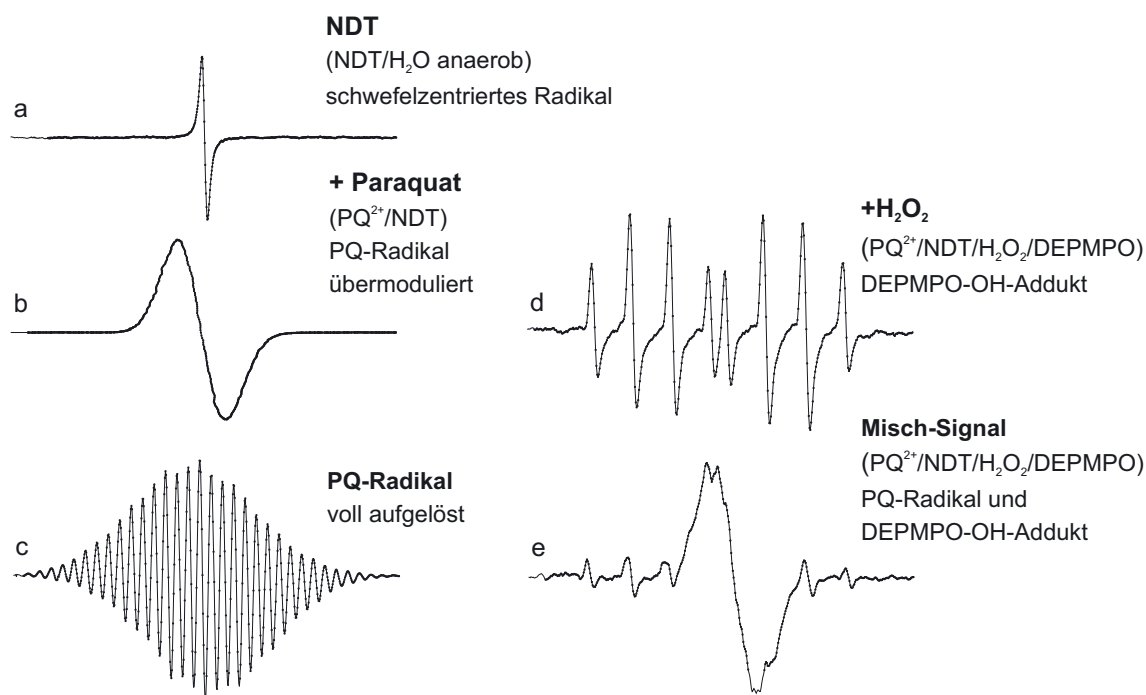


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Elektronenresonanz-Spektroskopiesignale (2. Ableitung des primären Signals) aller untersuchten radikalischen Strukturen.

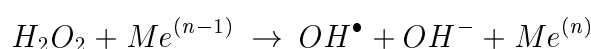
die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (Komplex I Ubiquinone Oxidoreduktase) [59, 74, 143], die Glutathion-Reduktasen, die Stickstoffoxid-Synthetasen [97] oder die Xanthinoxidasen [87, 124, 154]. Für in vitro Untersuchungen wurde meist Natriumdithionit als chemisches Reduktionsmittel gewählt [74, 102]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PQ-Radikale durch ein Mikrosomensystem (NADPH P450 c Reduktase), durch Xanthinoxidase und mittels chemischer Reduktion durch Natriumdithionit generiert.

Die Übertragung eines Elektrons auf PQ<sup>2+</sup> führt zum blauen PQ<sup>•+</sup>, welches sich unter anaeroben Bedingungen solange stabilisieren lässt, wie ein geeigneter Elektronenakzeptor fehlt. Das PQ-Radikal besitzt ein charakteristisches 35-gipfliges ESR-Spektrum und lässt sich bei 605 nm und 396 nm spektrophotometrisch bestimmen [102]. Diese zwei Methoden wurden zur Untersuchung und Quantifizierung eingesetzt.

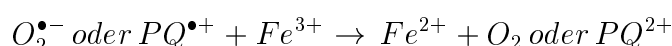
Mittels ESR-spektroskopischer Untersuchungen konnten folgende radikalische Strukturen dargestellt werden: Eine Natriumdithionitlösung (100 mM) zeigt unter anaeroben Bedingungen das typische Bild für schwefelzentrierte Radikale. Sie besitzen keine Hyperfeinstruktur (Abb. 26a). In einem Ansatz aus NDT (0,6 mM) und PQ (50 μM) zeigte sich daraufhin ebenfalls unter anaeroben Bedingungen das übermodulierte PQ<sup>•+</sup>-Signal (Abb. 26b). Eine Auflösung war erst mit einer Optimierung der Modulationsamplitude möglich (Abb. 26c). Wasserstoffperoxid

war in der Lage, dieses Signal auszulöschen und nach entsprechender Geräteeinstellung konnte ein  $\text{OH}^\bullet$ -DEPMPO-Addukt nachgewiesen werden (Abb. 26d). Ein besonders seltenes Bild zeigt die Abbildung 26e, es sind das PQ-Radikal und das  $\text{OH}^\bullet$ -DEPMPO-Addukt zu erkennen. Unabhängig vom Reduktionsweg konnte das PQ-Radikal mittels UV-VIS-Spektroskopie und ESR-Technik dargestellt und quantifiziert werden. Es ist davon auszugehen, dass NDT in den eingesetzten Konzentrationen das PQ vollständig reduziert. Die Differenzen zwischen eingesetzter Menge und der tatsächlich bestimmten Konzentration beruhen wahrscheinlich auf einer Ungenauigkeit beim Einwiegen von PQ für die Stammlösungen. So wurde z.B. darauf verzichtet, das PQ-Salz vor der Einwaage zu trocknen [102]. Durch Xanthin/Xanthinoxidase wurde dagegen nur etwa 10% der eingesetzten PQ-Menge reduziert.

Es werden zwei prinzipielle Wege der Hydroxyl-Radikalgenerierung im Mechanismus der PQ-Toxizität in der Literatur diskutiert. Einige Autoren verweisen auf die strikte Notwendigkeit von Übergangsmetallionen, wobei Eisen in vivo quantitativ am bedeutendsten ist. Dabei ist die Quelle für die Hydroxylradikale  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches dismutativ aus Superoxidanionen entsteht und mit den Übergangsmetallen in der Reaktion vom FENTON-Typ interagiert [22, 69, 135, 154, 161].



Die zweiwertige Form des Eisens kann dabei durch Superoxidanionen oder auch durch das PQ-Radikal zurückreduziert werden.



Auf Grund der geringen Verfügbarkeit von freien Metallionen im intrazellulären Milieu vermuten andere Autoren eine direkte Interaktion zwischen dem PQ-Radikal und Wasserstoffperoxid [14, 153, 163].



Um die prinzipielle Reaktionsmöglichkeit von  $\text{PQ}^{\bullet+}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachzuweisen, wurde unter anaeroben Bedingungen  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Ansätze gegeben. Im Xanthinoxidase-System führt dies zur sofortigen Reoxidierung von  $\text{PQ}^{\bullet+}$ . Befand sich  $\text{H}_2\text{O}_2$  schon zu Beginn der Reaktion im Ansatz, wurde eine Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit und eine Verminderung der absoluten  $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Konzentration gefunden. Im NDT-System ist die verbleibende  $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Menge nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -

Zugabe von der vorhandenen NDT-Konzentration abhängig. Bei sehr hohen Konzentrationen zeigte sich nur eine partielle Verringerung der  $PQ^{\bullet+}$ -Konzentration. Der Zusatz von Desferoxamin, einem Eisenkomplexbildner, führte zu keiner Veränderung dieser Beobachtungen, was eine Beteiligung von freien Metallionen an der direkten Reaktion von  $PQ^{\bullet+}$  und  $H_2O_2$  unwahrscheinlich macht. Das Produkt aus dieser Reaktion ist die Reduktion von  $H_2O_2$  zu Hydroxylradikalen.

Die nur teilweise Reduzierung der  $PQ^{\bullet+}$ -Konzentration durch  $H_2O_2$ -Zugabe bei hohen NDT-Konzentrationen liegt an der sofortigen Rückreduktion des vorhandenen  $PQ^{\bullet+}$ s. Sie kann nicht mit dem Nachlassen der reduktiven Eigenschaften von NDT erklärt werden, da eine erneute Zugabe von NDT zu keiner Extinktionssteigerung führte. Die Verminderung der Extinktion kann nur mit einer Verringerung der absoluten  $PQ$ -Menge erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die generierten Hydroxylradikale, welche direkt am  $PQ$ -Molekül entstehen, über einen sog. "backbite"-Mechanismus auf das  $PQ$ -Molekül zurückschlagen und es dabei zerstören.

Auf Grund der extremen Reaktionsfreudigkeit von  $OH^{\bullet}$  ist ihr Nachweis relativ schwierig. Deshalb versuchen die meisten Autoren sie über sog. "footprints", also eine Quantifizierung der Schäden, nachzuweisen [68, 119]. Hier wurde versucht mittels ESR-Technik und DEPMPO als Spin-Trap die entstehenden Hydroxylradikale quantitativ zu erfassen. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Reoxidation von  $PQ^{\bullet+}$  durch die Zugabe von  $H_2O_2$  oder das Einbringen von Sauerstoff zur Bildung von  $OH^{\bullet}$ -DEPMPO-Addukten kommt. Dabei müssten durch  $PQ$ , welches durch den Redoxzyklus immer wieder reduziert wird, stöchiometrisch genau so viele Hydroxylradikale entstehen wie  $H_2O_2$  zugegeben wurde. Die extrem kleinen Konzentrationen von Hydroxylradikalen, die am unteren Sensitivitätsbereich des ESR-Gerätes lagen, lassen sich mit der Wechselwirkung der Hydroxylradikale mit allen Reaktionspartnern, insbesondere den NDT-Radikalen ( $SO_2^{\bullet-}$ ) erklären. Nur ein kleiner Teil kann an die Spin-Trap gebunden werden, der größere Teil wird sofort wieder mit  $PQ$ , mit  $SO_2^{\bullet-}$  oder mit sich selbst reagieren. Dafür spricht, dass die Konzentration des messbaren Hydroxylradikals von der eingesetzten NDT-Konzentration abhängig ist und sich durch Vortexen erhöhen lässt. Der Eintrag von Sauerstoff führt zu dessen Reduzierung zu  $H_2O_2$  durch NDT [33] und damit zur Abnahme der reduktiven Eigenschaften, wodurch entsprechend mehr Hydroxylradikale an der Spin-Trap gebunden werden. Es folgt daraus, dass das NDT-Radikal ein guter Hydroxyl-Radikalfänger sein muss. Diese Beobachtungen sind unabhängig von Desferoxamin im Reaktionsansatz und damit unabhängig von der Anwesenheit von Übergangsmetallionen. Die Wirksamkeit von Desferoxamin als kompetenter Komplexbildner wurde durch die Auslöschung des Standard-Signals aus  $NTA-Fe^{2+}$  und  $H_2O_2$  bewiesen.

Die intrazellulären Konzentrationen von  $H_2O_2$  und  $O_2^{\bullet-}$  befinden sich in gesunden Säuger-

zellen in einem konstanten Gleichgewicht wobei,  $O_2^{\bullet-}$  in einem hohen Maße überwiegen ( $H_2O_2$  :  $O_2^{\bullet-}$  wie 1 :  $10^3$ ). Weiter ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen  $PQ^{\bullet+}$  und Sauerstoff bedeutend größer als die zwischen  $PQ^{\bullet+}$  und Wasserstoffperoxid ( $PQ^{\bullet+}/O_2$   $\kappa = 7.7 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$  ;  $PQ^{\bullet+}/H_2O_2$   $\kappa = 2.3 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$  [52, 144]). Das bedeutet, dass unter in vivo Bedingungen  $PQ^{\bullet+}$  wesentlich schneller mit Sauerstoff unter Superoxidanionenbildung reagieren wird. Eine direkte Reaktion mit  $H_2O_2$  ist unter normalen Bedingungen also relativ unwahrscheinlich.

Bei einer PQ-Intoxikation wird aber in erhöhtem Maße Sauerstoff verbraucht und  $H_2O_2$  gebildet, wodurch es zu einer Verschiebung des intrazellulären Quotienten von  $O_2/H_2O_2$  kommt und eine direkte Reaktion zwischen PQ und  $H_2O_2$  wahrscheinlicher wird. Möglicherweise ist dies der Mechanismus, welcher zum schweren toxikologischen Bild der PQ-Intoxikation führt.

Der Weg über eine metallkatalysierte Reaktion vom FENTON-Typ (insbesondere  $Fe^{2+}$ ) ist in jedem Fall ein effektiver Weg, um  $H_2O_2$  über  $Fe^{2+}$  zu den toxischen Sauerstoffradikalen  $OH^{\bullet}$  und  $OH^-$  umzusetzen. Die lineare Beziehung zwischen dem Eisengehalt und dem Ausmaß der durch die Radikalbildung induzierten Lipidperoxidation ist belegt [6, 112]. Die Verfügbarkeit von freiem Eisen wird also eine Steigerung der oxidativen Schäden und der toxischen Effekte, z.B. durch PQ, bewirken [77, 90, 160]. Doch Eisen und Kupfer sind im intrazellulären Milieu meist in einer nicht fentonfähigen Form an Komplexe, z.B. an Ferritin, gebunden. Dies ist einer der wichtigsten antioxidativen Schutzmaßnahmen überhaupt. Durch Superoxidanionen und wahrscheinlich auch  $PQ^{\bullet+}$  können die Metallionen aus ihren Bindungen, z.B. aus Ferritin und aus Enzymen in die fentonfähige Form freigesetzt werden. Dies ist aber nur unter stark azidotischen Bedingungen möglich [106]. Wenn  $PQ^{\bullet+}$  mit dem höheren Oxidationspotenzial als  $O_2^{\bullet-}$  in der Lage sein sollte, noch effektiver Metallionen aus den Bindungen zu lösen, vielleicht sogar aus der Komplexbildung mit Desferoxamin ( $O_2^{\bullet-}$  ist nicht in der Lage), wäre dies ein starkes Argument gegen die vorgeschlagene metallionenunabhängige Reaktion. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies spekulativ.

## 5.6 Zusammenfassung

Oxidativer Stress kann über viele Mechanismen die Zellintegrität beeinflussen. Die antioxidativen Enzyme wie Katalasen und Superoxiddismutasen vermitteln einen Teil der antioxidativen Abwehr auf radikalische Schädigungsprozesse. Eine Überexpression von antioxidativen Enzymen ist daher oft mit einer Steigerung der Resistenz auf oxidative Schädigungsmechanismen verbunden. Über die Regulation der antioxidativen Enzyme, im besonderen in Lungenzellen, ist bisher wenig bekannt. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche oxidativ wirkende Modulatoren der Katalasen- und Superoxiddismutasenexpression untersucht werden. Als Modellsystem dienten hierzu primär kultivierte Alveolar TypII-Zellen, normale humane Bronchialepithelzellen und zwei Tumorlinien. Es wurde untersucht, ob sie auf oxidativen Stress mit einer Anpassung ihrer antioxidativen Enzyme reagieren. Als Oxidanzien wurde das Herbizid Paraquat (PQ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eingesetzt.

Einen universellen Marker für oxidativen Stress gibt es nicht. Die Wirkung von ROS ist u.a. an einer verstärkten Lipidperoxidation sowie an einer gesteigerten Zytotoxizität quantifizierbar. Nach einer Inkubation der Kulturen mit Paraquat (PQ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizitätsdaten mit einem Vitalitätstest (MTT) und die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Abbauprodukt der Lipidperoxidation im Kulturmedium, mittels HPLC-Analytik. MDA stieg im Kulturmedium von Alveolar TypII-Zellen der Ratte nach PQ- oder  $H_2O_2$ -Inkubation konzentrationsabhängig an. Im Kulturmedium der Tumorlinien H322 und H358 fand sich nach einer PQ-Inkubation kein, nach  $H_2O_2$  erst ab 1 mM ein signifikanter Anstieg von MDA. Die Untersuchungen im MTT-Test an primären Kulturen von Alveolar TypII-Zellen und den Tumorlinien H322 und H358 zeigten einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität nach einer Inkubation mit PQ oder  $H_2O_2$  über 20 Stunden.

Die absoluten Aktivitäten von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase waren im Lungengewebe der Ratte bedeutend niedriger als im Lebergewebe (Katalase 1 : 200; Cu/Zn-SOD 1 : 3). Die Tumorlinien H322 (Clarazell-ähnlich) und H358 (Alveolar TypII-ähnlich) zeigen nur 10% der Katalaseaktivität und 50% der Cu/Zn-SOD-Aktivität von Lungengewebe der Ratte.

Die antioxidativen Enzyme Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD der Alveolar TypII-Zellen zeigen auf mRNA-Ebene keine Veränderungen bis zum 4. Kulturtag. Nach einer Inkubation mit PQ oder  $H_2O_2$  von Alveolar TypII-Zellen für 20 Stunden finden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD.

Die mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD in humanen Bronchialepithelzellen (NH-BEZ) zeigte starke interindividuelle Unterschiede. Als adaptive Antwort auf die Kulturbedingungen fand sich eine 5-fache Steigerung der mRNA-Expression für Katalase und eine 2-fache



Steigerung der Mn-SOD-mRNA von der 1. Auswachskultur (nach ca. 2 Wochen) zur 2. Auswachskultur (nach weiteren 2 Wochen).

Nach einer Inkubation mit PQ oder  $H_2O_2$  von NHBEZ und der Tumorlinien H322 und H358 für 20 Stunden fanden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD.

Die im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Lungenzellen gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die radikal vermittelten Wirkungsmechanismen nicht zwingend zu einer direkten Steigerung der antioxidativen Enzyme führen müssen. Die untersuchten Zelltypen müssen bis zu einem gewissen Maße ihre Zellintegrität durch andere Mechanismen als der bloßen Enzymneusynthese aufrecht erhalten. Es bleibt spekulativ, ob eine Enzymneusynthese für die einzelne Zelle einen Vorteil gegenüber einer radikalischen Schädigung birgt oder ob durch die sehr schnellen Reaktionsumsätze der antioxidativen Enzyme schon eine optimale Ausstattung vorhanden ist. Die nur mäßige Induktion der SOD-Aktivitäten in den Tumorzellen und das Fehlen einer signifikanten mRNA-Induktion durch Oxidanzien veranlasst zu der Hypothese eines möglicherweise vermehrten Oxidanzien-getriggerten Enzymumsatzes.

Durch verschiedene Enzymsysteme kann Paraquat ( $PQ^{2+}$ ) zum Paraquatradikal ( $PQ^{\bullet+}$ ) überführt werden. Der Mechanismus der PQ-Toxizität kann in der sequenziellen Übertragung von Elektronen vom  $PQ^{\bullet+}$  auf  $O_2$  gesehen werden, in deren Folge sowohl Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ),  $H_2O_2$  als auch Hydroxylradikale ( $OH^{\bullet}$ ) generiert werden können. Insbesondere für die Bildung von  $OH^{\bullet}$  aus  $H_2O_2$  wird die Anwesenheit von Übergangsmetallionen, wie  $Fe^{2+}$  oder  $Cu^+$ , im Sinne einer Reaktion vom FENTON-Typ, als notwendig angesehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen, in Abwesenheit von freien Metallionen,  $PQ^{\bullet+}$  aus  $H_2O_2$  Hydroxylradikale generieren kann.

Das  $PQ^{\bullet+}$  bevorzugt  $O_2$  als Elektronenakzeptor. Über die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  und den Weg der FENTON-Reaktion können in Anwesenheit von Übergangsmetallen Hydroxylradikale gebildet werden. Da Metalle intrazellulär meist in Komplexen gebunden sind, können unter bestimmten Bedingungen aus der direkten Reaktion zwischen  $PQ^{\bullet+}$  und  $H_2O_2$  ebenfalls Hydroxylradikale gebildet werden. Über eine Verschiebung des intrazellulären Milieus, z.B. durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch nach einer PQ-Vergiftung, kann es zu einer quantitativen Umverteilung der intrazellulären Konzentrationen von  $O_2/H_2O_2$  und damit zu einer Verschiebung der Reaktionswege kommen. Auf dem Weg der direkten Interaktion zwischen  $PQ^{\bullet+}$  und  $H_2O_2$  könnten dann Hydroxylradikale generiert werden, so lange wie Elektronen auf  $PQ^{2+}$  übertragen werden und  $H_2O_2$  vorhanden ist.