

Aus dem Institut für Umwelttoxikologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktorin: Prof. Dr. H. Foth

Der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme von Lungenzellen und Aspekte zum Mechanismus der Paraquattoxizität

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Enrico Weidauer
geboren am 11.10.1972 in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Foth
2. Prof. Dr. R. Kahl
3. PD Dr. rer. nat. habil. H.J. Brömme

urn:nbn:de:gbv:3-000002788

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002788>]

“Niemals setzt sich die Wissenschaft das Phantom zum Ziel, endgültige Antworten zu geben oder auch nur wahrscheinlich zu machen, sondern ihr Weg wird bestimmt durch ihre unendliche, aber keineswegs unlösbare Aufgabe, immer wieder neue, vertiefte und verallgemeinerte Fragen aufzufinden und die immer nur vorläufigen Antworten immer von neuem und immer strenger zu prüfen.” Karl Popper, Logik der Forschung

Referat und bibliographische Beschreibung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale spielen eine wichtige Rolle in lebenden Systemen. Sie sind bei der Entstehung und Pathophysiologie von Krankheiten und dem Wirkungsmechanismus vieler Fremdstoffe beteiligt. Die funktionstüchtige Zelle ist mit einer Grundausstattung an antioxidativen Schutzmechanismen versehen. Eine Imbalance zwischen anfallenden ROS und/oder freien Radikalen mit diesen Schutzmechanismen wird als oxidativer Stress bezeichnet. Es ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen auf oxidativen Stress mit einer Erhöhung ihrer antioxidativen Enzymkapazität reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob verschiedene Lungenzelltypen in der Lage sind ihre Enzymkapazität anzupassen. Zur Generierung von ROS wurde das Herbizid Paraquat (PQ) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), eingesetzt. Als Untersuchungsobjekt dienten humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ), primäre AII-Zellen (Ratte) und zwei humane Tumorzelllinien. Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mit Northern-Blot-Analytik und RT-PCR-Technik. Es wurden die Grundexpressionsmuster für Katalase, Mangan-Superoxiddismutase und Kupfer/Zink-Superoxiddismutase im Kulturverlauf bestimmt. Die absoluten Enzymaktivitäten der Tumorzelllinien und der Lunge wurden mittels Enzymassays bestimmt. Nach einer Inkubation der Kulturen mit PQ oder H_2O_2 erfolgte die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Toxizitätsdaten mit einem Vitalitätstest (MTT) und die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Abbauprodukt der Lipidperoxidation im Kulturmedium. Nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 fand sich in keinem der untersuchten Zellsysteme eine signifikante Erhöhung der Expressionsraten der mRNA für die untersuchten Enzyme.

Durch verschiedene Enzymsysteme kann Paraquat in Form von PQ^{2+} zum Paraquatradikal ($\text{PQ}^{\bullet+}$) überführt werden. Der Hauptschädigungsmechanismus von PQ wird über die Generierung von Superoxidationen ($\text{O}_2^{\bullet-}$, Einelektronübertragung von $\text{PQ}^{\bullet+}$ auf O_2) angenommen. Um den Mechanismus der Paraquattoxizität zu untersuchen, wurden einige Aspekte der PQ-Radikal-Generierung näher betrachtet. Dazu wurde in einem Mikrosomensystem (Ratte) die Generierung von Superoxidationen (Lucigenin und Nitro-Blue-Tetrazolium als Detektormoleküle) und der Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch durch den Zusatz von PQ untersucht. PQ steigerte den Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch, aber nicht die Generierung von Superoxidationen. Wegen des schweren klinisch/pathologischen Bildes nach einer Paraquatvergiftung wird eine Mitbeteiligung von Hydroxylradikalen diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass Übergangsmetallionen für die Generierung von Hydroxylradikalen, im Sinne einer Fenton-Reaktion, erforderlich sind. Das reduzierte $\text{PQ}^{\bullet+}$ lässt sich unter anaeroben Bedingungen stabilisieren. Mit dem chemischen Reduktionsmittel Natriumdithionit (NDT) und einem enzymatischen System, bestehend aus Xanthin und Xanthinoxidase (XO/X), wurden zwei Reduktionssysteme unter anaeroben Bedingungen etabliert. Die Generierung von PQ-Radikalen wurde mittels UV-VIS- und ESR-Spektroskopie untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen, in Abwesenheit von freien Metallionen, $\text{PQ}^{\bullet+}$ aus H_2O_2 Hydroxylradikale generieren kann. $\text{PQ}^{\bullet+}$ akzeptiert molekularen Sauerstoff besser als H_2O_2 als Elektronenakzeptor. Über eine Verschiebung des intrazellulären Milieus, z.B. durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch nach einer PQ-Vergiftung, kann es zu einer quantitativen Umverteilung der Reaktionswege kommen.

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

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

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 NADPH₂ 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

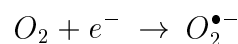
der funktionellen Beeinträchtigung durch die Schädigung z.B. einer wichtigen Bindungsstelle, auch der Ort der oxidativen Veränderung am Protein ein ausschlaggebende Rolle [1].

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).

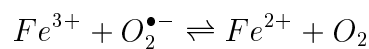
Das Superoxidradikalanion $\text{O}_2^{\bullet-}$



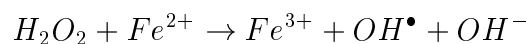
Besetzt ein Elektron eines der beiden freien π^* -Orbitale des molekularen Sauerstoffs, entsteht das Superoxidradikalanion. Es besitzt also nur noch ein ungepaartes Elektron. Vorzugsweise wird $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch die Elektronentransportketten in den Mitochondrien gebildet, dieser Weg als Nebenprodukt 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-

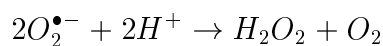
nen. Sie können sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein und werden durch Superoxiddismutasen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert. Die effektive Halbwertszeit liegt im Bereich von Millisekunden. $O_2^{\bullet-}$ haben eine geringe Reaktivität; eine direkte Interaktion mit DNA, Lipiden 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].

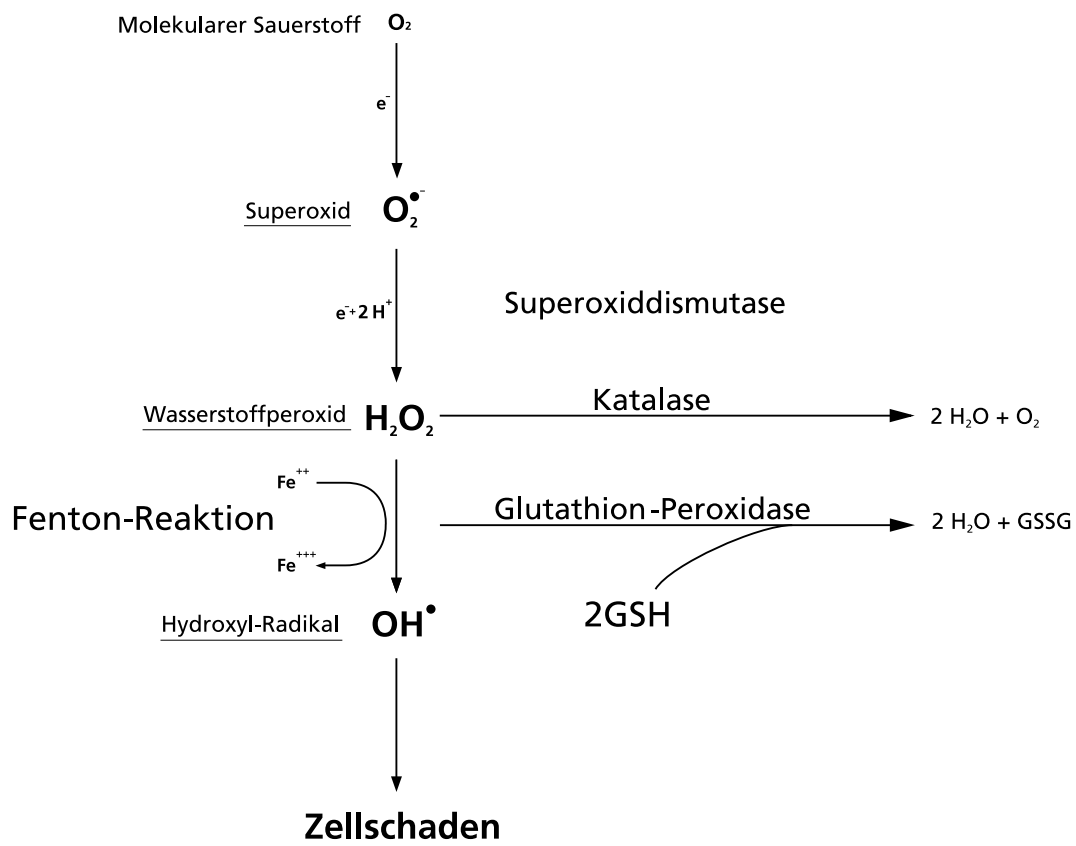


Abbildung 1: **Die schrittweise Reduktion des molekularen Sauerstoffs:** Der molekulare Sauerstoff (O_2) ist selbst ein Biradikal, er besitzt zwei freie Elektronen. Die Ein-Elektronen-Reduktion (ein Elektron wird auf Sauerstoff übertragen) führt zum Superoxid ($O_2^{\bullet-}$). Eine Zwei-Elektronen-Reduktion 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 Sauerstoffradikal.

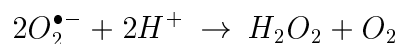
⁴Selbst bei medizinischen Ultraschalluntersuchungen lässt sich die Entstehung von Hydroxylradikalen nachweisen [36].

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

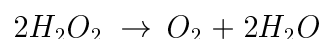
⁵Der Aktionsradius liegt bei ca. 1nm. Vergleich: eine durchschnittliche Zelle hat einen Durchmesser von 10.000nm.

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].

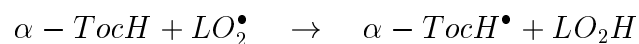
Die Katalase ist ein tetrameres Hämprotein mit je einer zentralen Eisen-Häm-Gruppe. Sie ist ubiquitär im Säugergewebe vorhanden, doch besonders in den Peroxisomen, wo eine Reihe von H_2O_2 -generierenden Enzymreaktionen stattfinden, lokalisiert. Im Zytosol, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien 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 (O₃, NO₂, SO₂, 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% O₂). Höhere O₂-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

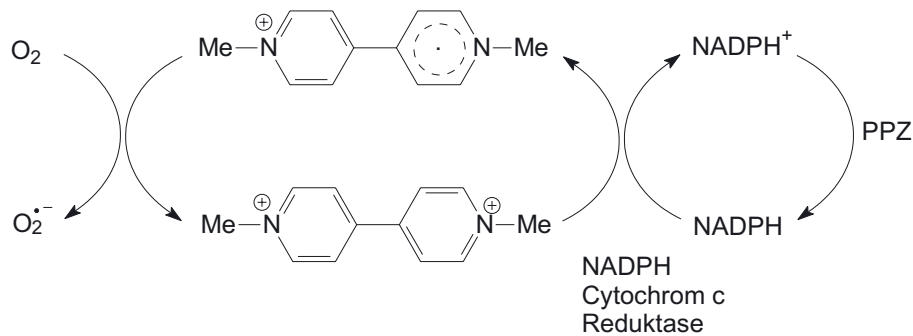


Abbildung 2: **Allgemein akzeptierter Mechanismus der PQ-Toxizität:** Als elektronenübertragendes System hier NADPH cytochrome c Reduktase (Mikrosomenfraktion). Die Übertragung eines Elektrons auf PQ (unten) führt zum PQ-Radikal (oben). Das zusätzliche Elektron "kreist" in einem der beiden Pyrindinringe und kann auf Sauerstoff (O₂) übertragen werden, wodurch Superoxidanionen entstehen (O₂^{•-}) [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.

2 Material

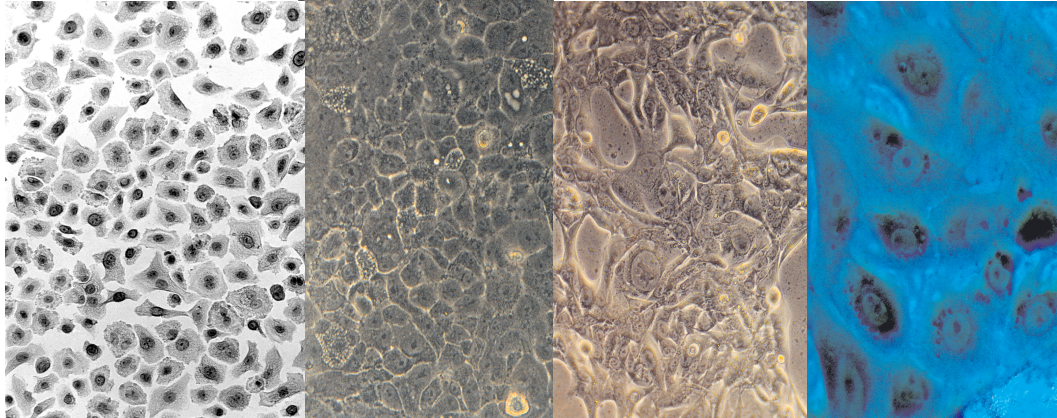


Abbildung 3: **Eingesetzte Zelltypen:** von links nach rechts: Normale humane Bronchialepithelzellen, Tumorzelllinie H322, Tumorzelllinie H358 und Primärzellkultur Alveolar TypII-Zellen der Ratte, 3 Tage in Kultur nach Osmiumtetroxid-Tanninsäure-Färbung.

2.1 Versuchstiere

Für die Präparation von Alveolar TypII-Zellen, Lungenschnitten sowie Mikrosomenfraktionen wurden männliche Wistar-Ratten (Wistar Hanover) der zentralen Tierzucht der Universität Halle mit einem Gewicht von 100 - 150 g eingesetzt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit Hell- und Dunkelperioden von je 12 h und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

2.2 Normale humane Bronchialepithelzellen

Zur Gewinnung von humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ, Abb. 3), wurden humane Bronchusresektate aus tumorfreien Regionen von Lungenteilresektionen verwendet. Die Patienten wurden aus verschiedenen Krankenhäusern aus der Umgebung von Halle an das Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität zur operativen Therapie aus klinischer Indikation überwiesen. Das Alter, die Einnahme von Medikamenten, Rauchgewohnheiten und andere Besonderheiten waren keine Ausschlusskriterien. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Halle liegt vor. Eine Liste der Patienten zeigt Tabelle 1.

2.3 Zelllinien

Die Tumorzelllinien H358 und H322 (Abb. 3) wurden von Professor Wiebel, Institut für Toxikologie, Gesellschaft für Strahlenforschung zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie H358 stammt von einem humanen nichtkleinzelligen Lungen-Karzinom und ist morphologisch gleich den Alveolar TypII-Zellen. Sie ist p-53 negativ. Die Linie H322 stammt von einem humanen nichtkleinzelligen, nichtzilientragendem Lungen-Karzinom. Morphologisch sind es Bronchialepithelzellen, sogenannte Clarazellen mit endogener Mutation im Tumorsuppressorgen p-53.

ID Nr.	Geschlecht	Alter in Jahren	Diagnose
63	m	64	Bronchialkarzinom
64	m	60	Bronchialkarzinom
68	m	75	Bronchialkarzinom
71	m	41	Bronchialkarzinom
74	w	46	Bronchialkarzinom
75	m	66	Bronchialkarzinom

Tabelle 1: Patienten für NHBEZ (m=männlich, w=weiblich)

2.4 Chemikalien und Biochemikalien

Alle im folgenden nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen) bezogen.

DEMEM Trockensubstanz, HAM-F 12 (GIBCO, Berlin), L15-Leibovitz Puffer (BIOCHROM, Berlin), Fetales Kälberserum (SEROMED, Berlin), Penicillin/Streptomycin, Rinderserumalbumin (C. C. PRO GMBH, Berlin), Percoll 1,124g/ml (PHARMACIA), Pentobarbital, Serdolit MB-1 Ionenaustauschharz, Katalase von *Aspergillus niger* und Nitrobluetetrazolium (SERVA, Heidelberg), Tris-Puffer, Dimethylsulfoxid, Folin-Reagenz, Ciocalteus-Phenol Reagenz, Wasserstoffperoxid, Ameisensäure, Denharts, NADPH, DPI und Natriumdithionit (MERCK, Darmstadt), Sodium Dodecyl Sulfate, Heringssperma DNA, Polynukleotidkinase T4 und Xanthinoxidase (BOEHRINGER, Mannheim), PBS Instand (BIOCHROM KG, Berlin), TRYZOLTM Reagenz (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe), DNase RQ1 RNase free, Random Xexamere, Taq DNA-Polymerase (PROMEGA, Mannheim), dNTP (HYBAGID-AGS, Heidelberg), Gel-Extraktions-Kit (PEQLAB), Multiprime Kit (AMERSHAM), 2-Propanol, Agarose NEO (ROTH), [γ -³² P] ATP 6000 Ci/mmol (NEN, Bad Homburg), DEPMPO (CALBIOCHEM, La Jolla, Ca, USA), NTA, Desferoxamin und Katalase aus Rinderleber (ICN-BIOMEDICAL, Inc. Ohio).

2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

GERÄTE/MATERIAL	HERSTELLER
- Autoklav	HERAEUS-INSTRUMENTS Hanau
- Brutschrank BBD 6220	HERAEUS-INSTRUMENTS Hanau
- Kulturgefäße	NUNC Dänemark
- Inversmikroskop Axiovert 25	ZEISS Jena
- Invers Fluoreszenzmikroskop	ZEISS Jena
- Tiefkühlschrank -80C	HERAEUS-INSTRUMENTS Hanau
- Sterilbank HERA-safe	HERAEUS-INSTRUMENTS Hanau
- Sterilfiltrations Filter	SARTORIUS AG Göttingen
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco	HERAEUS INSTRUMENTS Hanau
- Ultrazentrifuge XL-100	BECKMAN-USA
- Eppendorf-Concentrator 5301	EPPENDORF Hamburg
- GS-15R Centrifuge	BECKMAN-USA
- Ultraschallhomogenisations- gerät Labsonic L	Braun Melsungen
- Ultra-Thurax-Messer T25	IKA-Labortechnik
- Photometer DU 640	BECKMAN München
- Magnetrührer, Cuv-o-stir	HELLMA, Mühlheim
- Mikroliterspritze	HAMILTON GC
- Chemoluminometer Lumat 9501	EG & G BERTHOLD Wildbach
- Elektronenresonanz-Spektrometer	ERS 220, ZWG Berlin
- Thermocycler	EPPENDORF Hamburg
- BAS Imager, BAS-1500	RAYTEST Berlin
- BAS-1500	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
- Imaging plates	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
- Imaging plates Cassette	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
- Eraser	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
- Auswertungssoftware Tina 2.0	RAYTEST Berlin
- Scannersoftware Bas-Reader 2.9	RAYTEST Berlin
- Bas-Reader 2.9	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
- horizontale Elektrophorese- kammer	ROTH Karlsruhe
- Stromversorgungsgerät	BIOTEC FISCHER Rieskirchen

- MicroSpin Sephadex G25 Säulen	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH Freiburg
- Hybridisierungsöfen	BIOMETRA Göttingen
- Nylon-Membrane Hybond-N, RPN 203 N 0,45 μm	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH Freiburg
- Photometer -Lambda 14	PERKIN ELMER Überlingen
- UV WinLab und UV KinLab	PERKIN ELMER Überlingen
- Polarograph	Oroborus

3 Methoden

3.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

Einmalartikel für die Zellpräparation sowie Zellkultur wurden steril verpackt gekauft und verwendet, hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 120°C sterilisiert, nicht hitzebeständige Lösungen mit Sterilfiltern 0,45 μm oder 0,2 μm filtriert.

3.2 Alveolar TypII-Zellen, NHBEC, H322 und H358

Arbeit mit Zelllinien Kulturen der Tumorzelllinien H322 und H358 wurden in 58 cm² Kulturflaschen und in "Dulbeccos's modified Eagle's medium" (DEMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000 - 30.000 Zellen pro cm², Mediumwechsel erfolgte 3 mal pro Woche. Bei Erreichen von 80% konfluentem Wachstum (etwa alle 7-10 Tage) wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%, 0,1% EDTA in PBS) und Inkubation im Brutschrank für 2 bis 5 min abgelöst und subkultiviert. Für Induktions-Experimente wurden 21 cm² Kulturschalen verwendet und die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen pro cm² ausplattiert. Alle Inkubationsansätze wurden bei 80% subkonfluentem Wachstumsstadium (3. oder 4. Kulturtag) durchgeführt.

NHBEC Isolation Die Bronchusresektate stammen aus Teilresektionen von Tumorpatienten. Es wurde nur tumorfreies Gewebe distal vom Tumor verwendet. Die Organstücke wurden nach der Entnahme mehrmals mit kaltem L-15 Leibovitz-Puffer gewaschen und in L-15-Puffer transportiert. Der Bronchusbaum wurde mechanisch vom übrigen Lungengewebe getrennt und in ca. 0,2 - 0,5 cm² große Stücke geteilt. Die Stücke wurden auf beschichteten Kulturschalen (Kollagen 2%, Fibronectin 1%, Rinderserumalbumin 0,1%) in L15-Medium ausgebracht. Nach 5 min wurde serumfreies epith-o-ser Kulturmedium (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin, 0,205 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dexamethason, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IGF) hinzugegeben. Zwei bis drei Wochen danach zeigte sich ein subkonfluent (80-90%) Zellrasen und die Bronchialstücke konnten zur Auswachsung einer zweiten Generation umgesetzt werden. Die eindeutige Charakterisierung dieser Zellen als Epithelzellen wurde mittels immunhistochemischer Methoden getroffen. Die Zellen sind CD 68-negativ (Monozyten und Makrophagen), Desmin-negativ (Muskel), LCA-negativ (T-Zellen, Leukozyten), SMA-negativ (Fibroblasten), Vimentin-negativ (Mesoderm), aber Cytokeratin 7,8/18, 19-positiv (Epithelium) (Frau Dr. C. Taege, Institut für Pathologie).

Alveolar TypII-Zell-Isolation Für die Präparation eines Kulturansatzes wurden zwei männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 100 - 160 g verwendet. Die Isolation erfolgte in Anlehnung an die von Dobbs et.al. beschriebene und von Richards et.al. [42, 43, 118] modifizierte Methode. Vor Operationsbeginn wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und anschließend heparinisiert (2500 IE/kg). Die Lungen wurden freipräpariert, mit PBS perfundiert, alveolarlavagiert und mit Trypsin (0,25%) bei 37°C für 40 min inkubiert. Das Lungengewebe wurde separiert, zerteilt und für 10 min mit DNase-Lösung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine zweimalige Nylonnetzpassage mit einer Porengröße von 250 μm und 60 μM vorgenommen. Eine Aufreinigung der Zellen erfolgte über zwei diskontinuierliche Percollgradienten und differenzielle Adhärenz auf unbeschichteten Kulturschalen für 1 h (5% CO_2 , 37°C). Die im Überstand verbleibenden AII-Zellen wurden abgenommen, die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und die Vitalität durch Trypanblaufärbung bestimmt. Mittels Osmiumtetroxid-Tanninsäure-Färbung nach Mason et. al. [101], zur spezifischen Anfärbung der Lamellenkörperchen konnte eine über 90%ige Reinheit der AII-Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 300.000 - 400.000 Zellen pro cm^2 auf Rattenschwanzkollagen Typ1 (3,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Kulturplatten ausplattiert und in 50% DMEM / 50% HAM F12 (FKS 3%, Penicillin/Streptomycin 1 IE/ml, Insulin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Humantransferin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, T3 3,2 pg/ml, Hydrocortison 0,242 ng/ml) kultiviert (37°C, 5% CO_2). Innerhalb der folgenden 24 h bis 48 h breiteten sich die Zellen unter Abflachen und Ausbildung einer polygonalen Zellstruktur auf der Kulturschale aus. Die meist vereinzelt adhärenz bildenden Zellen bildeten durch Proliferation mehrzellige Zellinseln. Zwischen 48 h und 72 h kam es zu einer ausgeprägten Proliferation der kultivierten AII-Zellen, so dass sich ein subkonfluenten Zellrasen ausbildete. Zur eindeutigen Identifizierung der kultivierten Zellen als AII-Epithel wurde der Monolayer einer Färbung mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure unterzogen. Die kernnahen Lamellenkörperchen, welche als morphologisches Korrelat der Surfactantspeicherung anzusehen sind, ließen sich so auf Grund ihrer Osmiophilie als schwarze Einschlüsse darstellen (Abb. 3). Alle Inkubationsexperimente wurden am 3. Kulturtag angesetzt.

Zählung kultivierter Zellen Nach Abnahme des Mediums und einer zweifachen Spülung mit PBS erfolgte die enzymatische Ablösung der Zellen mit Trypsin. Die Zellsuspension wurde in PBS aufgenommen, in ein Saarestedtröhrchen überführt und für 5 min bei 900 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach der Größe der Kulturgefäße in einer bestimmten Menge PBS gelöst und in einer Fuchs-Rosenthalkammer ausgezählt.

Oxidanzien im Kulturmedium Für die Expositionsversuche wurde PQ in NaCl (0,8%) als 100 mM Stamm gelöst, kühl und dunkel gelagert, Wasserstoffperoxid wurde stets frisch in bidestilliertem Wasser in einer 100 mM Lösung angesetzt und in den Kulturmedien in den gewünschten Konzentrationen verdünnt.

3.3 Bestimmung der Zytotoxizität

Als Zytotoxizitäts- bzw. Vitalitätstest diente der MTT-Test [25, 63]. Nach Abnahme des Nährmediums und zweifacher Spülung mit PBS wurden die Kulturen mit dem gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in PBS (0,7 mg/ml) für 30 min inkubiert. Nach Entfernung der Überstände und zweifachem Spülen mit PBS wurde das gebildete blaue Formazan mit einem Gemisch aus Isopropanol und Ameisensäure (95/5, v/v) aus den Zellen gelöst und im Photometer bei 570 nm gegen Isopropanol/Ameisensäure vermessen.

3.4 HPLC-Analytik von Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) im Kulturmedium wurde mittels einer modifizierten HPLC-Methode von Draper et al. [47] bestimmt. Die Medienüberstände wurden in einer Phosphatlösung (25 mM) zusammen mit einer gesättigten Thiobarbitursäure-Lösung (TBS 100mM) und 0,2% Butylhydroxytoluol (BHT 23 mM) 30 min bei 93°C inkubiert. Danach wurde die Probe abgekühlt, jeweils 20 µl wurden bei Raumtemperatur auf einer Nova Pak C18 Stahl-Säule (3,9 x 150 mm, 4 µM Partikelgröße) aufgetragen. Nach dem Prinzip der Reversed-Phase HPLC wurde der TBS-MDA Komplex mit einer mobilen Phase aus Acetonitril (20%) und Tetrahydrofuran (9,6%) in Phosphat-Lösung (5 mM, pH 6,7) bei 553 nm quantifiziert. Die Retentionszeit betrug 3.10 - 3.20 min. Tetrahydropropan wurde als Standard benutzt (Abb.4).

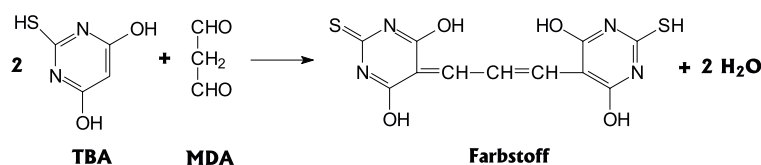


Abbildung 4: **Nachweisreaktion von Malondialdehyd (MDA):** Prinzip der Bestimmung mittels HPLC, Thiobarbitursäure (TBA) + MDA zu einem TBA-MDA Farbstoffkomplex.

3.5 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Zellhomogenaten und Mikrosomenfraktionen wurde in Anlehnung an die Methode von Lowry et. al. [95] bestimmt. Je Ansatz wurden 2 - 10 μl Proteinlösung eingesetzt, in einer Einmalküvette mit H_2O auf ein Volumen von 50 μl verdünnt und mit NaOH (0,1 mM) auf ein Gesamtvolumen von 200 μl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Gemisch. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, welches mit dem gleichen Volumen an bidestilliertem H_2O vorverdünnt worden war, hinzupipettiert, der Testansatz gut gemischt und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur die Absorption bei 578 nm gegen den Nullwert der Eichkurve gemessen. Die Quantifizierungen wurden jeweils mittels einer parallel bestimmten Konzentrationsreihe aus 0 - 20 μg Rinderserumalbumin (BSA) geeicht. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Das Lowry-Gemisch aus Na_2CO_3 (189 mM) in NaOH (0,1 M), CuSO_4 (0,6 mM) und Kalium-Natriumtartat (0,7 mM) wurde vor jeder Bestimmung frisch aus den Stammlösungen hergestellt.

3.6 Mikrosomen-Präparation

Es wurden 0,5 - 1 g Frischgewebe oder Zellen einer 58 cm^2 Petrischale eingesetzt. Die Organe wurden in 0,5 g-Proben portioniert und konnten nach Schockfrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert werden. Die Proben wurden in 3 ml eiskaltem Kaliumchlorid-Puffer (0,15 M, pH 7,4) aufgenommen. Feste Gewebsverbände der Organe wurden mit einem Ultra-Thurax-Messer zerkleinert und die Zellen aus der Kultur mit einem Schaber gelöst. Nach der Homogenisation im Teflon-Glas-Homogenisator (5 ml) bei 500 U/min mit 10 Hüben erfolgte eine Zentrifugation bei 9.000 x g und 4°C für 30 min. Der Überstand (Supernatant S9) wurde in ein Tube für die Ultrazentrifuge überführt. Das Pellet, welches Zelltrümmer, Kerne und Lysosomen enthält, konnte verworfen werden. Es wurde eine Stunde bei 105.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befand sich jetzt das Zytosol. Die Mikrosomen im Pellet wurden zum Waschen noch einmal in 1 ml KCl-Puffer resuspendiert und ein weiteres mal bei 105.000 x g für 1 h zentrifugiert. Die Waschpufferlösung wurde verworfen und das Pellet in einem kleinen Potterhomogenisator (2 ml) in 1 ml KCl resuspendiert. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry.

3.7 Enzymassay

Enzymassay SOD Zur Bestimmung der zytosolischen Cu/Zn-SOD benutzten wir den Superoxiddismutase-Assay-Kit von CALBIOCHEM. Er wurde nach den Angaben des Herstellers

durchgeführt und beruht auf der alkalischen Autooxidation von 5,6,6a,11b-Tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c] fluoran (Reagenz 1), zu einem blauen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 525 nm. Diesen Oxidationsprozess beschleunigen Superoxiddismutasen. Reagenz 2 (1,4,6-Trimethyl-2-vinylpyridinium) eliminiert Störungen durch Mercaptane (Thioalkohole). Die Vorinkubation mit einem Gemisch aus Ethanol/Chloroform (62,5/37,5 v/v) diente zur Aufreinigung und Inaktivierung der Mn-SOD und Fe-SOD. Mit einem Teflon-Glas-Potter homogenisiertes Gewebe bzw. Zellen einer 58 cm² Kulturschale in KCl-Puffer (0,15 mM, pH 7,4) wurde 30 min bei 9.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry. Einheitliche Proteinmengen wurden auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 400 µl Ethanol/Chloroformgemisch kräftig gevortext und für 5 min bei 3.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Messansatz (40 µl Überstand, 900 µl Puffer-Reagenz 3, 30 µl Reagenz 2) wurde für 1 min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte mit Reagenz 1 (30 µl). Gemessen wurde im Photometer (Beckman 640) bei 525 nm und 37°C über 4 min, die Bestimmung des Anstieges erfolgte im linearen Bereich. Der Hersteller gibt für seinen Kit eine Sensitivitätsschwelle von 0,1 SOD-525 Einheiten (U-525) pro ml an. In einem Bereich bis 1,75 U-525 verhielt sich die Enzymaktivität linear zur eingesetzten Proteinmenge (Abb. 5a). Alle Messwerte lagen über diesem Grenzwert und im linearen Bereich der Eichkurve. Die Umrechnung der Anstiege in Enzymaktivitäten erfolgte über den Quotienten der Anstiege Probe/Leerwert V_s/V_c .

Katalasebestimmung Die Katalaseaktivität wurde in Anlehnung an eine von Cohen et.al. [31] beschriebene Methode zur Messung des Wasserstoffperoxidverbrauchs (Absorptionsmaximum bei 240 nm) als Maß für die Katalaseaktivitäten durchgeführt. Auf die Zugabe von Triton-X-100 musste verzichtet werden, da dessen hohe Eigenabsorption die Messung erheblich störte. Auf Grund der geringen Gesamtkatalase-Aktivitäten der Lungenzell- und Zelllinienproben war es nötig, relativ viel Zellhomogenat einzusetzen. Die Gesamtabsorption stieg dann mit Triton über den linearen Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes, welches zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte. Da sich in den Peroxisomen die Hauptmenge der Katalase befindet und dies recht fragile Zellorganellen sind, muss davon ausgegangen werden, dass der Zellaufschluss die Aktivitätsmessung nicht beeinträchtigt. Als Puffer diente KCl (0,15 M, pH 7,4), da auch hier die Messwerte am besten reproduzierbar waren und der pH-Wert dem physiologischen Wert näher liegt. Der Zellmonolayer einer 58 cm² Kulturschale der Tumorzelllinien wurde zweimal mit PBS gespült, mit Hilfe eines Schabers in 1 ml KCl aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei den Gewebeproben wurden 0,5 g mit Hilfe eines Ultra-Turax Messers in 3 ml KCl zerkleinert. Die Lagerung der Proben zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte immer auf Eis.

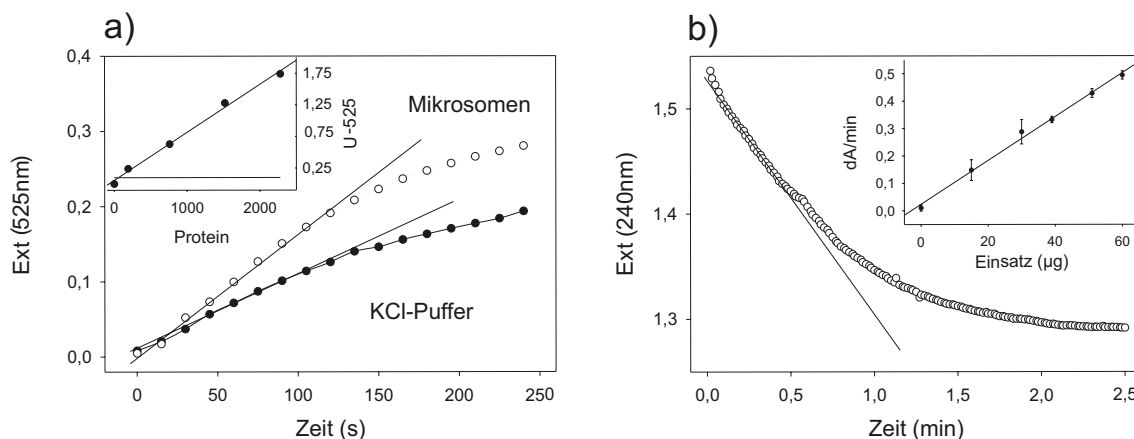


Abbildung 5: **a) Bestimmung der Kupfer/Zink Superoxiddismutase:** 625 µg Gesamtprotein aus einem 9.000 x g Überstand homogenisierter Rattenleber in KCl-Puffer wurden mit einem Ethanol/Chloroformgemisch extrahiert und mit Hilfe von Reagenz 1 bis 3 bei 525 nm vermessen. Als Leerwert diente 250 µl reiner KCl-Puffer. Gezeigt ist die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit. **Insert:** Eichkurve der Cu/Zn-SOD Bestimmung. Der Messansatz bestand aus 0; 5; 20; 40 und 60 µl Extraktionsüberstand, dies entspricht 0 bis 2,2 g Protein und Reaktionspuffer 1 bis 3. Gezeigt sind die berechneten Enzymaktivitäten in U-525 zur eingesetzten Proteinmenge in µg. **b) Bestimmung der Katalaseaktivität über den Abfall der H₂O₂-Konzentration:** Hier im 9.000 x g Überstand aus homogenisierter Rattenlunge. Gezeigt ist die Abnahme der Absorption über die Zeit. **Insert:** Kalibrierungsgerade, 15 bis 60 µg aus einem 9.000 x g Überstand aus Rattenleber wurden vermessen. Alle Verdünnungen wurden viermal angesetzt, gezeigt sind die Mittelwerte ±S_E der relativen Anstiege als ΔE zur eingesetzten Proteinmenge in µg.

Die Homogenisierung erfolgte mit 15 Hüben in einem Teflon-Glas Potter bei 500 U/min, da mit einem Ultraschallgerät keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Proben wurde für 30 min bei 9.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry. Zur Messung wurden je nach Ausgangsmaterial 200 - 600 µg Protein mit KCl-Puffer auf ein einheitliches Volumen von 1.176 µl gebracht. Es erfolgte eine Vorinkubation mit Ethanol (30 min., 17 M) auf Eis zur Hemmung anderer H₂O₂ abbauender Enzyme und zur Stabilisierung der Katalase. Gemessen wurde im Photometer bei 240 nm nach Zugabe von H₂O₂ (24 mM) für 90 s. Im ersten linearen Teil der Kurve wurde der Anstieg bestimmt (Abb. 5b) und die Enzymaktivität berechnet.

$$\frac{\text{Anstieg} \cdot 1000}{43,6 \cdot \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Reaktionsmix}}}$$

43,6=molarer Extinktionskoeffizient bei 24 mM von H₂O₂ [31].

3.8 Untersuchungen der mRNA-Expression

Für das Arbeiten mit RNA wurden alle Proben und Lösungen während der Präparation und sämtlicher weiteren Arbeitsschritte auf Eis gehalten, alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Elektrophoresekammer, Kämme und Zubehör sowie Pipetten und Schaber wurden mit einem NaOH-Bad (50 mM) und/oder UV-Bestrahlung von RNAsen befreit und nur DEPC-bidestilliertem-Wasser (0,1% Diethylpyrokarbonat und anschließende Autoklavierung) benutzt.

RNA-Isolierung Die gesamtzelluläre RNA wurde nach einer Modifikation der Methode von Chromczynski und Sacchi [28] mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Tryzol-Reagenz isoliert. Zur Isolierung wurden in der Regel Zellen einer 21 cm² großen Petrischale eingesetzt, daraus wurden je nach Ausgangsmaterial zwischen 20 µg und 80 µg Gesamt-RNA isoliert. In die Kulturschalen wurde nach Abnahme des Nährmediums und nach der Spülung der Monolayer 1 ml Tryzol-Reagenz gegeben, die Zellen abgeschabt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach vollständiger Lyse (5 min bei Raumtemperatur) wurden die Proben mit Chloroform (200 µl) versetzt und gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-haltige Phase (ca. 300 - 400 µl) wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, Isopropanol (500 µl) hinzugegeben und gevortext. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -20°C bzw. mindestens 30 min und einer Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g. Nach zweimaligem Waschen der RNA-Pellets mit Ethanol (1 ml, 75%), vortexen und wieder abzentrifugieren für 10 min bei 12.000 x g, trocknete das Pellet bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes für 5 - 10 min bei 60°C im Thermomixer. Die Gesamt-RNA wurde je nach Menge und Ausgangsmaterial in 20 - 40 µl DEPC-H₂O aufgenommen und abschließend für 10 min bei 60°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei baldiger Weiterverarbeitung auf Eis oder konnte bei -80°C über Monate gelagert werden.

RNA-Konzentrationsmessung 1 µl oder 5 µl RNA-Probe wurde auf 1 ml DEPC-H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient 260 nm / 280 nm diente zur internen Qualitätskontrolle der Präparation und lag zwischen 1,8 und 2. Die Konzentration der RNA in µg/µl ergab sich aus der OD bei 260 nm, multipliziert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor.

3.8.1 Northern Blot-Analytik

Die Durchführung der Northern-Blot-Analysen zur Quantifizierung der spezifischen mRNA folgte mit leichten Modifikationen der bei Southern and Sambrook et. al. beschriebenen Standardprotokolle [125, 137]. Die isolierte RNA wurde nach Denaturierung mit Formamid und Formaldehyd gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung in Banden der ribosomalen RNA (rRNA) sowie der verschiedenen Messenger-RNA (mRNA)-Transkripte erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Die spezifischen Transkripte lassen sich auf diesen Membranen durch Hybridisierung mit 32 Phosphor-markierten cDNA-Sonden und anschließender Autoradiographie bzw. einer Auswertung im Phosphorimager sichtbar machen und quantitativ auswerten.

Analytische Agarose-Gelelektrophorese Die RNA-Proben wurden schonend auf Eis aufgetaut und 5 - 15 μ g in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels Wasser auf ein einheitliches Volumen gebracht. Es erfolgte die Zugabe von 10fach MOPS-Puffer 10% (v/v), Formaldehyd (final 2,2 M) und deionisiertem Formamid 50% (v/v). Pro Reaktionsgefäß wurde 1/5 des Endvolumens Blaupuffer (Na_2HPO_4 5 mM, Bromphenolblau 0,45% w/v, Glycerin 13,7 M und Ethidiumbromid 0,02 mg/ml) hinzugegeben. Die RNA-Marker wurden parallel behandelt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1% Agarosegel (1 g/100 ml in 1x MOPS-Puffer) in einer 12 x 14 cm großen Gelkammer und mit einer Dicke von 0,5 cm bei 90 V über 3 h. Als Laufpuffer diente 1 fach MOPS (0,2 M MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in DEPC- H_2O). Die gleichmäßige Gelbeladung wurde durch Dokumentation der mit Ethidiumbromid interkalierten ribosomalen RNA-Banden mittels UV-Durchlicht geprüft. Die 28S- und 18S-Banden dienten als interner Molekulargewichtsstandard (Abb. 6). Die RNA wurde in Anlehnung an eine von Southern et. al. [137] beschriebene Methode durch Nutzung von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Porengröße 0,45 μ m) über Nacht transferiert. Als Puffer diente 20 x SSC (NaCl 3 M, Trisnatriumcitrat 0,3 M, pH 7,4), danach wurde die RNA durch 3 min UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

Markierung von gereinigten cDNA-Sonden Spezifische cDNA (PCR-Produkte) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Gel-Extraktions-Kit (PEQLAB) extrahiert. Die Markierung der gereinigten cDNA erfolgte mit einem Labelingsystem (Multiprime, Amersham) nach Denaturierung bei 95°C für 10 min in einem Ansatz aus 10 μ l 5x Label-Puffer, 5 μ l Primer, 2 μ l Klenow-Fragment und 5 μ l 32 P-dCTP, für 30 min bei 37°C. Über eine Sephadex-G2-Säule wurde der Ansatz von ungebundenem 32 P-dCTP und Salzen gereinigt. Die gebundene Aktivität in den cDNA-Fragmenten wurde in einem Szintillationszähler (2 μ l Ansatz, 3 ml

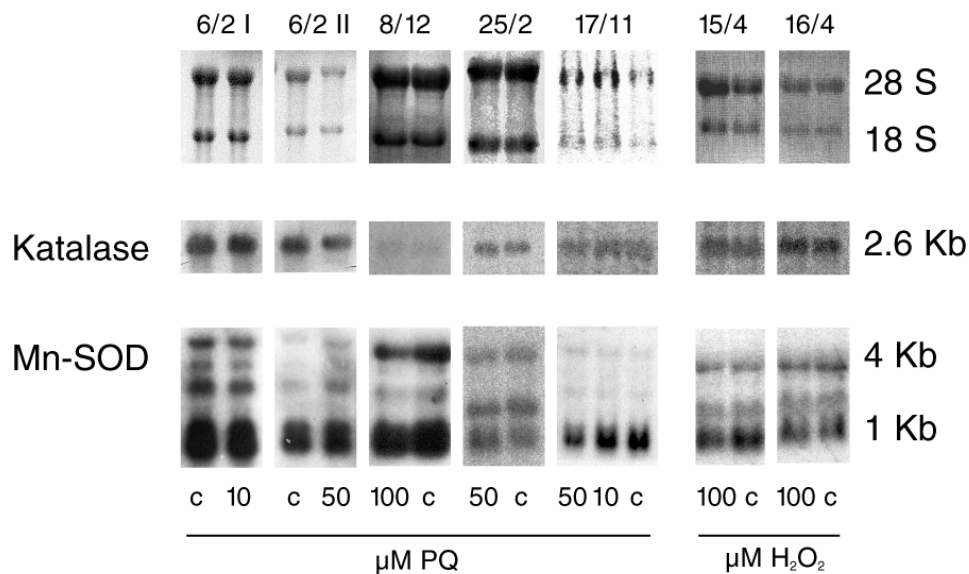


Abbildung 6: **Northern-Blot-Analytik:** Katalase und Mn-SOD mRNA-Expression unter Kontrollbedingungen (c) kultivierten All-Zellen und unter Gegenwart von PQ oder H₂O₂ kultivierten All-Zellen: All-Zellen wurden für 72 h kultiviert und 20h mit PQ oder H₂O₂ inkubiert, Kontrollzellen erhielten ausschließlich All-Medium. Pro Probe wurden 20 μg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Katalase mRNA (Mitte) und Mn-SOD mRNA (unten) erfolgte durch Hybridisierung mit einer ³²Phosphor-markierten Katalase bzw. Mn-SOD-spezifischen cDNA-Sonde. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Gelbeladung sind die ribosomalen 18S und 28S rRNA gezeigt (oben).

Szintillationsflüssigkeit-Rotoszint) bestimmt. Danach wurden 300 μl Heringssperma-DNA (HS-DNA) hinzugegeben. Die HS-DNA (10 mg/ml) wurde in Trispuffer (20 mM, pH 7,5) gelöst, über Nacht bei 4°C gerührt und mit einem Ultraschallgerät fragmentiert. Die Fragmente der HS-DNA lagen zwischen 500 und 700 Basenpaaren, welches durch einmaliges Auftragen auf ein Agarosegel (3%) überprüft wurde. Der Ansatz wurde nun komplett in die Prähybridisierungslösung zu den Membranen pipettiert.

Hybridisierung und Waschen der Membranen Der Prähybridisierungsschritt diente zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen auf der Nylonmembran und wurde über 2 h bei 65°C durchgeführt. Die Prähybridisierungslösung bestand aus NaCl (0,9 M), Trinatriumzitat (0,09 mM), deionisiertem Formamid (50% v/v), Denharts (10% v/v von 50fache Stammlösung) und denaturiertem HS-DNA (400 μg/ml). Anschließend wurde die markierte Oligonukleotidsonde

hinzugegeben und über Nacht bei 60°C hybridisiert. Danach wurden die Membranen bei 38°C je zwei mal 5 Minuten in absteigender Konzentration des Waschpuffers SSC/SDS (2fach SSC/0,1% SDS, 1fach SSC/0,1% SDS, 0,1fach SSC/0,1% SDS) gewaschen. Bei Erreichen konstanter Radioaktivität bzw. etwa 1/10 des Ausgangswertes der Membranen, gemessen mit einem Counter nach jedem Waschschrift, wurde die Waschprozedur abgebrochen.

Auswertung der Blots Die Auswertung erfolgte im Phosphorimager nach Exposition der Imagerplatten mit der gewaschenen Membran in einer Autoradiographiekassette über 2 h bzw. bei zu schwachem Signal bis zu 24 h. Zur densitometrischen Computerauswertung wurde das Programm TINA benutzt. Wenn die Hintergrundaktivität auf den Membranen zu hoch war, wurde erneut gewaschen.

3.8.2 Reverse Transkription und PCR

Für die Durchführung der RT-PCR musste die zelluläre Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkription). Es wurden 2 µg Gesamt-RNA in 10 µl Puffer (40 mM Tris HCl pH 8; 1 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂) eingesetzt. Um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden, wurde für 30 min bei 37°C mit RNase-freier DNase (1 unit/µg RNA) inkubiert und mit 1 µl Stop-Puffer (20 mM EGTA pH 8,0) für 10 min bei 65°C beendet. Zu der Probe wurden 500 ng Random-Hexamer gegeben und für 5 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe von 5x Reaktionspuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) und dNTP (1 µl) wurde die cDNA-Synthese bei 37°C für 60 min durchgeführt und bei 94°C für 5 min beendet.

Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die PCR-Amplifikation eingesetzt. Folgende Primer wurden genutzt:

Mensch: β-Actin 196 bp ACG GCT CCG GCA TGT GCA AG und GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC [83], Mn-SOD TCC ACC ACC GTT AGG GCT GAG G und CAC CAG CAG GCA CCT GGC TCC [10], Katalase AAG ACC AGT TTA CCA ACT GGG UND CAG ATG GAC ATC GCC ACA TG [48, 111].

Ratte: β-Aktin 630bp TAC AAC CTC CTT GCA GTC CC und GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC [113], Mn-SOD 385 bp GAC CTG CCT TAC GAC TAT GG UND GAC CTT GCT CCT TAT TGA AGC [40, 78], Cu/Zn-SOD 383 bp GCC GTG TGC GTG CTG AA und TTT CCA CCT TTG CCC AAG TCA [27], Katalase 395 bp GTG AGA ACA TTG CCA ACC AC und CTC GGG AAA TGT CAT CAA AAG [27, 60].

Zur Amplifikation wurden 10 µl 1 : 5 verdünnter cDNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 50 µl 10 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton^R-X-100, 1,5 mM MgCl₂,

200 μ M dNTP, 500 nM Primer und 1,2 Units Taq-DNA-Polymerase. Für die Human- und Ratten-Mn-SOD, Cu/Zn-SOD und Katalase wurde über 30 Zyklen bei 55°C amplifiziert, für β -Aktin der Ratte 24 Zyklen bei 58°C und human 25 Zyklen bei 55°C.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und densitometrisch ausgewertet (Abb.7).

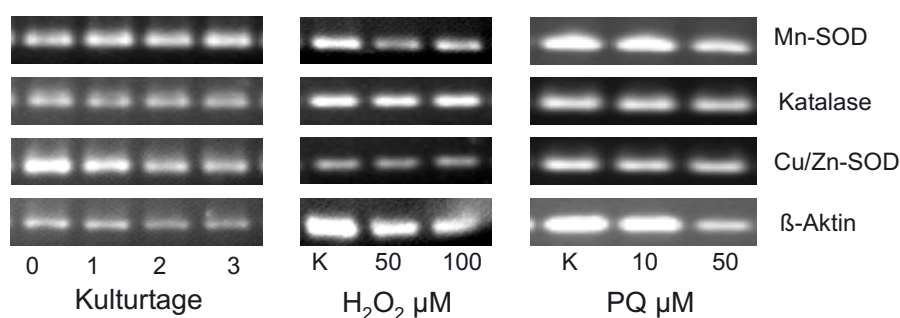


Abbildung 7: **Exemplarische Darstellung der RT-PCR-Analytik:** Einfluss der Kulturdauer oder Inkubation mit PQ bzw. H_2O_2 auf die mRNA-Expression von Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD in Primärkulturen von Alveolar TypII-Zellen.

All-Zellen wurden bis 72 h kultiviert und 20 h mit PQ oder H_2O_2 inkubiert. Kontrollzellen (8k) erhielten ausschließlich All-Medium. Gezeigt sind die PCR-Produkte für Katalase, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD und β -Aktin an den Kulturtagen 0 bis 3 und nach PQ- oder H_2O_2 -Inkubation.

3.9 Spektrophotometrische Methoden

Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium Der Nachweis wurde in Abwandlung einer einfachen spektrophotometrischen Methode durchgeführt, welche in der klinischen Toxikologie zur Quantifizierung von PQ in Körperflüssigkeiten Verwendung findet [38, 88]. Das Prinzip basiert auf der Messung des PQ-Radikals, das nach Zugabe eines Reduktionsmittels unter alkalischen Bedingungen stabilisiert wird. Als Reduktionsmittel dient Natriumdithionit. Zum Luftabschluss wurde Hexan über die Proben geschichtet. Die Reduktionsmittellösung (1% Natriumdithionit in 0,1mol/l Natronlauge) wurde immer erst kurz vor Gebrauch hergestellt und auf Eis gehalten. Als Extraktionsmittel und zur Eiweißdenaturierung diente ein Gemisch aus 80% Chloroform und 20% Ethanol (96%). In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden zu 1 ml Probe 750 μ l Extraktionsmittel pipettiert und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden ca. 0,5 g Natriumthiosulfat-5-hydrat zugegeben und so lange intensiv geschüttelt bis sich das Salz vollständig gelöst hatte. Nach Zentrifugation bei 2.000 x g für 10 min wurden 200 - 600 μ l von dem Überstand in eine Quarzküvette überführt. Natriumdithionit-Lösung wurde auf Küvettenvolumen (1 ml) zugegeben und kurz verrührt. Sofort wurde Hexan (100 μ l) überschichtet und

bei 396 nm gegen den Reagenzienleerwert Medium ohne PQ vermessen. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden verschiedene PQ-Konzentrationen im Medium hergestellt und vermessen. Die Vorbereitung zur Messung erfolgte für jede Probe einzeln, es wurde darauf geachtet, Proben eines Messansatzes einschließlich der Eichkurve möglichst gleich zu bearbeiten. Unter der gewählten Versuchsanordnung verhält sich die Eichgerade in einem Bereich von 0 bis 250 μM PQ nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz.

NADPH Verbrauchsmessung und exemplarische Konzentrationsbestimmung über den molaren Extinktionskoeffizienten NADPH besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm und kann dadurch mit einem Photometer quantitativ bestimmt werden. Die gemessene Extinktion E in Abhängigkeit von der Zeit lässt eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit als $\Delta E/\text{Zeiteinheit}$ und damit umgesetzte Mole zu der Zeit zu. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ und Umstellung des Lambert-Beerschen-Gesetzes lässt sich die Konzentrationsänderung Δc berechnen.

$$\epsilon_{340nm} = 6,22 \cdot \frac{ml}{\mu mol \cdot cm}$$

$$\Delta E = \epsilon_{340nm} \cdot \Delta c \cdot d \quad \text{in} \quad \Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon_{340nm} \cdot d}$$

Kontrollmessung: Die molare Masse für NADPH beträgt 833,4 g. Daraus ergibt sich aus 8,33 mg in 1ml Puffer eine 10 mM Lösung bzw. entsprechen 4,17 mg/ml einer 5 mM Lösung. 20 μl dieser NADPH-Stammlösung (5 mM) plus 980 μl Puffer (Tris 20 mM pH 8,0) ergeben dann eine 0,1 mM NADPH-Lösung. Die gemessene Extinktion dieses Verdünnungsansatzes betrug 0,61 bei 340 nm. Es ergibt sich ein errechneter Konzentrationswert von 0,098 mmol/l.

Die Messung der Enzymkinetik erfolgte in einem Ansatz aus PBS-Hepes (pH 7,4, 20 mM, ad 1000 μl), Mikrosomenfraktionen aus Leber oder Lunge der Ratte (50 μg) und NADPH (300 μM). Nach 6 min erfolgte die Zugabe von PQ in einer Endkonzentration von 100 μM bzw. 1 mM. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde über die Anstiege im ersten bzw. zweitem Teil der Messkurve ermittelt (Abb. 8a).

Nitrobluetetrazolium Superoxid reduziert den gelben Farbstoff Nitrobluetetrazolium in das blaue Formazan, wobei zur kompletten Reduktion 4 Elektronen benötigt werden. Formazan besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=570$ nm. Die Bildung von Formazan und damit indirekt von

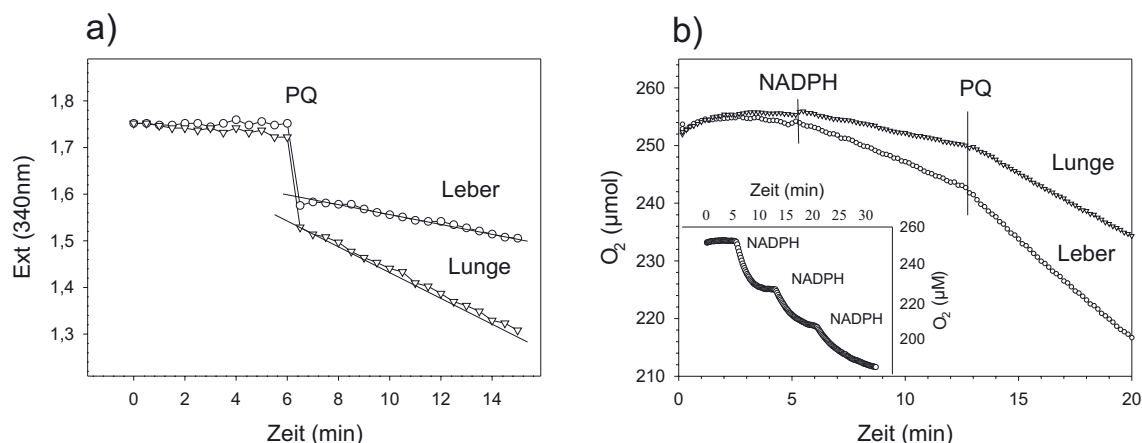


Abbildung 8: **a) Bestimmung des NADPH-Verbrauchs, Einfluss von PQ auf den NADPH-Verbrauch von Mikrosomen:** Gezeigt ist die Extinktion bei 340 nm als Maß für die NADPH-Konzentration zur Zeit 0-15 min. Die Zugabe von PQ erfolgte zum Zeitpunkt 6 min und startet die Reaktion.

b) Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs, Einfluss von NADPH und von PQ auf den Sauerstoffverbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Gesamtleber- und Lunge der Ratte: Gezeigt ist die Sauerstoffkonzentration (μM) zur Zeit (min). Inset: Einfluss von NADPH auf den Sauerstoffverbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Hepatozyten der Ratte. Gezeigt ist die Sauerstoffkonzentration (μM) zur Zeit (min). Mikrosomenfraktionen aus Hepatozyten der Ratte.

Superoxid kann mit einem Photometer quantitativ verfolgt werden. Über den molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{570nm} = 11,0 \frac{\text{ml}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}$) und das Lambert-Beersche-Gesetz lässt die gemessene Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit als $\Delta E/\text{Zeiteinheit}$ und damit umgesetzte Mole pro Zeiteinheit zu. Gemessen wurde in Mikrosomen aus Leber und Lunge der Ratte ($50 \mu\text{g}$) in einem Ansatz aus PBS-Hepes (pH 7,4 ad $1000 \mu\text{l}$), NBT ($100 \mu\text{M}$), NADPH ($300 \mu\text{M}$) unter Zugabe von $5 \mu\text{l}$ SOD und oder PQ (1 mM).

3.9.1 Systeme zur PQ-Reduktion

Zur Reduktion von PQ in das blaue PQ-Radikal wurden zwei Systeme etabliert. Ein enzymatisches mit Hilfe von Xanthin und Xanthinoxidase und ein chemisches mittels Natriumdithionit. Eine Quantifizierung ist über den molaren Extinktionskoeffizienten von $\text{PQ}^{\bullet+}$ von $1,33 \times 10^4 \frac{\text{ml}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}$ bei 603 nm möglich [102].

Wenn anaerobe Bedingungen erforderlich waren, wurde der Puffer (PBS pH 7,4) und alle weiteren Reaktanten vor der Zugabe mit Stickstoff begast. Auch die Quarzküvette wurde vor dem Einbringen der Reaktanten mit Stickstoff gefüllt und nach dem Einfüllen des Testansatzes mit Hilfe eines speziell angefertigten Teflonstempels luftdicht verschlossen. Die weiteren Zuga-

ben und der Start der Reaktion erfolgten mit Hilfe einer Mikroliterspritze über ein Steigrohr im Teflonstempel. Eine Durchmischung des Reaktionsansatzes erfolgte mittels Magnetrührer und Magnetfisch direkt in der Küvette (Abb. 9).

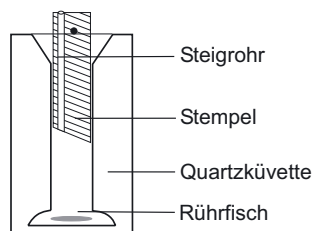
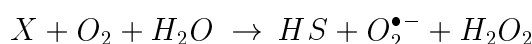


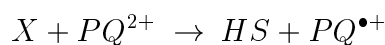
Abbildung 9: **Spezialküvette für die UV-Vis Spektroskopie:** Küvette zum Messen unter anaeroben Bedingungen. Ein Teflonstempel schließt den Reaktionsansatz ab. Die Zugabe der Reaktanten erfolgt über ein Steigrohr. Gemischt wurde mit einem Magnetrührer.

Natriumdithionit (NDT) PQ^{2+} kann durch NDT zu $PQ^{\bullet+}$ reduziert werden und unter anaeroben Bedingungen so lange stabilisiert werden, wie ein neuer Elektronenakzeptor für das $PQ^{\bullet+}$ fehlt. Das $PQ^{\bullet+}$ besitzt eine tiefblaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 603 nm und 396 nm. Es wurde die Bildung der reduzierten Form von PQ durch NDT und der Einfluss von verschiedenen NDT-, H_2O_2 - und Desferoxamin-Konzentrationen auf verschiedene PQ-Konzentrationen untersucht. Ein typischer Messansatz bestand dann aus PBS (pH 7,4 ad 1000 μ l) und PQ (50 μ M), in der Küvette luftdicht verschlossen. Die Reduktion erfolgte durch die Zugabe von NDT (0,6 mM), welches vor jedem Messansatz frisch in PBS gelöst wurde, mittels Mikroliterspritze. Um den Einfluss von H_2O_2 und Desferoxamin auf die $PQ^{\bullet+}$ -Generierung zu untersuchen wurden 5 μ l H_2O_2 (100 mM) oder als Kontrolle 5 μ l H_2O über das Steigrohr hinzupipettiert und gemischt. Die Experimente wurden mit und ohne Desferoxamin (0,1 und 1 mM, 30 min vorinkubiert im Puffer) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Xanthin/Xanthinoxidase-Enzysystem Zur Generierung von Paraquatradikalen durch ein Enzysystem wurde ein Xanthin/Xanthinoxidasesystem stellvertretend für andere elektronenübertragende Enzysysteme etabliert. Die Grundreaktion unter aeroben Bedingungen ist die Bildung von Harnsäure (HS), $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 aus Xanthin (X), Sauerstoff und Wasser.



Mit PQ unter anaeroben Bedingungen erfolgt die Reduktion zu $PQ^{\bullet+}$ unter Bildung von Harnsäure.



In diesem System kann parallel zur $PQ^{\bullet+}$ -Generierung die Bildung von Harnsäure (Absorptionsmaximum bei 293 nm) beobachtet werden. Die Versuchsanordnung erfolgte analog der NDT-Experimente. Gemessen wurde in einer luftdichten Spezial-Quarzküvette bei Raumtemperatur (Abb. 9). Ein typischer Ansatz bestand aus PBS (pH 7,4, ad 1.000 μ l), PQ und Xanthin (200 μ M), die Reaktion wurde nach wenigen Minuten mit Xanthinoxidase (ca. 40 mU) mittels Mikroliterspritze gestartet. PQ, H_2O_2 und Katalase wurden in verschiedenen Konzentrationen zum Ansatz pipettiert bzw. wurden schon vor dem Reaktionsstart hinzugefügt. Die Löschung des PQ-Signals erfolgte im Standardansatz (PQ 50 μ M) durch die Zugabe von 5 μ l H_2O_2 (10 mM) oder als Kontrolle 5 μ l H_2O , beide stickstoffbegast. Die Experimente wurden mit und ohne Desferoxamin (0,1 oder 1 mM, 30 min vorinkubiert im Puffer) durchgeführt.

3.10 Polarographische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Der Gesamtsauerstoffverbrauch einer Reaktion und die Geschwindigkeit des O_2 -Verbrauchs lässt sich in wässriger Lösung polarographisch in einer Oxygraphenkammer direkt bestimmen und über die Zeit verfolgen. Der Sauerstoffverbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Leber und Lunge der Ratte wurde in Abhängigkeit zur PQ-Konzentration untersucht.

Zu einem Messansatz aus PBS Hepes (pH 7,4 ad 1600 μ l) und Mikrosomen (50 μ g) wurde nach 5 min NADPH (300 μ M) als Reaktionsstarter gegeben, nach weiteren 10 min erfolgte die Zugabe von PQ (1 mM). Die Anstiege wurden im linearen Teil der Kurven bestimmt (Abb. 8b).

3.11 Lucigeninchemolumineszenz im Bioluminator

Lucigenin wurde lange Zeit als Detektormolekül für Superoxidanionen genutzt. Der Einfluss von PQ auf die durch Mikrosomen generierte Chemolumineszenz mittels Lucigenin wurde in einem Bioluminat untersucht. Der Standardmessansatz bestand aus PBS-Hepes (pH 7,4 ad 1000 μ l), Lucigenin (50 μ M) und Mikrosomen (Leber/Lunge Ratte, 50 μ g), der Reaktionsstart erfolgte nach 2 min durch Zugabe von NADPH (300 μ M). Nach 5 bzw. 10 min erfolgte die Zugabe von SOD (5 μ l u.v.) und Katalase (10 μ l u.v.). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.12 ESR-Technik und Spin-Trap

Die angewendeten ESR-Untersuchungen beruhen auf dem Prinzip, dass paramagnetische Radikale (durch das freie Elektron) durch ihr Resonanz-Spektrum in einem Magnetfeld erfasst werden können. Es ist dabei möglich, aus der Analyse des Spektrums das Radikal zu identifizieren und anhand einer Flächenintegration zu quantifizieren. Verschiedene, per se sehr kurzlebige Radikale können durch Reaktion mit einer Spin-Trap stabile Addukte bilden und dadurch vermessen werden. Als Spin-Trap für die Darstellung von Hydroxylradikalen wurde 5-Di-ethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO [55]) eingesetzt. Ein Standard OH^\bullet -Addukt wurde mittels FENTON-Reaktion aus FeSO_4 , NTA und H_2O_2 generiert.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in einer Quarz-Flachküvette durchgeführt. Um möglichst anaerobe Bedingungen zu erreichen, wurden die Reaktionsgefäße, die Flachküvette, der Puffer, alle Reaktanten sowie der komplette Reaktionsansatz mit Stickstoff begast und so in die Küvette überführt.

Darstellung des PQ-Radikals durch NDT Unter anaeroben Bedingungen konnte das durch NDT generierte 35-gipflige PQ-Radikal-Signal dargestellt werden. Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus PBS-Puffer (pH 7,4 ad 1000 μl), PQ (50 μM), und NDT (0,6 mM, frisch gelöst). Der Ansatz wurde mittels N_2 -Begasung gemischt und 300 μl davon in die Flachzelle überführt und verschlossen. Die Messung erfolgte unmittelbar danach im ESR-Gerät bei 9,53 GHz. Die Spektrometer-Einstellungen betragen dabei: Mikrowellenleistung 10 mW, Modulations-Amplitude 0,05 mT, Zeitkonstante 0,5 s, Scan-Rate 10 mT/ 120 s. Der g-Wert von $\text{PQ}^{\bullet+}$ ist ca. 2.005. Die Zugabe von H_2O_2 (5 μl 100mM) erfolgte mittels Mikroliterspritze direkt in den Messbereich der Flachzelle worauf ein neues Spektrum aufgezeichnet wurde. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur mit und ohne Desferoxamin-Vorinkubation des Puffers (30 min) durchgeführt.

Darstellung des PQ-Radikals durch eine Xanthinoxidasereaktion (XO/X) Die Darstellung des 35 gipfligen PQ-Radikal-Signals erfolgte in einem Messansatz aus PBS (pH 7,4 ad 1000), PQ (0,1, 1 mM) und Xanthin (0,2 mM). Der Reaktionsstart erfolgte mit ca. 40 mU Xanthinoxidase. Die Ansatz wurde mittels N_2 -Begasung gemischt und 300 μl davon in die Flachzelle überführt und verschlossen. Die Messung erfolgte nach 5 min im ESR-Gerät bei 9,53 GHz. Die Spektrometer-Einstellungen betragen dabei: Mikrowellenleistung 10 mW, Modulations-Amplitude 0,05 mT, Zeitkonstante 0,5 s, Scan-Rate 10 mT/ 120 s. Die Zugabe von H_2O_2 (5 μl 10 mM) erfolgte mittels Mikroliterspritze direkt in den Messbereich der Flachzelle. Alle Experimente

wurden bei Raumtemperatur mit und ohne Desferoxamin-Vorinkubation des Puffers (30 min) durchgeführt.

Darstellung des OH[•]-Radikal DEPMPO-Adduktes Als Standard diente ein Hydroxylradikal, welches durch NTA-Fe²⁺ und H₂O₂ generiert wurde. Der Messansatz bestand aus PBS (pH 7,4 ad 300 μ l), DEPMPO (14 mM) und H₂O₂ (0,1 mM), die Generierung wurde durch die Zugabe von NTA-Fe²⁺ (NTA/FeSO₄ 50/50 je 10 mM) gestartet.

Die Generierung von OH[•] durch PQ^{•+} und H₂O₂ wurde in einem Ansatz aus PBS (pH 7,4 ad 1 ml), PQ (0,1 und 1 mM) und NDT (2 mM) untersucht. Zu 300 μ l dieser Probe (blau) wurde DEPMPO hinzugegeben und gemixt. Die Messung erfolgte unverzüglich im ESR-Gerät bei 9,53 GHz. Die Spektrometer-Einstellungen betragen dabei: Mikrowellenleistung 10 mW, Modulations-Amplitude 0,35 mT, Zeitkonstante 0,5 s, Scan-Rate 30 mT/ 120 s. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur mit und ohne Vorinkubation des Puffers mit Desferoxamin (0,1 oder 1 mM) durchgeführt.

Berechnung der Radikalkonzentrationen Eine Quantifizierung der gebildeten PQ-Radikale und OH[•]-DEPMPO-Addukte ist über den Vergleich mit einem Standard möglich. Als Standard wurde Ultramarin mit einer bekannten Spinzahl von $3,61 \times 10^{16}$ verwandt. Dabei gilt, dass 1 Spin einem Molekül entspricht. Nach einer doppelten Integration der primären Aufzeichnung (z.B. das 8-gipflige OH[•]-DEPMPO-Signal), dies ist die 1. Ableitung des eigentlichen Signals, ließen sich die errechneten Flächeneinheiten miteinander vergleichen und die entsprechenden Spin-Zahlen errechnen. Es können nur ESR-Signale verglichen werden, welche mit derselben Modulationsamplitude aufgezeichnet werden. Die Aufnahme der Signale mit einer unterschiedlichen Verstärkung kann rechnerisch über die Multiplikation mit dem Dämpfungsfaktor bereinigt werden.

3.13 Auswertung der durchgeführten Experimente

Die Auswertung erfolgte mit Standardsoftware EXEL und SIGMAPLOT. Um zwei Gruppen von Experimenten zu vergleichen, wurden von den einzelnen Versuchspunkten einer Gruppe der Mittelwert (MW) und der Standardfehler S_E berechnet. Die Berechnung signifikanter Unterschiede erfolgte mit dem Student's t-Test oder dem gepaarten t-Test.

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

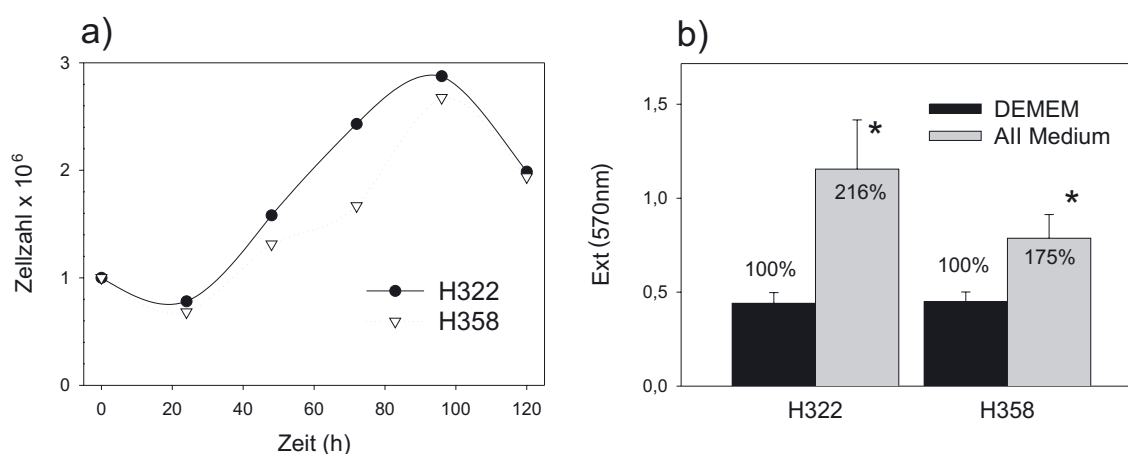


Abbildung 10: **Wachstumskurve und Einfluss von verschiedenen Kulturmedien auf die Vitalität von H322 und H358:** **a)** Es wurden eine Million Zellen auf eine 21 cm² Kulturschale in 5 ml Medium eingesät. Die Zellzahlen wurden vom 1. bis 5. Kulturtag mittels Auszählung in einer Fuchs-Rosenthalkammer 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 All-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 Tumorzellen 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).

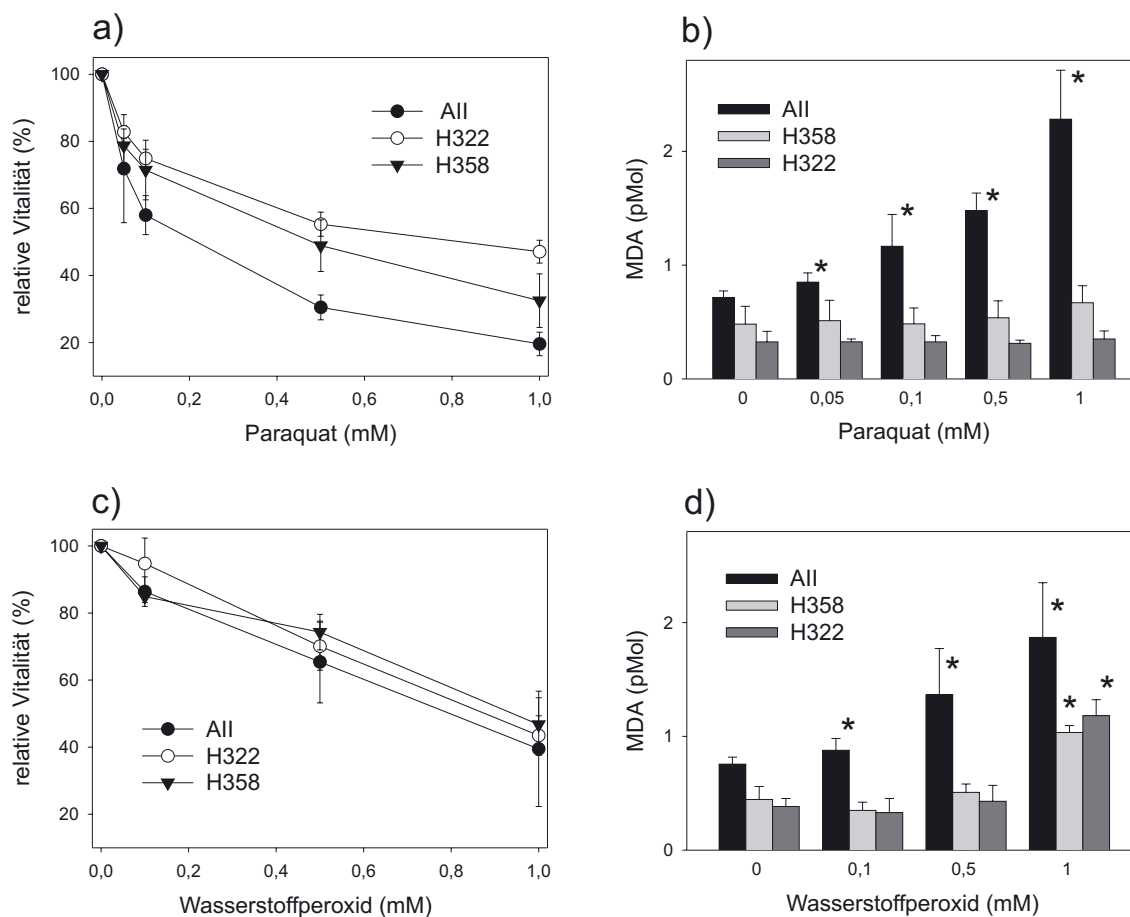


Abbildung 11: **Einfluss von PQ- und H₂O₂-Inkubation auf die Vitalität und die Malondialdehyd-Entstehung (MDA) im Kulturmedium von Alveolar TypII-Zellen und Kulturen von H322 und H358.** Zellkulturen von Alveolar TypII-Zellen, H322 und H358 wurden für 20 h mit PQ oder H₂O₂ inkubiert. Die Kontrollen erhielten 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 μ M und 1 mM) sowie H₂O₂ (zwischen

100 μM und 1 mM) über 20 h, führt zur konzentrationsabhängigen Verminderung der Vitalität (Abb. 11a, c). Dabei sind die Tumorzelllinien 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 Tumorzelllinien 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).

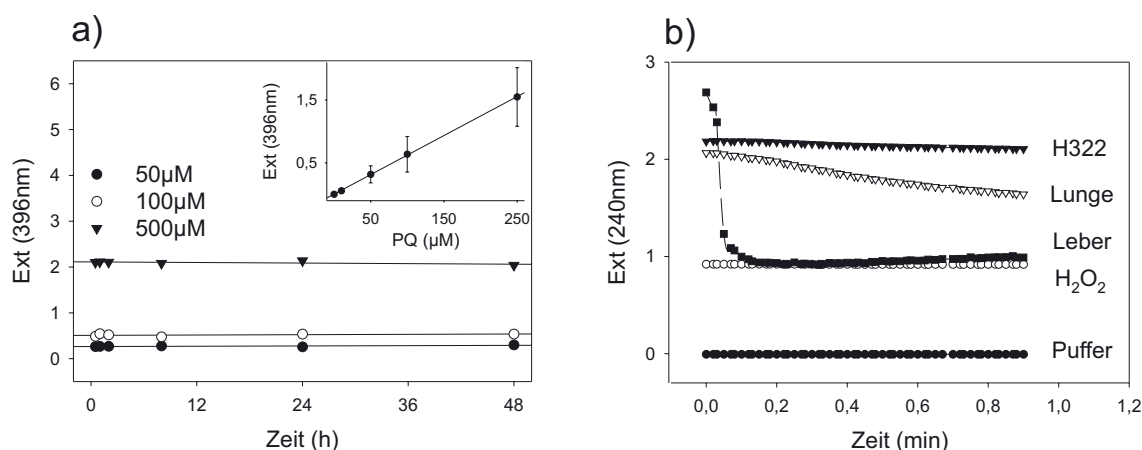


Abbildung 12: **a) Einfluss der Kulturdauer auf die PQ-Konzentration im Kulturmedium von H358:** Zellkulturen von H358 wurden mit PQ inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 2; 8; 24 und 48 h, danach erfolgte die Bestimmung der PQ-Konzentration im Kulturmedium spektrophotometrisch. Gezeigt sind die Extinktion 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-Expressionsusters 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).

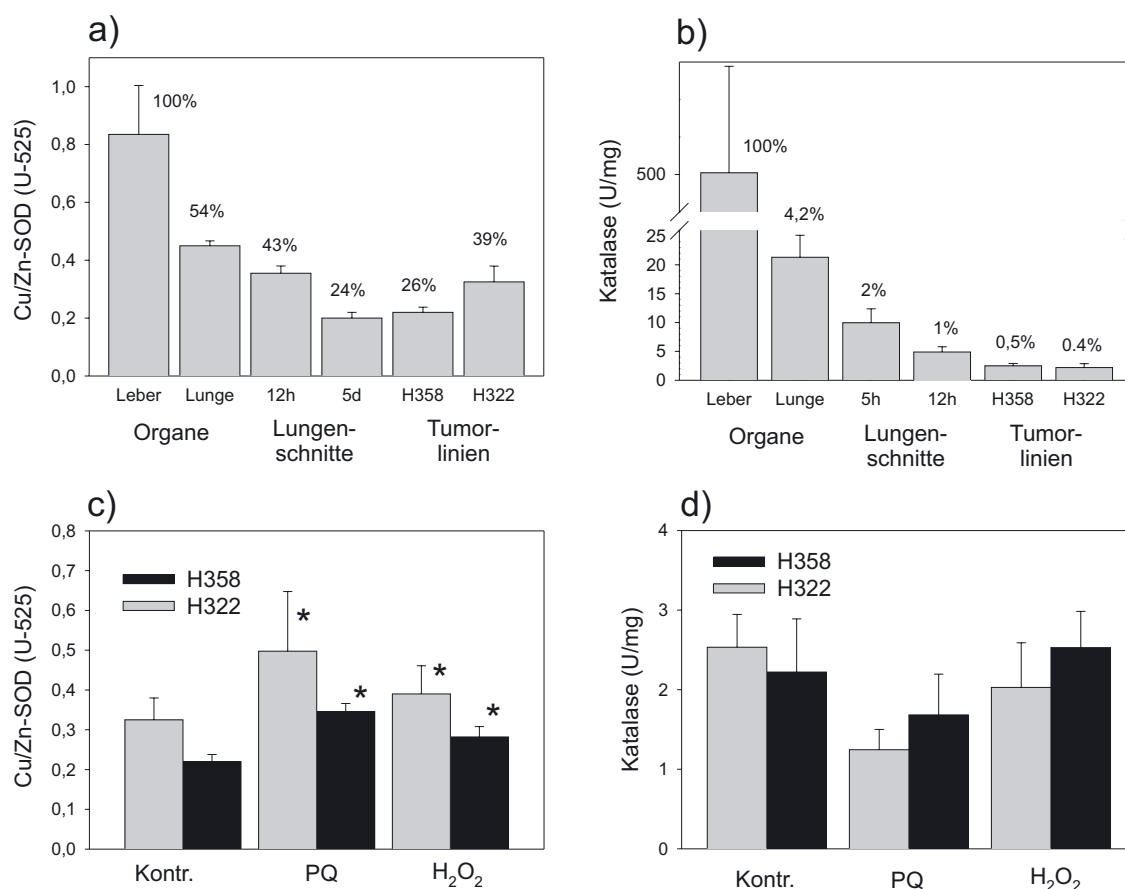


Abbildung 13: **Cu/Zn-SOD- und Katalaseaktivitäten in Homogenaten von Gesamtleber, Gesamtlunge, Lungenschnitten in Kultur aus der Ratte und Zellen der Tumorklinien H322 und H358. Einfluss von PQ und H₂O₂ in Kulturen von H322 und H358 auf die Enzymaktivitäten:**

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

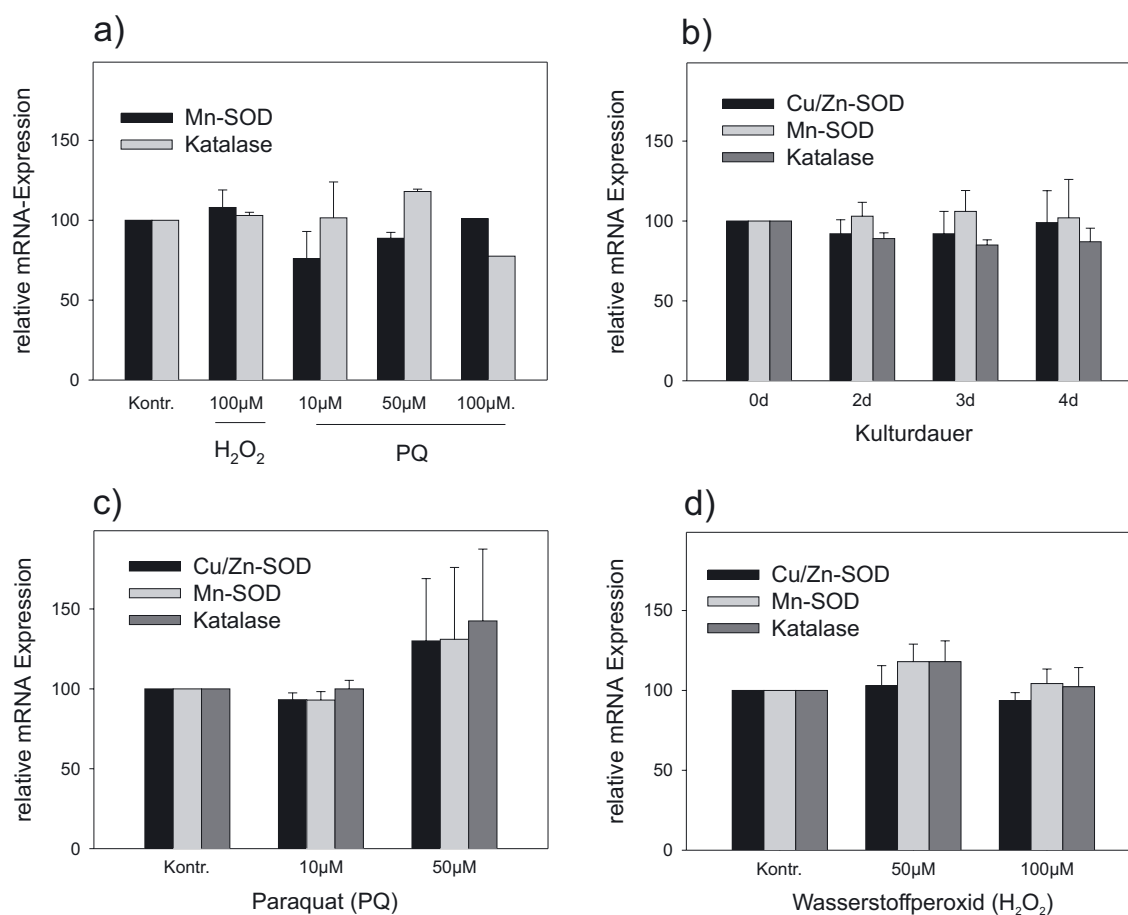


Abbildung 14: Einfluss der Kulturdauer und PQ oder H_2O_2 -Inkubation über 20 h auf die mRNA-Expression von Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD in Primärkulturen von Alveolar TypII-Zellen. **a) Northern-Blot-Analytik:** Pro Probe wurden 20 μg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Katalase 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).

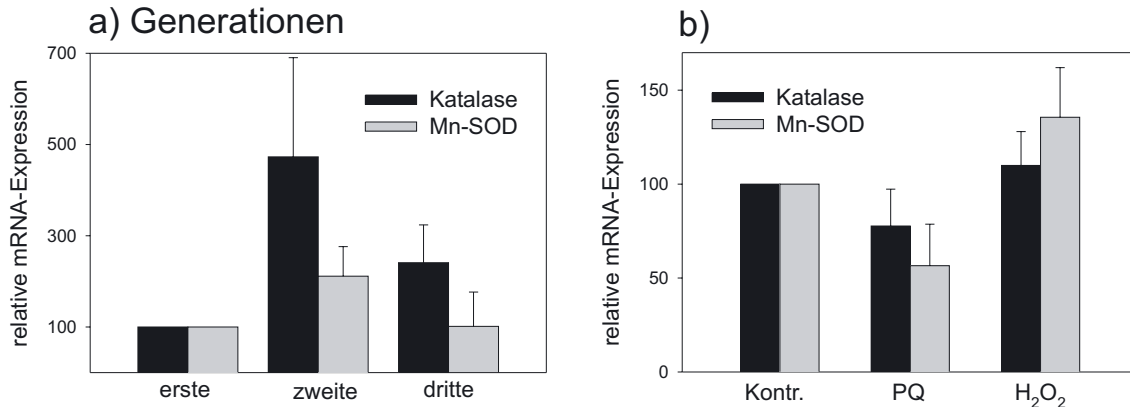


Abbildung 15: **Einfluss a) der Generationen und b) der PQ- oder H₂O₂-Inkubation (20 h) auf die mRNA-Expression von Katalase und Mn-SOD Kulturen von NHBEZ mit PCR-Analytik:** Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte für Katalase und Mn-SOD bis zur dritten Generation und nach PQ- (50 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).

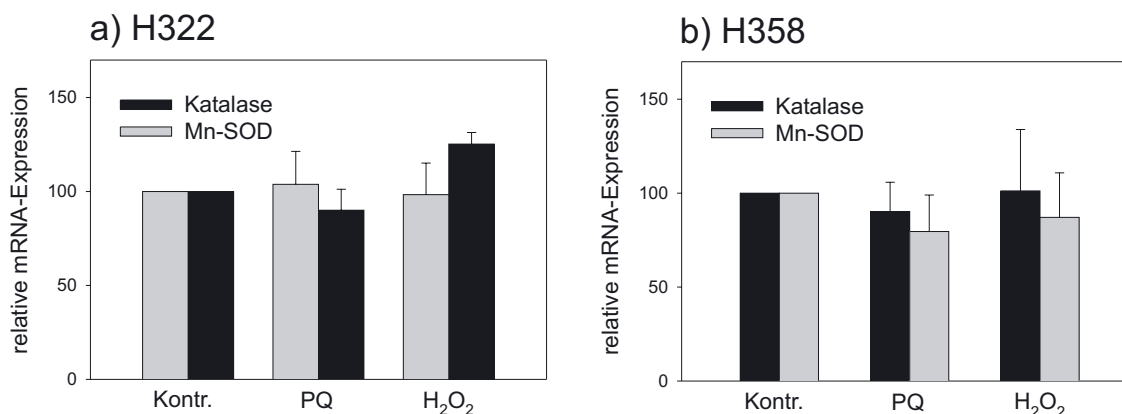


Abbildung 16: **Einfluss der Kulturdauer und PQ oder H₂O₂ (20 h) auf die mRNA-Expression von Katalase und Mn-SOD in den Tumorzelllinien H322 und H358 mit PCR-Analytik:** Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte für Katalase und Mn-SOD nach PQ- (50 μ M) oder H₂O₂- Inkubation (100 μ 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).

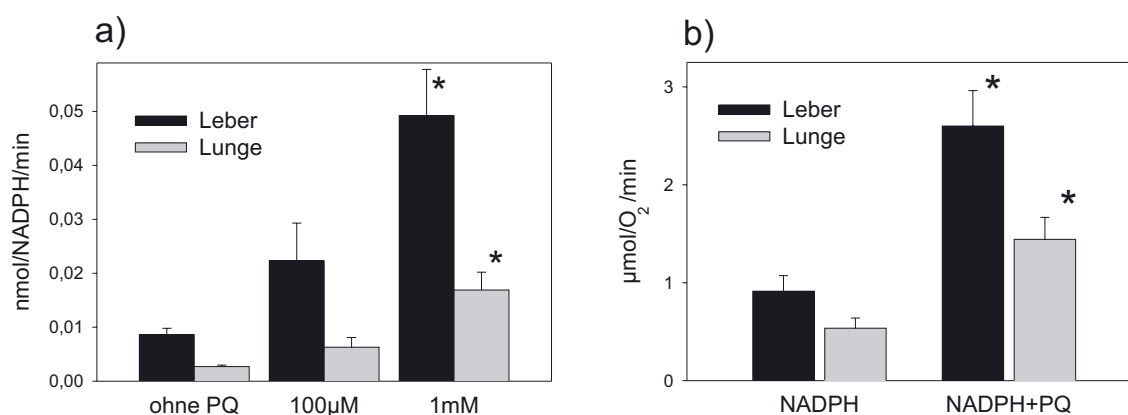


Abbildung 17: **a) Einfluss von PQ auf den NADPH-Verbrauch von Mikrosomenfraktionen aus Leber- und Lungengewebe der Ratte:** Gezeigt sind Mittelwerte $\pm S_E$ der absoluten NADPH-Verbrauchsraten in nmol pro Minute ($n=3-5$) * $p < 0,05$ zur Kontrolle. **b) Einfluss von PQ auf den Sauerstoffverbrauch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

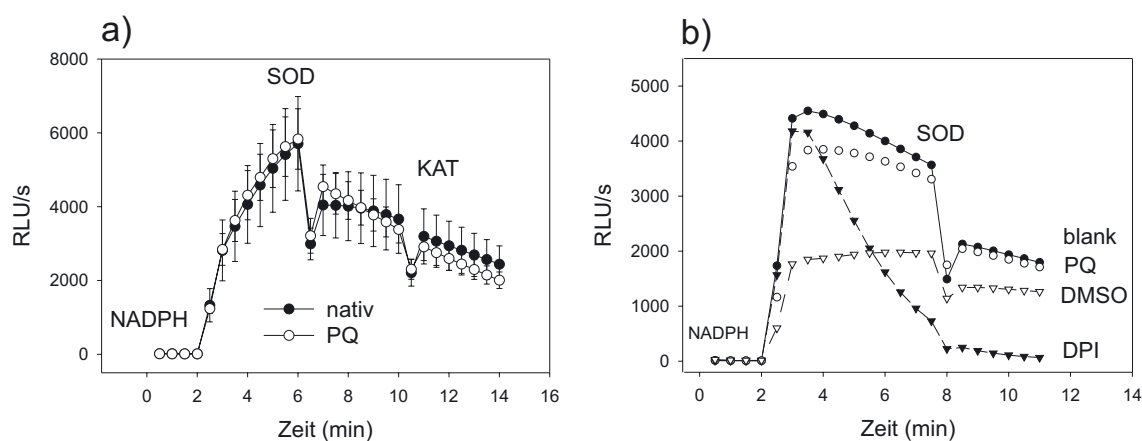


Abbildung 18: **a) Einfluss von PQ, SOD und Katalase auf die Lucigeninchemolumineszenz von Mikrosomenfraktion aus Rattenleber:** Mikrosomenfraktion aus Rattenleber ($50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein) in PBS-Hepes (pH 7,4 ad $1000 \mu\text{l}$), Lucigenin ($50 \mu\text{M}$), NADPH ($300 \mu\text{M}$), SOD ($5 \mu\text{l}$ uv) und Katalase ($10 \mu\text{l}$ uv) einmal mit PQ (50mM) 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 ($50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein) in PBS-Hepes (pH 7,4 ad $1000 \mu\text{l}$), Lucigenin ($50 \mu\text{M}$), NADPH ($300 \mu\text{M}$), SOD ($5 \mu\text{l}$ uv) und Katalase ($10 \mu\text{l}$ uv) einmal mit PQ (50mM) und einmal ohne PQ und je einmal mit DPI-Vorinkubation $10 \mu\text{l}$ für 10 min, DMSO-Vorinkubation $10 \mu\text{l}$ 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 570nm untersucht. Leber- und Lungenmikrosomenfraktionen der Ratte ($50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein), in PBS-Hepes (pH 7,4, ad $1000 \mu\text{l}$), NBT ($10 \mu\text{M}$) und NADPH ($300 \mu\text{M}$) wurden mit PQ (1mM) 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 ($5 \mu\text{l}$ u.v.) im Überschuss, führte zu einer Hemmung der Reaktion um maximal ein viertel. PQ in einer Endkonzentration von 1mM 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 $3,61 \times 10^{16}$.

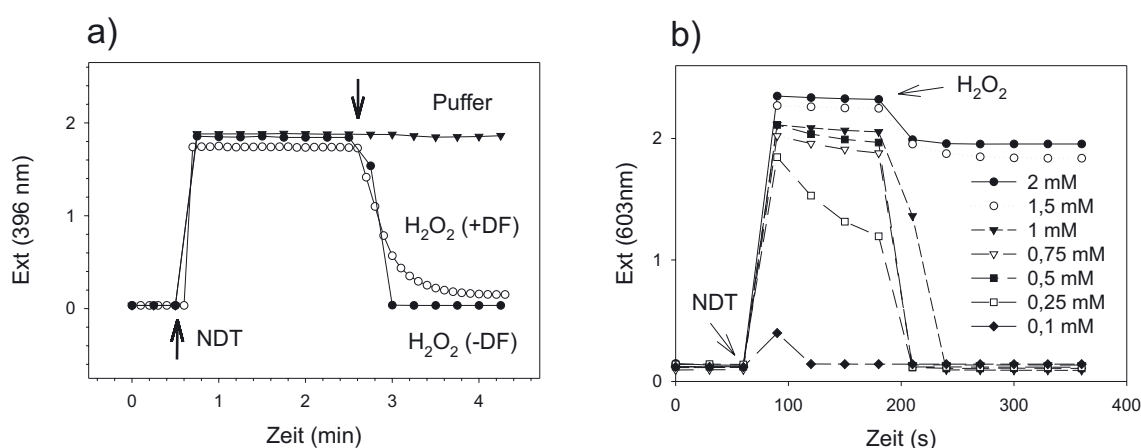


Abbildung 19: **a) Einfluss von Desferoxamin auf die Generierung des PQ-Radikals durch NDT und die Löschung des Signals durch H₂O₂:** Ansatz aus PBS (pH 7,4 ad 1 ml), mit N₂-Begasung in luftdichter Küvette, PQ (50 μM), Reaktionsstart mit NDT (0,6 mM). Die Zugabe von H₂O₂ (0,5 mM) oder Puffer nach 2,5 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 μM), H₂O₂ (500 μM), NDT (0,1-2 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 μl) und PQ (50 μM) wird PQ^{2+} unter anaeroben Bedingungen sofort nach der Zugabe von NDT (0,5 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.

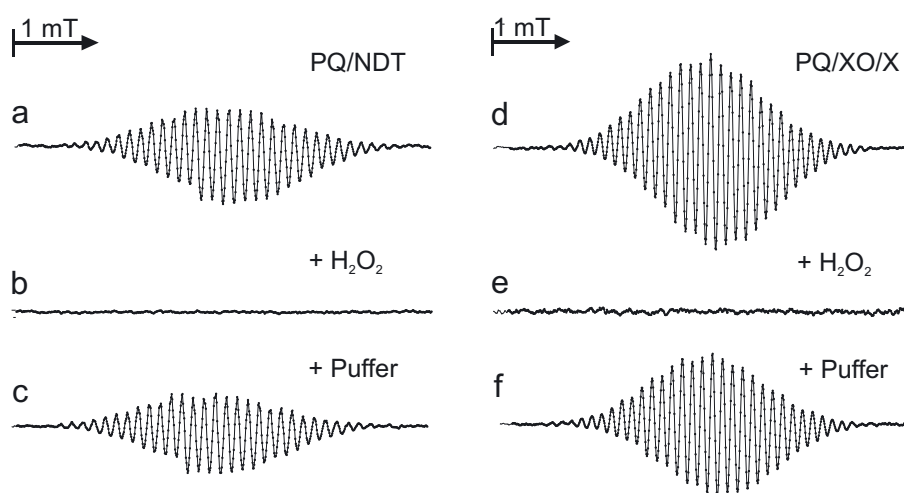


Abbildung 20: **Das PQ-Radikal in der ESR und der Einfluss von H_2O_2 a) bis c) durch Natriumdithionit (NDT):** Ansatz PQ^{2+} (50 μM) in PBS (pH 7,4) durch NDT (0,6 mM) zu **a)** $\text{PQ}^{\bullet+}$, **b)** Zugabe von 5 μl H_2O_2 (100 mM) direkt in den Messbereich der Flachzelle führte zum Auslöschen 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.

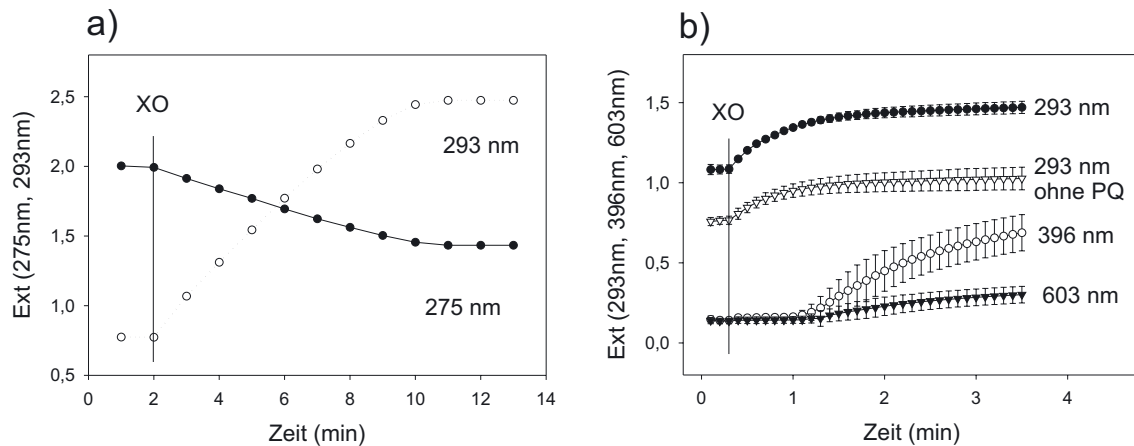


Abbildung 21: **Messung der Harnsäurebildung, des Xanthinverbrauchs und der PQ-Radikalbildung mittels XO/X:** a) Gezeigt ist der Verbrauch von Xanthin (275 nm) und die Entstehung von Harnsäure (293 nm) unter aeroben Bedingungen. b) Gezeigt ist die Extinktion bei 293 nm im Harnsäuremaximum, bei 396 nm 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).

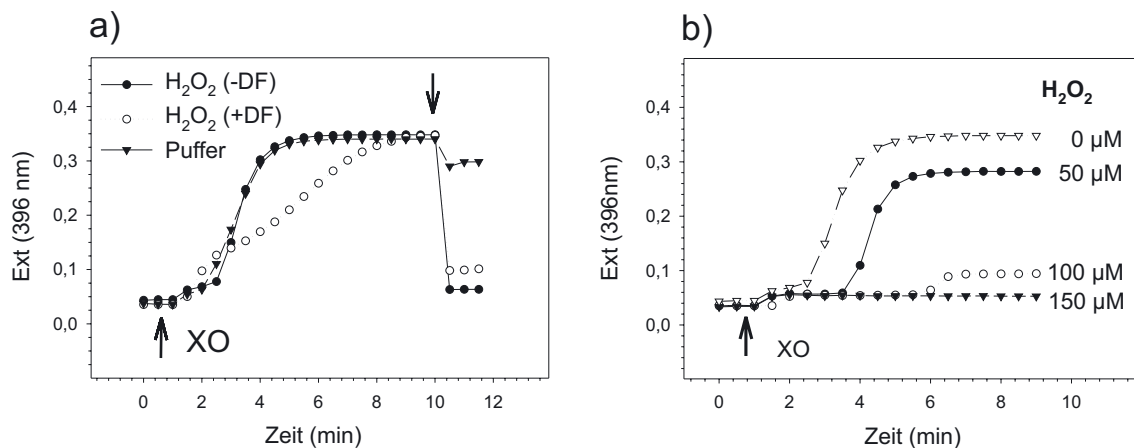


Abbildung 22: a) **Einfluss von Desferoxamin auf die Generierung des PQ-Radikals durch XO/X und die Löschung des Signals durch H_2O_2 :** Ansatz PBS pH 7,4 ad 1000 μl , mit N_2 -Begasung in Spezialküvette, PQ (50 μM), X (0,2 mM), Reaktionsstart mit XO (ca. 104 mU), Zugabe von 5 μl H_2O_2 (10 mM) oder 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 H_2O_2 im Ansatz auf die Generierung des PQ-Radikals durch XO/X:** Ansatz: PBS pH 7,4 ad 1000 μl , mit N_2 -Begasung in Spezialküvette, PQ (50 μM), (0,2 mM), H_2O_2 (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).

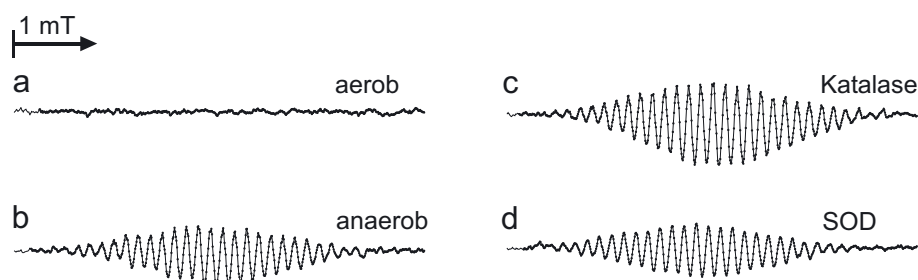


Abbildung 23: **Einfluss von Katalase und Superoxiddismutase auf das PQ-Radikal in der ESR-Spektroskopie.** Ansatz PQ (100 μM) in PBS, X (0,2 mM) und 60 mU XO. **a)** unter normal Luftsauerstoff, **b)** unter anaeroben Bedingungen, **c)** Zugabe von 10 μl Katalase (u.v.) oder **d)** 10 μl SOD (u.v.)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

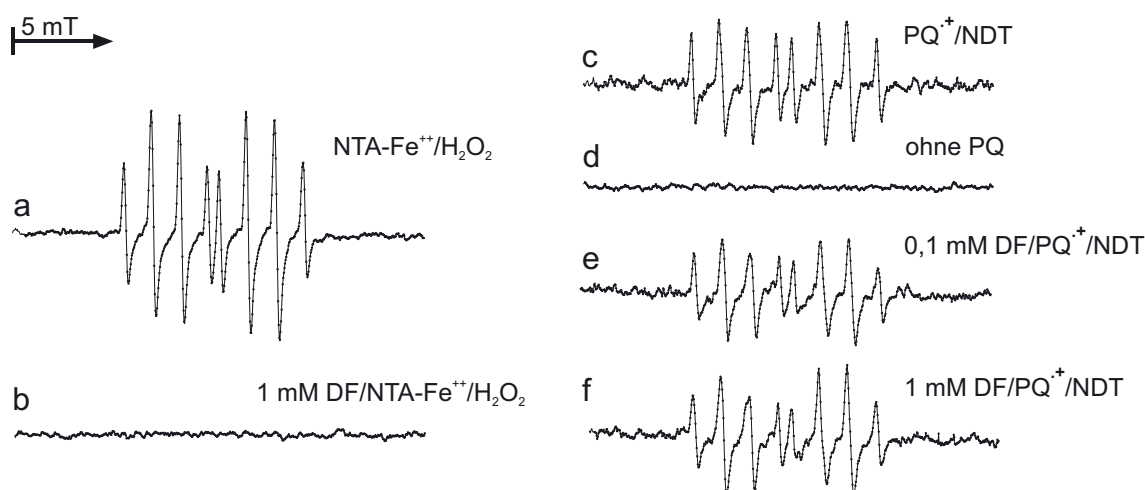


Abbildung 24: **DEPMPO- \bullet OH-Addukte Standard und mittels NDT und PQ: Standard a)** PBS (pH 7,4), DEPMPO (12 mM), H_2O_2 (0,1 mM), Reaktionsstart mit NTA-Fe^{2+} (je 0,6 mM final), **b)** gleicher Ansatz mit Desferoxamin (DF 1 mM) 30 min Vorinkubation des Puffers, **c)** PBS (pH 7,4 ad 1 ml), PQ (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).

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 Arachidonsäuren. 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 Tumorkulturen nicht zwingend gegen das Vorliegen eines radikalischen Schädigungsprozesses in den Zellen. Der treppenförmige Anstieg durch H_2O_2 in den Tumorkulturen 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 H₂O₂ 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. H₂O₂ 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 H₂O₂ sind in vielen Studien belegt, z.B. auch Mitochondrialen- und Kern-Genom-Veränderungen [44].

5.3 Die AOE in AII-Zellen, NHBEC 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_2O_2 [82]. Aus einigen Experimenten geht weiter hervor, dass durch einen direkten oxidativen Stimulus, z.B. mittels H_2O_2 -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_2O_2 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 β -Aktin-Expression. β -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 β -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 β -Aktin in der RT-PCR hergestellt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Membranen der Northern-Blot-Analytik wurden mit einer β -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 β -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- κ 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.

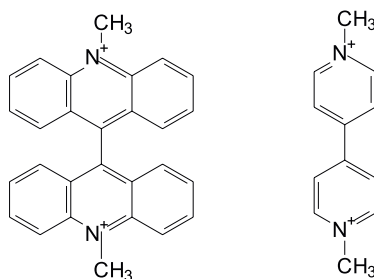


Abbildung 25: Lucigenin und Paraquat

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],

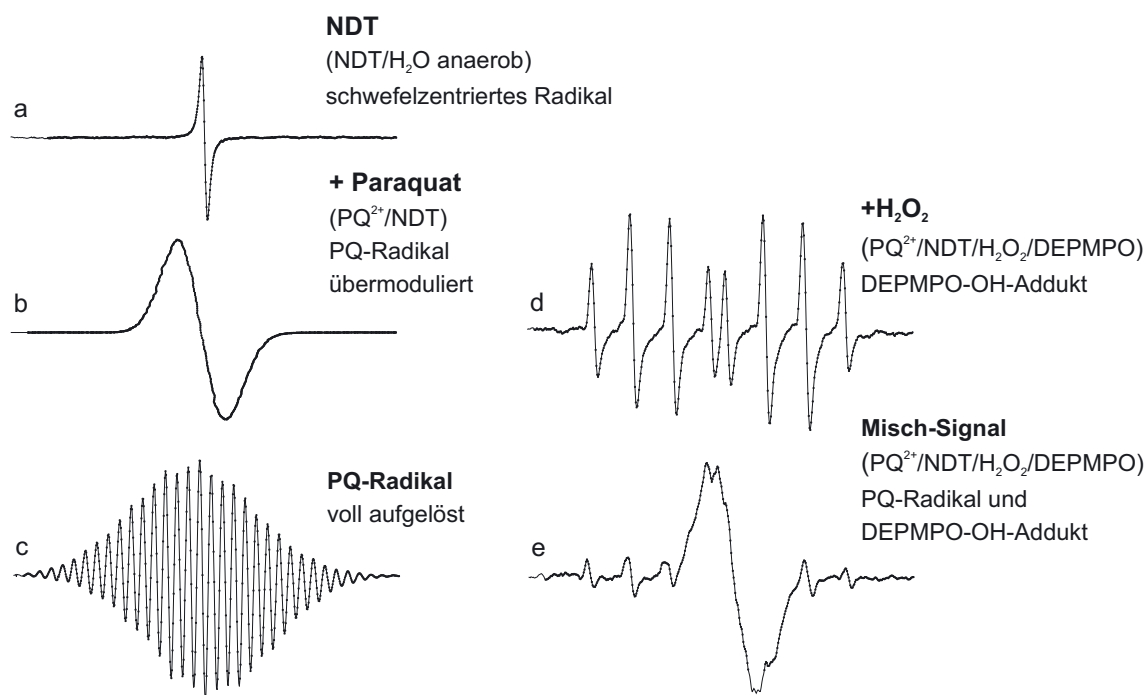


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Elektronenresonanz-Spektroskopiesignale (2. Ableitung des primären Signals) aller untersuchten radikalischen Strukturen.

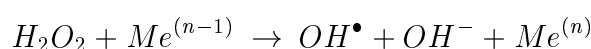
die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (Komplex I Ubiquinone Oxidoreduktase) [59, 74, 143], die Glutathion-Reduktasen, die Stickstoffoxid-Synthetasen [97] oder die Xanthinoxidasen [87, 124, 154]. Für in vitro Untersuchungen wurde meist Natriumdithionit als chemisches Reduktionsmittel gewählt [74, 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 PQ²⁺ führt zum blauen PQ^{•+}, 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.

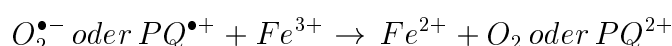
Mittels ESR-spektroskopischer Untersuchungen konnten folgende radikalische Strukturen dargestellt werden: Eine Natriumdithionitlösung (100 mM) zeigt unter anaeroben Bedingungen das typische Bild für schwefelzentrierte Radikale. Sie besitzen keine Hyperfinestruktur (Abb. 26a). In einem Ansatz aus NDT (0,6 mM) und PQ (50 μM) zeigte sich daraufhin ebenfalls unter anaeroben Bedingungen das übermodulierte PQ^{•+}-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 OH^\bullet -DEPMPO-Addukt nachgewiesen werden (Abb. 26d). Ein besonders seltenes Bild zeigt die Abbildung 26e, es sind das PQ-Radikal und das 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 H_2O_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 H_2O_2 nachzuweisen, wurde unter anaeroben Bedingungen H_2O_2 in die Ansätze gegeben. Im Xanthinoxidase-System führt dies zur sofortigen Reoxidierung von $\text{PQ}^{\bullet+}$. Befand sich H_2O_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 H_2O_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 Eisenkomplexbilder, 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.

6 Quellenangaben

Literatur

- [1] Akhalaq MS, Schuchmann HP, von Sonntag C: The reverse of the 'repair' reaction of thiols: H-abstraction at carbon by thiyl radicals. *Int J Radiat Stud Phys Chem Med* 51 (1987) 91-102
- [2] Ameno K, Fuke C, Shirakawa Y, Ogura S, Ameno S, Kiriu T, Kinoshita H, Ijiri I: Different distribution of paraquat and diquat in human poisoning cases after ingestion of a combined herbicide. *Arch Toxicol* 68 (1994) 134-7
- [3] Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, Kinnula V: Expression and developmental profile of antioxidant enzyme in human lung and liver. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19 (1998) 942-9
- [4] Auwerx JH, Chait A, Wolfbauer G, Deeb SS: Loss of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in differentiated cells of myelo-monocytic origin. *Blood* 74 (1989) 1807-10
- [5] Babior BM: Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res* 30 (1997) 141-55
- [6] Bacon BR, O'Neill R, Park CH: Iron-induced peroxidative injury to isolated rat hepatic mitochondria. *J Free Radic Biol Med* 2 (1986) 339-47
- [7] Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG: Epidermal growth factor induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 271 (1997) 217-21
- [8] Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR: Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: A key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Experiment Therapeutics* 284 (1998) 215-221
- [9] Baldwin CR, Pasi A, MacGregor JT, Hine CH: The rates of radical formation from the dipyridylum herbicides paraquat, diquat, and morfamquat in homogenates of rat lung, kidney, and liver: An inhibitory effect of carbon monoxide. *Toxicol Applied Pharmacol* 32 (1975) 298-304
- [10] Beck Y, Oren R, Amit B, Levanon A, Gorecki M, Hartman JR: Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 9076
- [11] Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR: Dose-response relationship between O6-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 50 (1990) 3772-80
- [12] Belinsky SA, Devereux TR, White CM, Foley JF, Maronpot RR, Anderson MW: Role of Clara cells and type II cells in the development of pulmonary tumors in rats and mice following exposure to a tobacco-specific nitrosamine. *Exp Lung Res* 17 (1991) 263-78
- [13] Belinsky SA, Devereux TR, Foley JF, Maronpot RR, Anderson MW: Role of the alveolar type II cells in the development and progression of pulmonary tumors induced 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the A/J mouse. *Cancer Res* 52 (1992) 3164-73

- [14] Beloqui O, Cerderbaum AI: Microsomal interaction between iron, paraquat, and menadione: effect on hydroxyl radical production and alcohol oxidation. *Arch Biochem Biophys* 242 (1985) 187-96
- [15] Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ: Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16 (1995) 93-9
- [16] Bhandari V, Maulik N, Kresch M: Hyperoxia causes an increase in antioxidant enzyme activity in adult and fetal rat type II pneumocytes. *Lung* 178 (2000) 53-60
- [17] Breen AP, Murphy JA: Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18 (1995) 1033-77
- [18] Brehm M, Schiller E, Zeller WJ: Quantification of reactive oxygen species generated by alveolar macrophages using lucigenin-enhanced chemoluminescence methodical aspects. *Tox Letters* 87 (1996) 131-138
- [19] Brodie AE, Reed DJ: Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 148 (1987) 120-5
- [20] Brömme HJ, Holtz J: Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem* 163-164 (1996) 261-75
- [21] Burdon RH, Alliangana D, Gill V: Endogenously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-211 cell proliferation. *Free Radic Res* 21 (1994) 121-33
- [22] Burkitt MJ, Kadiiska MB, Hanna PM, Jordan SJ, Mason RP: Electron spin resonance spin-trapping investigation into the effects of paraquat and desferrioxamine on hydroxyl radical generation during acute iron poisoning. *Mol Pharmacol* 43 (1993) 257-263
- [23] Buttke TM, Sandstorm PA: Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic Res* 22 (1995) 389-97
- [24] Campbell AK: Living light: biochemistry, applications. *Essays Biochem* 24 (1989) 41-81
- [25] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47 (1987) 936-42
- [26] Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 (1979) 527-605
- [27] Chen N, Bowles MR, Pond SM: Competition between paraquat and putrescine for uptake by suspensions of rat alveolar type II cells. *Biochem Pharmacol* 44 (1992) 1029-36
- [28] Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-9
- [29] Clark JM: Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp Lung Res* 14 (1988) 897-910

- [30] Clerch LB, Massaro D, Berkovich A: Molecular mechanism of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *Am J Physiol* 274 (1998) L313-19
- [31] Cohen G, Dembiec D, Marcus J: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochem* 34 (1970) 30-38
- [32] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9 (1995) 899-909
- [33] Cotton FA, Wilkinson G: *Anorganische Chemie* 4.. Aufl. Verlag Chemie (1985) S. 547
- [34] Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER: Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126 (1982) 332-7
- [35] DeCruo S, Kamboh MI, Leppert M, Ferrell RE: Isoelectric focusing of superoxide dismutase: report of the unique SOD A*2 allele in a US white population. *Hum Hered* 38 (1988) 1-7
- [36] Crum LA, Walton AJ, Mortimer A, Dyson M, Crawford DC, Gaitan DF: Free radical production in amniotic fluid and blood plasma by medical ultrasound. *J Ultrasound Med* 6 (1987) 643-7
- [37] Dahl AR: Metabolic Characteristics of the Respiratory Tract. In: *Inhalation Toxicologie*. Verlag, New York, S. 175-190
- [38] Daldrup T, Köppel C: Paraquat In: Gibitz HJ, Schütz H.: *Einfache toxikologische Laboratoriumsuntersuchungen bei akuten Vergiftungen*. VCH Verlagsgesellschaft (1995) S. 402-4
- [39] Darr D, Friedovich I: Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,3-triazole. *Biochem Pharmacol* 35 (1986) 3642
- [40] Darville MI, Ho YS, Eizirik DL: NF- κ B is required for cytokine-induced manganese superoxide dismutase expression in insulin-producing cells. *Endocrinology* 141 (2000) 153-162
- [41] Deneke SM, Fanburg BL: Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N Engl J Med* 303 (1980) 76-86
- [42] Dobbs LG, Gonzales R, Williams MC: An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 (1986) 141-145
- [43] Dobbs LG: Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol* 258 (1990) 134-47
- [44] McDonald RJ, Pan LC, St. George JA, Hyde DM, Ducore JM: Hydrogen peroxide induces DNA single strand breaks in respiratory epithelial cells: *Inflammation* 17 (1993) 715-22
- [45] Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W: Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 105 (1997) 1285-9
- [46] Dougall WC, Nick HS: Manganese superoxide dismutase. a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129 (1991) 2376-84

- [47] Drapper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M: A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 353-63
- [48] Dubrovskaya VA, Wetterhahn KE: Effects of Cr(VI) on the expression of the antioxidative stress genes in human lung cells. *Carcinogenesis* 19 (1998) 1401-1407
- [49] Engstrom PC, Easterling L, Baker RR, Matalon S: Mechanism of extracellular hydrogen peroxide clearance by alveolar type II pneumocytes. *American Physiological Society* (1990) 2078-84
- [50] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11 (1991) 81-128
- [51] Falkner K, Fridovich I: Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\cdot -}$. *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 447-51
- [52] Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Flechner K: Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochem Biophys Acta* 314 (1973) 372-81
- [53] Franek WR, Horowitz S, Standsberry L, Kazzaz JA, Koo HC, Li Y, Arita Y, Davist JM, Mantell AS, Scott W, Mantell LL: Hyperoxia Inhibits Oxidant-Apoptosis in Lung Epithelial Cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 569-75
- [54] Frank L: Effects of oxygen on the newborn. *Fed Proc* 44 (1985) 2328-34
- [55] Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, Lauricella R, Tordo P: 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolone N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *J Med Chem* 38 (1995) 258-65
- [56] Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 97-112
- [57] Fubini B, Mollo L: Role of iron in the reactivity of mineral fibers. *Toxicol Letters* 82-83 (1995) 951-60
- [58] Fubini B, Mollo L, Giamello E: Free radical generation at the solid/liquid interface in iron containing minerals. *Free Radic Res* 23 (1995) 593-614
- [59] Fukushima T, Yamada K, Isobe A, Shiwaku K, Yamane Y: Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. *Exp Toxicol Pathol* 45 (1993) 345-9
- [60] Furuta S, Hayashi H, Hijikata M, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T: Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 313-17
- [61] Gardner HW: Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 7 (1989) 65-86
- [62] Gaudu P, Niviere V, Petillot Y, Kauppi B, Fontecave M: The irreversible inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by superoxide radicals. *FEBS Lett* 387 (1996) 137-40

- [63] Gerlier D, Thomasset N: Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94 (1986) 57-63
- [64] Glatt H, Gemperlin I, Turchi G, Heinritz H, Doehmer J, Oesch F: Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol* 1 (1987-88) 313-34
- [65] Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP: Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25 (1995) 25-65
- [66] Gram TE: Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol Rev* 49 (1997) 297-341
- [67] Gutteridge JM, Nagy I, Maitt L, Floyd RA: ADP-iron as a Fenton reactant: radical reactions detected by spin trapping, hydrogen abstraction, and aromatic hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 277 (1990) 422-8
- [68] Halliwell B, Grootvenld M, Gutteridge JM: Methods for measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal* 33 (1988) 59-90
- [69] Halliwell B, Gutteridge JM: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186 (1990) 1-85
- [70] Halliwell B, Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307 (1992) 108-12
- [71] Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. Third edition Oxford University Press (2000)
- [72] Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB: Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol* 147 (1991) 149-54
- [73] Hassan HM, Fridovich I: Superoxide radical and oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 253 (1978) 8143-7
- [74] Hassan HM: Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *Methods Enzymol* 105 (1984) 523-32
- [75] Hayes WJ, Laws ER: Handbook of pesticide toxicology, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, 1991
- [76] Heberlein W, Wodopia R, Bärtsch P, Mairbäurl: Possible role of ROS as mediators of hypoxia-induced ion transport inhibition of alveolar epithel cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278 (2000) L640-8
- [77] Hippeli S, Elstner F: Transition metals ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS* 443 (1999) 1-7

- [78] Ho YS, Crapo JD: Nucleotide sequences of cDNAs coding for rat manganese-containing superoxid dismutase. *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 10070
- [79] Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ: Reduced fertility in female mice lacking copper-zink superoxide dismutase. *J Biol Chem* 273 (1998) 7765-9
- [80] Hoet PMH, Lewis CPL, Demedts M, Nemery B: Putresine and paraquat uptake in human lung slices and isolated type II pneumocytes. *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 517-524
- [81] Hoet PMH, Demedts M, Nemery B: Effects of oxygen pressure and medium volume on the toxicity of paraquat in rat and human type II pneumocytes. *Human Exper Toxicol* 16 (1997) 305-10
- [82] Ishikawa T, Ohta Y, Takeda T, Shigeoka S, Nishikimi M: Increased cellular resistance to oxidative stress by expression of cyanobacterium catalase-peroxidase in animal cells. *FEBS* 426 (1998) 221-4
- [83] Jantsch B: Aufbau einer gekoppelten Reverse Transkription/Polymerase Kettenreaktion für den Nachweis der Boten-Ribonukleinsäure des "Multidrug-Resistance-Gens" *mdr1*. Dissertation Universität Leipzig (1998)
- [84] Ji LL: Antioxidants and oxidative Stress in Exercise. *PSEBM* 222 (1999) 283-92
- [85] Kelly IO, Lewis A, Peers C, Kemp PJ: O₂ Sensing by Airway Chemoreceptor-derived Cells. *The J of Biol Chem* 275 (2000) 7684-92
- [86] Kim EJ, Chung HJ, Suh B, Hah YC, Roe JH: Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sodN* gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. *Mol Microbiol* 27 (1998) 187-95
- [87] Kitazawa Y, Matsubara M, Takeyama N, Tanaka T: The role of xanthine oxidase in paraquat intoxication. *Arch Biochem Biophys* 288 (1991) 220-4
- [88] Kneipil J: A short, simple method for the determination of paraquat in plasma. *Clin Chim Acta* 79 (1977) 387-90
- [89] Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalowa A, Mason RP, Thurman RG: Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol* 280 (2001) G1005-12
- [90] Korbashi P, Kohen R, Katzhendler J, Chevion M: Iron mediates paraquat toxicity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 261 (1986) 12472-6
- [91] Kullik I, Stevenson J, Toledano B, Storz G: Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol* 177 (1995) 1285-91
- [92] Leikauf G, Driscoll K: Cellular Approaches in respiratory tract toxicology. In Gardner DE, Crapo JD, Mc Clellan RO: *Toxicology of the lung*. Raven Press, New York (1993) S.335-369
- [93] Liochev SI, Friedovich I: Lucigenin as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337 (1997) 115-20

- [94] Liochev SI, Friedovich I: Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 94 (1997) 2891-6
- [95] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265-75
- [96] Mahmutoglu I, Scheulen ME, Kappus H: Oxygen radical formation and DNA damage due to enzymatic reduction of bleomycin-Fe(III). *Arch Toxicol* 60 (1987) 150-3
- [97] Margolis AS, Porasuphatana S, Rosen GM: Role of paraquat in the uncoupling of nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1524 (2000) 253-7
- [98] Marklund S, Beckmann G, Stigbrand T: A comparison between the common type and a rare genetic variant of human copper-zinc superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 65 (1976) 415-22
- [99] Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 42 (1982) 1955-61
- [100] Martin LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB: Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J* 10 (1997) 2139-46
- [101] Mason : Identification of rat alveolar type II epithelial cell with a tannic acid and polychrome stain. *Am Rev Respir Dis* 131 (1985) 786-788,
- [102] Minakata K, Suzuki O, Asano M: Rapid quantitative analysis of paraquat by electron spin resonance spectroscopy. *For Sci Int* 37 (1988) 215-222
- [103] Mossman BT, Surinrut P, Brinton BT, Marsh JP, Heintz NH, Lindau-Shepard B, Shaffer JB: Transfection of a manganese-containing superoxide dismutase gene into hamster tracheal epithelial cells ameliorates asbestos-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 21 (1996) 125-31
- [104] Murata M, Kawanishi S: Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 275 (2000) 2003-8
- [105] Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S: Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 16 (1994) 279-88
- [106] Ohyashiki T, Nunomura M: A marked stimulation of Fe³⁺-dependent lipid peroxidation in phospholipid liposomes under acidic conditions. *Biochim Biophys Acta* 1484 (2000) 241-50
- [107] Piatarinen-Runtti, Raivio KO, Saksela MS, Asikainen TM, Kinnula VL: Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19 (1998) 286-92
- [108] Piatarinen-Runtti, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL: Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (2000) C118-25
- [109] Phalen RF, Yeh HC, Prasad SB: Morphology of the respiratory tract. In: *Inhalation toxicology* (1989) S. 129-49

- [110] Poli G, Parola M: Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 22 (1997) 287-305
- [111] Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Graval RA: Isolation and characterization of the human catalase gen. *Nucleic Acids Res* 14 (1986) 5321-35
- [112] Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YM, Borm PA, Mossman BT: Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. *Environ Health Perspect* 102 (1994) 107-10
- [113] Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M: Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques*. 23 (1997) 456-60
- [114] Reaume AG, Elliott JL, Hoffmann EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13 (1996) 43-7
- [115] Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renand P, Rao G: Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res* 316 (1995) 103-122
- [116] Rembish SJ, Trush MA: Further Evidence that Lucigenin-derived Chemoluminescence Monitors Mitochondrial Superoxide Generation in Rat Alveolar Macrophages. *Free Radic Biol Med* 17 (1994) 117-26
- [117] Reveillaud I, Kongpachith A, Park R, Fleming JE: Stress resistance of *Drosophila* transgenic for bovine CuZn superoxide dismutase. *Free Radic Res Commun* 17 (1992) 73-85
- [118] Richards RJ, Davies N, Atkins J, Oreffo VI: Isolation, biochemical characterisation, and culture of lung type II cells of the rat. *Lung* 165 (1987) 143-58
- [119] Richmond R, Halliwell B: Formation of hydroxyl radicals from the paraquat radical cation, demonstrated by a highly specific gas chromatographic technique. The role of superoxide radical anion, hydrogen peroxide, and glutathione reductase. *J Inorg Biochem* 17 (1982) 95-107
- [120] Richter C: Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and respiration. *Biosci Rep* 17 (1997) 53-66
- [121] Robinson PC, Voelker DR, Mason RJ: Isolation and culture of human alveolar type II epithel cells. *Am Rev Respir Dis* 130 (1984) 1156-60
- [122] Röhrdanz E, Kahl R: Alteration of antioxidative enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* (1998) 24 27-38
- [123] Röhrdanz E, Obertriffter B, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R: Influence of adriamycin and paraquat on antioxidative enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74 (2000) 231-37
- [124] Sakai M, Yamagami K, Kitazawa Y, Takeyama N, Tanaka T: Xanthine oxidase mediates paraquat-induced toxicity on cultured endothelial cell. *Pharmacol Toxicol* 77 (1995) 36-40
- [125] Sambrook J, Fritsch BF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratoric manual*. 2 Ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press, (1989)

- [126] Sancar A: DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 65 (1996) 43-81
- [127] Sanders SA, Elisenthal R, Harrison R: NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 245 (1997) 541-8
- [128] Sato M, Sasaki M, Hojo H: Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch Biochem Biophys* 316 (1995) 738-44
- [129] Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Skar LA, Cochrane CG: Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 4908-12
- [130] Simon RH, Edwards JA, Reza MM, Kunkel RG: Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H_2O_2 : dependence on phenotype and catalase. *Am. J. Physiol.* 260 (1991) L318-35
- [131] Sekido Y, Fong KM, Minna JD: Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochem Biophys Acta* 1378 (1998) F21-F59
- [132] Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT: Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266 (1991) 24398-403
- [133] Sion A, Samuni A, Chevion M: Mechanistic aspects of paraquat toxicity in *E. coli*. *Biochem Pharmacol* 38 (1989) 3903-7
- [134] Slot JW, Geuze HJ, Freemann BA, Crapo JD: Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutase in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55 (1986) 363-71
- [135] Smith LL: The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu Rev Physiol* 48 (1986) 681-92
- [136] Sonntag C von: New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic Res Commun* 2 (1987) 217-24
- [137] Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (1975) 503-17
- [138] Spencer JP, Jenner A, Chimel K, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B: DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett* 375 (1995) 179-82
- [139] Stevens TM, Boswell GA, Adler R, Ackerman NR, Kerr JS: Induction of antioxidant enzyme activities by a phenylurea derivative, EDU. *Toxicol Appl Pharmacol* 96 (1988) 33-42
- [140] Streb P, Shang W, Feierabend J, Bligny R: Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207 (1998) 313-324
- [141] Synday ME, Willet CG, Grahman SA, Oreffo VI, Linnoila RI, Witsch M: Histochemical characterization of non-neuroendocrine tumor and neuroendocrine cell hyperplasia induced in hamster lung by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone with or without hyperoxia. *Am J Pathol* 147 (1995) 740-52

- [142] Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA: Phagocytosis and H_2O_2 induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*: 36 (1995) 1271-9
- [143] Tawara T, Fukishima T, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Setogawa T, Yamane Y: Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Arch Toxicol* 70 (1990) 585-89
- [144] Thorneley RN: A convenient electrochemical preparation of reduced methyl viologen and kinetic study of the reaction with oxygen using an anaerobic stopped-flow apparatus. *Biochim Biophys Acta* 333 (1974) 487-96
- [145] Tomita M: Comparison of one-electron reduction activity against the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat, in microsomal and mitochondrial fractions of liver, lung and kidney. *Biochem Pharmacol* 42 (1991) 303-9
- [146] Tomita M, Okuyama T: Effect of paraquat on the malondialdehyd level in rat liver microsomes (in vitro). *Arch Toxicol* 68 (1994) 187-92
- [147] Trush MA, Mimnaugh EG, Ginsburg E, Gram TE: In vitro stimulation by paraquat of reactive oxygen-mediated lipid peroxidation in rat lung microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 60 (1981) 279-86
- [148] Trush MA, Mimnaugh EG, Ginsburg E, Gram TE: Studies on the interaction of bleomycin A2 with rat lung microsomes. II. Involvement of adventitious iron and reactive oxygen in bleomycin-mediated DNA chain breakage. *J Pharmacol Exper Toxicol* 221 (1982) 159-165
- [149] Trush MA, Kensler TW: An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 10 (1991) 201-9
- [150] Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS: Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolydaccaride, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265 (1990) 2856-64
- [151] Wagner BA, Buettner GR, Burns CP: Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 33 (1994) 4449-53
- [152] Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK: Molekular structure and organisation of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13 (1994) 1127-36
- [153] Winterbourn C: Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H_2O_2 . *FEBS Letters* 128 (1981) 339-42
- [154] Winterbourn C, Sutton H: Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals: catalytic requirements and oxygen dependence. *Arch Biochem Biophys* 235 (1984) 116-26
- [155] Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA: Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem* 267 (1992) 23937-41

- [156] Witschi HP: Proliferation of Type II Alveolar Cells. A Review of Common Responses in Toxic Lung Injury. *Toxicology* 5 (1976) 267-277
- [157] Wong GH, Goeddel DV: Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242 (1988) 941-4
- [158] Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, Takakura Y, Hashida M: Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: Combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exper Ther* 289 (1999) 1176-1184
- [159] Yang G, Wang ZY, Kim S, Liao J, Seril DN, Chen X, Smith TJ, Yang Y: Characterisation of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model with A/J mice. *Cancer Res* 15 (199) 1889-94
- [160] Yamamoto H, Hirose K, Hayasaki Y, Masuda M, Kazusaka A, Fujita S: Mechanism of enhanced lipid peroxidation in the liver of Long-Evans cinnamon (LEC) rats. *Arch Toxicol* 73 (1999) 457-464
- [161] Yamazaki I, Piette LH, Grover TA: Kinetic studies on spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals generated in NADPH-cytochrome P-450 reductase-paraquat systems. *J Biol Chem* 265 (1990) 652-9
- [162] Yoo HY, Chang MS, Rho HM: The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* 274 (1999) 23887-92
- [163] Youngman R, Elstner EF: Oxygen species in paraquat toxicity: The crypto-OH radical. *FEBS Letters* 129 (1981) 265-8
- [164] Zang LY, van Kuijk FJGM, Misra HP: EPR studies of spin-trapped free radicals in paraquat-treated lung microsomes. *Biochem Mol Biol internat* 370 (1995) 255-262

7 Thesen

1. Das Lungengewebe ist auf Grund der besonderen Funktion einer Vielzahl von Schadstoffen ausgesetzt. Dabei spielen oxidativ wirkende Gase, Mineralfasern oder Promotoren von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der Entstehung verschiedenster Krankheitsbilder eine besondere Rolle. Die antioxidativen Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutasen (SOD) vermitteln einen Teil der antioxidativen Abwehr auf radikalische Schädigungsprozesse.
2. 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 Tumorklinien H322 (Clara-Zell-ähnlich) und H358 (Alveolar TypII-ähnlich) zeigen nur 10% der Katalaseaktivität und 50% der Cu/Zn-SOD-Aktivität von Lungengewebe der Ratte.
3. 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 Tumorklinien 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 Tumorklinien H322 und H358 zeigten einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 über 20 Stunden.
4. Die mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD in humanen Bronchialepithelzellen (NH-BEZ) zeigt 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).
5. Alveolar TypII-Zellen zeigen bis zum 4. Kulturtag keine Veränderungen der mRNA-Expression von Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD. Nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 für 20 Stunden fanden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD.

6. Nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 der NHBEZ sowie der Tumorlinien H322 und H358 für 20 Stunden fanden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD. Tumorlinien zeigten eine signifikante Steigerung der Cu/Zn-SOD-Aktivitäten um maximal 50%.
7. Das Herbizid PQ ist besonders lungentoxisch. Über einen "Redox-Zyklus" generiert es reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Das PQ-Dikation (PQ^{2+}) wird durch verschiedene Enzymsysteme zum Paraquatradikal ($PQ^{\bullet+}$) reduziert. 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. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen das $PQ^{\bullet+}$ selbst durch eine Einelektronenübertragung auf H_2O_2 OH^{\bullet} generieren kann.
8. In einem Mikrosomensystem sollte die Zugabe von PQ den NADPH- und Sauerstoffverbrauch sowie die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ steigern. Es wurde eine Konzentrationsabhängigkeit für den Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch durch die Zugabe von PQ nachgewiesen, wobei Mikrosomen aus Rattenleber bedeutend stärker reagieren als Mikrosomen aus der Rattenlunge. Als indirekter Nachweis für die $O_2^{\bullet-}$ -Generierung wurde die lucigeninvermittelte Chemolumineszenz und die Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium untersucht. PQ führt im Mikrosomensystem zu keiner Veränderung der Chemolumineszenz von Mikrosomenfraktionen aus Leber- oder Lungengewebe der Ratte durch Lucigenin und zur Verminderung der Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium.
9. Das reduzierte $PQ^{\bullet+}$ lässt sich unter anaeroben Bedingungen stabilisieren und kann mittels UV-VIS- oder Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) dargestellt werden. Mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit (NDT) und einem enzymatischen System, bestehend aus Xanthin und Xanthinoxidase (XO/X), wurden zwei Reduktionssysteme unter anaeroben Bedingungen etabliert. NDT reduzierte PQ^{2+} ab einem Verhältnis von 3 : 1 vollständig, wogegen das XO/X-System nur maximal 10% der eingesetzten PQ-Menge reduzierte.

10. Wenn $\text{PQ}^{\bullet+}$ durch H_2O_2 reoxidiert werden kann, sollte eine Änderung der Extinktion und eine Veränderung des ESR-Signals erkennbar sein. Unter anaeroben Bedingungen ist die Oxidation des PQ-Radikals durch H_2O_2 mit beiden Untersuchungstechniken nachweisbar. Im NDT-System ist die Nachweisbarkeit der $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Oxidation vom Konzentrationsquotienten von PQ und NDT abhängig. Die Produkte der Interaktion von $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 sind Hydroxylradikale. Sie lassen sich mittels DEPMPO (5-Di-ethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid) in der ESR-Spektroskopie nachweisen.
11. Wenn freie Metallionen für die Interaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 erforderlich sind, müsste der Einsatz von Desferoxamin, einem Komplexbildner für Eisen die Beobachtungen verhindern. Eine Vorinkubation des Reaktionsansatzes mit Desferoxamin hatte in beiden Untersuchungssystemen keinen Einfluss auf die Interaktion von $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 . Dies zeigte, dass unter bestimmten Bedingungen die Bildung von Hydroxylradikalen aus der Reaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 ohne die Beteiligung von fentonfähigen Metallionen möglich ist.
12. 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. 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.
13. Das $\text{PQ}^{\bullet+}$ bevorzugt O_2 als Elektronenakzeptor. Über eine Verschiebung des intrazellulären Milieus, z.B. durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch nach einer PQ-Vergiftung, kann es zu einer quantitativen Umverteilung der intrazellulären Konzentrationen von $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ und damit zu einer Verschiebung der Reaktionswege kommen. Auf dem Weg der direkten Interaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 könnten dann Hydroxylradikale generiert werden, so lange wie Elektronen auf PQ übertragen werden und H_2O_2 vorhanden ist.

A Anhang

A.1 Lebenslauf

Name	Enrico Weidauer
geb. am/in	11. Oktober 1972 / Zwickau
Eltern	Horst Weidauer Jutta Weidauer, geb. Meier
SCHULISCHER WERDEGANG	
1979 - 1989	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Friedrichsgrün
1989 - 1991	Besuch der Erweiterten Oberschule in Wilkau-Haßlau
Juli 1991	Reifeprüfung/Abitur
WEHRERSATZDIEST	
1991 - 1992	Deutsches Rotes Kreuz Zwickau, Ambulanter Sozialer Dienst
UNIVERSITÄT	
1992 - 2000	Studium der Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
ABSCHLÜSSE	
Juli 1994	Physikum
April 1996	1. Staatsexamen
April 1998	2. Staatsexamen
Nov. 2000	3. Staatsexamen
PRAKTIKA UND FORSCHUNG	
1996 bis heute	Mitarbeit am Institut für Umwelttoxikologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Juli 1996 - Sep. 1996	Famulatur im General Provincial Hospital Nakuru, Kenia. Mitarbeit auf chirurgischen und internistischen Stationen.
Feb. 1997 - März 1997	Tropenmedizinischer Lehrgang an der Universität Leipzig
Mai 1998 - April 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Umwelttoxikologie Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

1998 bis 1999 Assoziierter Kollegiat im Graduiertenkolleg der DFG "Adaptive physiologische-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe"

PRAKTISCHE AUSBILDUNG

Okt. 1999 - Feb. 2000 Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Medizinische Klinik 1, 06110 Halle/Saale

Feb. 2000 - Mai 2000 Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und Handchirurgie, Halle/Saale

Mai 2000 - Sep. 2000 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Halle/Saale

Dez. 2000 - Aug. 2001 Arzt im Praktikum (AiP) am Institut für Umwelttoxikologie Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Halle, den 19. Juli 2001

Enrico Weidauer

A.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle, den 19. Juli 2001

Enrico Weidauer

A.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 19. Juli 2001

Enrico Weidauer

A.4 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Lehmann T., Weidauer E., Tran Thi Q.H., Röhrdanz E., Foth. H. (2000): Influence of paraquat and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes (CAT, MnSOD) and MDR1B in Rat alveolar type II pneumocytes. *Archives of Pharmacology. Suppl.* 361, R142 2000
- Köhler Ch., Weidauer E., Runge D.M., Lehmann T., Röhrdanz E., Tran Thi Q.H., Kahl R., Foth H. (2000): Oxidative stress alterans expression of p-glycoprotein and multidrug resistance- associatet protein, but not antioxidant enzymes in lung tumor cell lines. *Archives of Pharmacology. Suppl.* 361, R162 2000
- Lehmann T., Köhler C., Weidauer E., Foth H. (2001): Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) in normal lung cells. *Archives of Pharmacology. Suppl.* 363, R161 2001
- Lehmann T., Köhler C., Weidauer E.; Foth H. (2001): Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Druck in Toxicology*
- Weidauer E., Mörke W., Foth H., Brömme HJ. (2001): Transitions metals are not necessary for the anaerobic formation of hydroxyl radikals by paraquat monocation radical and hydrogen peroxide. Angenommen zum 39. EUROTOX-Kongress im September 2001 in Istanbul, *Druck in Toxicology Letters.*
- Weidauer E., Röehrdanz E., Foth H. (2001): Comparison of lung cells with respect to anti-oxidative enzymes after paraquat and hydrogen peroxide. Angenommen zum 39. EUROTOX-Kongress im September 2001 in Istanbul, *Druck in Toxicology Letters.*

A.5 Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. H. Foth für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Förderung während dieser Arbeit bedanken. Herrn priv. Doz. Dr. habil. H.J. Brömme vom Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther Universität Halle möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen danken. Frau Prof. Dr. R. Kahl und Ihrer Arbeitsgruppe insbesondere Frau Dr. E. Röhrdanz vom Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Einarbeitung in Arbeitstechniken und die fachlichen Diskussionen. Meinen besonderen Dank richte ich an alle Mitarbeiter und ehemaligen Mitarbeiter des Institutes für Umwelttoxikologie Halle. Ich danke für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung und die stete Bereitschaft zu anregenden und kritischen Diskussionen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mir stets hilfreich zur Seite gestanden haben sowie Susanne Schlecht für ihre liebevolle Unterstützung.