

## 1.2 Freie Radikale - Antioxidantien

Mechanismen, die die Unterbrechung der zellulären Homeostase durch reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies verhindern, werden allgemein unter dem Begriff ‚antioxidative Schutzsysteme‘ zusammengefaßt. Neben den natürlich vorkommenden antioxidativen Schutzsystemen wurden etliche synthetische Antioxidantien entwickelt, die teilweise klinische Bedeutung erlangt haben. Zu diesen zählen Ebselen als Glutathionperoxidase Mimetikum und damit als Peroxynitritfänger (Sies & Masumoto 1997), die membranpermeable, Polyethylenglykol gekoppelte SOD-PEG (Beckman, Minor et al. 1988), verschiedene kupferhaltige Pyridinderivate als SOD-Mimetica (Nagele & Lengfelder 1996) und Acetylcysteine als Antioxidans (Conner & Grisham 1996).

### 1.2.1 Enzymatische Schutzmechanismen

Die meisten eukaryontischen Zellen besitzen eine Reihe von Enzymen, die, als integraler Bestandteil des Zellmetabolismus, reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies detoxifizieren können. Zu den wichtigsten zählen die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase (Übersicht 5). Neben einer gewissen Substratspezifität ist insbesondere die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisation von funktioneller Bedeutung (Noack, Lindenau et al. 1998).

Enzym	Struktur	Lokalisation	Aktion
Superoxid Dismutase	CuZn-SOD Mn-SOD ECM-SOD	Cytosol und Nucleus Mitochondrien Extracellulär	Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid
Glutathionperoxidase	Selenoprotein	Cytosol und Mitochondrien	Reduktion von Wasserstoffperoxid und andern Peroxiden (Lipidperoxiden)
Katalase	Hämprotein	Peroxisomen	Dismutation von Wasserstoffperoxid

Übersicht 5: Enzymatische Schutzmechanismen

Als wohl wichtigstes Enzym wird die Superoxiddismutase (SOD) angesehen, die die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid katalysiert (Gregory & Fridovich 1973; Fridovich 1978). Zwei der bisher bekannten Isoformen der SOD, die Mangan enthaltene Mn-SOD (SOD-2) und die Kupfer-Zink-SOD (CuZn-SOD, SOD-1), kommen bei Eukaryonten vor, während die evolutionär mit der Mn-SOD verwandte eisenhaltige Fe-SOD bei

Prokaryonten auftritt. Daneben existiert im ZNS von Vertebraten eine extracelluläre SOD (ECM-SOD) deren Charakterisierung gegenwärtig noch Forschungsgegenstand ist (Ookawara, Imazeki et al. 1998).

Als erste Isoform wurde die CuZn-SOD in den 30er Jahren als ein blau-grünes, kupferhaltiges Protein isoliert (Halliwell & Gutteridge 1986). Erst 30 Jahre später gelang es, ein Substrat, das Superoxid, zu identifizieren, dem trotz intensiver Suche kein weiteres hinzugefügt werden konnte (McCord & Fridovich 1969). Die CuZn-SOD existiert als Homodimer mit einem Molekulargewicht von etwa 32.000 Dalton und kommt sowohl im Cytoplasma als auch in Peroxisomen vor. Die Mn-SOD ist dagegen in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert, hat eine leicht rosa Farbe und existiert überwiegend als Tetramer mit einem Molekulargewicht von etwa 80.000 Dalton. Dieses Enzym ist im Gegensatz zur Cu/Zn-SOD nicht durch Cyanid oder Diethylthiocarbamat inhibierbar. Die Aktivität der SOD wird transkriptionell über die mRNA-Synthese reguliert und variiert stark zwischen einzelnen Geweben und Zelltypen. Eine verstärkte Expression ist für die Mn-SOD, nicht aber für die Cu/Zn-SOD, durch Hypoxie, oxidativen Stress, aber insbesondere auch durch inflammatorische bedeutsame Faktoren, wie LPS, TNF-alpha, und Interleukin 1, nachgewiesen (Yu 1994).

Die Katalase ist in Säugern ausschließlich in den Peroxisomen lokalisiert, mit den höchsten Aktivitäten in Erythrocyten und Leberzellen. Sie besteht aus vier identischen Untereinheiten (je 60.000 Dalton) mit jeweils einem Eisen-Häm-Zentrum. Bei der Dismutation von Wasserstoffperoxid verhält sich das eine Wasserstoffperoxidmolekül als Reduktans für das zweite, weswegen diese Reaktion 2. Ordnung proportional zur Konzentration von Wasserstoffperoxid ist. Die Katalase läßt sich nur schwer mit Wasserstoffperoxid sättigen und ist daher gut geeignet, hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration, wie sie bei der beta-Oxidation der Fettsäuren innerhalb der Peroxisomen entstehen, abzubauen.

Im Cytosol und in den Mitochondrien hingegen wird Wasserstoffperoxid von der Glutathionperoxidase (GPx) detoxifiziert (Halliwell & Gutteridge 1986). Die GPx ist ein tetrameres Enzym aus 4 homologen Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 75.000 - 100.000 Dalton (Flohe 1989). Als eines der wenigen selenhaltigen Enzyme zeichnet sie sich durch die modifizierte Aminosäure Selenocystein im katalytischen Zentrum aus. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist pseudo-erster Ordnung bezüglich des Wasserstoffperoxids und damit unabhängig von der Konzentration desselben, solange das Enzym in der reduzierten

Form vorliegt. Sinkt allerdings die Glutathion-Konzentration (wie bei erhöhtem oxidativen Stress) unter 1 mM, nimmt die Enzymaktivität logarithmisch ab (Flohe 1989).

### 1.2.2 Nicht-enzymatische Schutzmechanismen

Einige Substanzen sind in der Lage, so mit freien Radikalen oder Oxidantien zu reagieren, daß die dabei entstehenden Produkte entweder relativ stabil sind oder eben keine radikalischen Eigenschaften mehr besitzen. Zu diesen Antioxidantien gehören die für den Menschen essentiellen Vitamine Ascorbat, alpha-Tocopherol und beta-Carotin (Provitamin A) sowie Flavonoide (Sies & Stahl 1995), die hauptsächlich über pflanzliche Nahrung, und in jüngster Zeit vermehrt in Form von Pillen, aufgenommen werden. Eines der ubiquitären zellulären Antioxidantien, das Tripeptid Glutathion (GSH), wird jedoch von allen Eukaryonten selbst synthetisiert. Weitere endogene Antioxidantien sind die Stoffwechselmetabolite Harnsäure und Bilirubin sowie das Koenzym Q-10.

Für den Menschen ist Ascorbat ein essentielles Vitamin, während die meisten Pflanzen und Tierarten (darunter auch Nager) Ascorbat aus der Glucuronsäure synthetisieren. Ascorbat ist ein Kofaktor mehrerer Enzyme, spielt bei der Kollagensynthese eine Rolle, hat die Fähigkeit,  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  zu reduzieren und ermöglicht dadurch die Resorption von Eisen aus der Nahrung. Allerdings ist von Ascorbat auch bekannt, daß es in geringen Konzentrationen und in Anwesenheit von freiem  $\text{Fe}^{2+}$  zu prooxidativen Reaktionen neigt (Reinheckel, Wiswedel et al. 1995). Im Mittel liegen die Ascorbatkonzentrationen in Säugern zwischen 50 – 200  $\mu\text{M}$ , mit Ausnahme des ZNS, in dem die durchschnittliche Ascorbatkonzentration 3 mM beträgt. Ascorbat hat im ZNS nicht nur antioxidative Aufgaben, sondern spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der synaptischen Transmission, dient als Kofaktor bei der Synthese von Noradrenalin aus Dopamin und bei der Biosynthese von Serotonin (Rebec & Pierce 1994).

Die Regeneration der nicht-enzymatischen Antioxidantien nach erfolgter Oxidation ist von entscheidender funktioneller Bedeutung. Bei erhöhtem oxidativen Stress wird so das Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Faktoren stabilisiert, zumindest solange wie der Metabolismus die nötige Energie bereitstellen kann. So wird das Oxidationsprodukt des GSH, das GSSG, durch die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch zu GSH reduziert. Das auch als Redoxpuffer bezeichnete GSH/GSSG-System wird darüber auf einen Wert von 10 : 1 bis 100 : 1 eingestellt. Mit Konzentrationen von 1 – 10 mM ist GSH die dominierende

Thiolverbindung innerhalb der Zelle und übernimmt neben einer direkten Funktion als Radikalfänger weitergehende Aufgaben bei der Unterstützung intrazellulärer Schutzsysteme. So dient es der Glutathionperoxidase als Substrat und vermittelt die Reduktion von oxidiertem Ascorbat, das wiederum die Regeneration von oxidiertem alpha-Tocopherol unterstützt (Cooper & Kristal 1997).

### 1.3 Nachweis reaktiver Stickstoffspezies

Die Produktion des Stickoxids in biologischen Systemen kann indirekt durch die Bestimmung der bei der Synthese entstehenden Koprodukte, wie Citrullin oder N<sup>0</sup>-Hydroxy-L-Arginin, aber auch durch Messung des cGMPs nachgewiesen werden. Daneben bestehen zwei weitere Möglichkeiten, zum einem die Messung von Nitrat/Nitrit als stabilem Endprodukt des Stickoxids (bzw. im Falle des Nitrats auch des Peroxynitrit), zum anderen die Bestimmung des mit Stickoxid stöchiometrisch reagierenden Hämoglobins. Eine Sonderstellung nimmt ein neu entwickelter Sensor zur direkten Stickoxidmessung ein, mit dem es gelang, die Stickoxidproduktion in lebenden Endothelzellen zu bestimmen (Malinski & Taha 1992).

Für Peroxynitrit besteht die Möglichkeit, es über sein Zerfallsprodukt Nitrat oder über das bei der Reaktion mit Tyrosin entstehende Nitrotyrosin, das als ‚footprint‘ bezeichnet wird, zu detektieren. Das Nitrotyrosin wird dann entweder mittels HPLC im Zellhomogenat oder mit einem spezifischen Antikörpers bestimmt (Halliwell 1997). Auch wenn durch den Antikörper immunhistochemische Aussagen auf Einzelzellebene möglich sind, so ist der Nachweis nur post mortem durchzuführen.

Die Verwendung des Fluorogens Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), das unter anderem von Peroxynitrit zu einem Fluorochrom, dem Rhodamin 123, oxidiert wird, stellt ein elegantes Verfahren zur Peroxynitritbestimmung dar (Kooy, Royall et al. 1994). Wie auch im Falle des Calcium-Imagings, werden dabei mit einer fluorogenen Substanz (hier DHR 123) beladene lebende Zellen mittels der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (Life-Imaging). Von Vorteil dabei ist, daß Aussagen, auch solche quantitativer Art, über individuelle Zellen oder auch Zelltypen, möglich sind. Demgegenüber sind biochemische Verfahren häufig an die Desintegration der Zellen oder an die Akkumulation von Metaboliten gebunden, wodurch die Aussagekraft bezüglich einzelner Zelltypen und ihrer Funktionszustände, wenn überhaupt, nur eingeschränkt möglich ist.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die Induktion der iNOS in Gliazellen spielt im ZNS bei inflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen eine entscheidene Rolle, wobei die destruktive Wirkung des von der iNOS produzierten Stickoxids bzw. seines Folgeprodukts Peroxynitrit, zunehmendes Interesse findet. Die In-vivo-Effekte einer erhöhten Stickoxidproduktion lassen sich in Mikro-/Astrogliaulturen simulieren, indem durch Zugabe von LPS/IFN die Expression der iNOS provoziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Kulturmodell untersucht, inwieweit sich eine erhöhte Stickoxidproduktion auf die Viabilität der Zellen auswirkt und inwiefern diese Zellen durch ihre Ausstattung mit antioxidativen Schutzenzymen möglicherweise gegenüber einer Schädigung resistent sind. Insbesondere sollte die Ausstattung der Zellen mit Superoxiddismutasen untersucht werden, da diese die Bildung des toxischen Peroxynitrit aus Stickoxid und Superoxid durch Konkurrenz um das Superoxid begrenzen können. Anschließend sollte die endogene Stickoxidproduktion durch geeignete Methoden verifiziert werden. Da die zelluläre Verteilung der NOS in der Regel sehr heterogen ist und die produzierten Mengen an Stickoxid sehr gering sind, war es wünschenswert, einen Ansatz zu entwickeln, der Aussagen auf Einzelzellebene zuläßt. Generell bietet sich dazu die Fluoreszenzmikroskopie an, wie sie z. B. zum Nachweis des Peroxynitrit durch DHR 123 eingesetzt wird. Um eine analoge Möglichkeit zur Stickoxidmessung zu entwickeln, sollte, ausgehend von Literaturbefunden (Gunasekar, Kanthasamy et al. 1995), zunächst im zellfreien System geprüft werden, ob das Fluorochrom DCF-H als Marker für Stickoxid geeignet ist. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, daß DCF-H weniger durch Stickoxid, stattdessen aber sehr effektiv durch Peroxynitrit oxidiert wird. Zudem erwies sich DCF-H im direkten Vergleich mit DHR 123 als wesentlich sensitiver. Da gerade dem Peroxynitrit ein Großteil der toxischen Wirkungen des Stickoxids zugeschrieben wird, waren die sich durch DCF-H neu ergebenden Möglichkeiten für den weiteren Verlauf der Experimente entscheidend. Zunächst mußte untersucht werden, ob DCF-H als Marker für Peroxynitrit auch in lebenden Zellen geeignet ist. Anschließend galt es, unter Verwendung von DCF-H zu prüfen, welche - möglicherweise auch therapeutisch einsetzbaren - Substanzen die Bildung des Peroxynitrit wirksam verhindern oder dessen schnellen Abbau fördern und somit die indirekt toxischen Stickoxideffekte begrenzen helfen.