

Aus dem Institut für Pathophysiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Jürgen Holtz



Nachweismöglichkeiten reaktiver Sauerstoffspezies am Beispiel der Xanthin- und der NAD(P)H-Oxidase

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

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

von Nico Wippich
geboren am 02.08.1973 in Halle (Saale)

Betreuer: PD Dr. Hans-Jürgen Brömme

Gutachter:

1. PD Dr. Hans-Jürgen Brömme
2. Prof. Dr. Elmar Peschke
3. Prof. Dr. Rüdiger Hardeland (Göttingen)

06.05.2003 / 08.10.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006392

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006392>]

Meinen Eltern gewidmet.

Referat und bibliographische Beschreibung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. So kommt z.B. den Superoxidanionen ($\bullet\text{O}_2^-$), die durch die Xanthin- und die NAD(P)H-Oxidase gebildet werden können, bei der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens und der Arteriosklerose eine große Bedeutung zu.

Die Xanthinoxidase (XO) ist zudem als *in vitro*-Generator für ROS weit verbreitet. Sie diente in dieser Studie als Modellenzym für das komplexe Reaktionsverhalten der ROS, vor allem der $\bullet\text{O}_2^-$, um durch eine stöchiometrisch eindeutige Reaktion eine Grundlage für die korrekte und adäquate Anwendung der verschiedenen Detektionsmethoden zu erhalten. Die Charakterisierung und Bewertung dieser Verfahren soll zu einer Verringerung meßtechnischer Artefakte und deren fälschlicher Interpretation beitragen.

Bedingt durch die große Anzahl an Quellen und Präparationsmethoden ist jedoch eine kritische Auswahl der XO notwendig. Daher wurde exemplarisch das Reaktionsverhalten von XO aus Buttermilch (XO_{bm}) mit XO von Mikroorganismen (XO_{mo}) verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß XO_{mo} keine $\bullet\text{O}_2^-$ generieren kann. Im Hinblick auf das Schädigungspotential kommt den $\bullet\text{O}_2^-$ besondere Aufmerksamkeit zu, da sie zur Bildung von Hydroxylradikalen durch die $\bullet\text{O}_2^-$ -vermittelte FENTON-Reaktion notwendig sind. Somit ist der Einsatz der XO_{mo} als *in vitro*-Schädigungsgenerator abzulehnen.

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose ist die Reaktion von $\bullet\text{O}_2^-$ mit dem vasodilatatorisch wirksamen Stickstoffmonoxid zum toxischen Peroxynitrit und die Oxidierung von *low density*-Lipoproteinen. Als Hauptquelle für vaskuläre $\bullet\text{O}_2^-$ gilt die endotheliale NAD(P)H-Oxidase. Die mRNA-Expression der gp91^{phox}-Untereinheit dieses Enzyms kann durch Endothelin-1 (ET-1) stimuliert werden. ET-1 ist über das Renin-Angiotensin-System eng mit der Hypertonie assoziiert, die als Risikofaktor für das Entstehen einer Arteriosklerose gilt. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von ET-1 auf das funktionelle Verhalten der NAD(P)H-Oxidase in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen unter Anwendung der zuvor etablierten Verfahren untersucht. Mit der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz ließ sich eine Stimulierung der ROS-Bildung durch ET-1 nachweisen.

Wippich, Nico: Nachweismöglichkeiten reaktiver Sauerstoffspezies am Beispiel der Xanthin- und der NAD(P)H-Oxidase. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2003

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Sauerstoff | 1 |
| 1.2 | Freie Radikale und ROS | 1 |
| 1.2.1 | Superoxidanion ($\bullet\text{O}_2^-$) | 2 |
| 1.2.2 | Wasserstoffperoxid (H_2O_2) | 3 |
| 1.2.3 | Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) | 3 |
| 1.3 | Oxidativer Streß | 4 |
| 1.3.1 | FENTON-/HABER-WEISS-Reaktion | 4 |
| 1.4 | ROS-generierende Enzymsysteme | 5 |
| 1.4.1 | Xanthinoxidase (XO) | 5 |
| 1.4.2 | NAD(P)H-Oxidase | 6 |
| 1.5 | Antioxidativer Schutz | 7 |
| 1.5.1 | Superoxiddismutase (SOD) | 7 |
| 1.5.2 | Katalase (KAT) | 8 |
| 1.5.3 | Glutathionperoxidase (GPX) | 8 |
| 1.5.4 | Antioxidantien | 8 |
| 1.5.5 | Bindung von Eisen | 9 |
| 1.6 | Vasomotorische Regulation | 9 |
| 1.7 | Methodische Grundlagen | 10 |
| 1.7.1 | Cytochrom c-Reduktion | 10 |
| 1.7.2 | NBT-Reduktion | 10 |
| 1.7.3 | Luminometrie | 11 |
| 1.7.4 | Polarographie | 12 |
| 1.7.5 | ESR-Spektroskopie | 12 |
| 2 | Zielstellung | 13 |
| 3 | Material und Methodik | 14 |
| 3.1 | Chemikalien | 14 |
| 3.2 | Herstellen der Stammlösungen | 14 |
| 3.3 | Generelle Versuchsanordnung | 15 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Spektralphotometrische Untersuchung | 16 |
| 3.4.1 | Harnsäure-Bildung und XO-Aktivitätsmessung | 16 |
| 3.4.2 | Lucigenin-Einfluß auf die XO-Aktivität | 16 |
| 3.4.3 | Cytochrom c-Reduktion | 17 |
| 3.4.4 | Lucigenin-Einfluß auf die Cytochrom c-Reduktion | 17 |
| 3.4.5 | NBT-Reduktion | 17 |
| 3.5 | Luminometrie | 17 |
| 3.5.1 | Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz | 17 |
| 3.5.2 | Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz | 18 |
| 3.6 | Polarographie | 18 |
| 3.6.1 | Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs | 18 |
| 3.6.2 | Lucigenin-Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch | 18 |
| 3.7 | ESR-Spektroskopie | 19 |
| 3.7.1 | DEPMPO | 19 |
| 3.7.2 | DMPO | 19 |
| 3.8 | NAD(P)H-Oxidase | 20 |
| 3.8.1 | Präparation und Meßverfahren | 20 |
| 3.8.2 | Proteinbestimmung | 20 |
| 3.9 | Statistische Auswertung | 20 |
| 4 | Ergebnisse | 21 |
| 4.1 | Reaktionsverhalten der XO_{bm} im Vergleich mit der XO_{mo} | 21 |
| 4.1.1 | Bestimmung der Harnsäurebildung und Aktivitätsmessung | 21 |
| 4.1.2 | Polarographische Messung | 22 |
| 4.1.3 | Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz | 23 |
| 4.1.4 | Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz | 24 |
| 4.1.5 | Cytochrom c-Assay | 25 |
| 4.1.6 | NBT-Assay | 27 |
| 4.1.7 | ESR-Spektroskopie | 27 |
| 4.2 | Kontrolluntersuchungen mit XO_K | 29 |
| 4.3 | Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von Lucigenin | 30 |
| 4.3.1 | Einfluß von Lucigenin auf die XO-Aktivität | 30 |
| 4.3.2 | Einfluß von Lucigenin auf den O_2 -Verbrauch | 30 |
| 4.3.3 | Einfluß von Lucigenin auf die Cytochrom c-Reduktion | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.4 | NAD(P)H-Oxidase | 32 |
| 4.4.1 | Reaktionsverhalten | 32 |
| 4.4.2 | Endothelin-1-Stimulierung | 32 |
| 5 | Diskussion | 33 |
| 5.1 | Vergleich der XO-Präparationen | 33 |
| 5.2 | Methodenkritik | 38 |
| 5.3 | NAD(P)H-Oxidase | 42 |
| 6 | Zusammenfassung | 45 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 47 |
| 8 | Thesen | 54 |
| 9 | Anhang | |
| 9.1 | Lebenslauf | |
| 9.2 | Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche | |
| 9.3 | Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit | |
| 9.4 | Danksagung | |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | | | |
|-------------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|
| Abb. | Abbildung | GSH | Glutathion (reduziert) |
| ADP | Adenosin-5-diphosphat | GSSG | Glutathion (oxidiert) |
| ATP | Adenosin-5-triphosphat | H ₂ | Wasserstoff |
| ALP | Allopurinol | H ⁺ | Wasserstoffion |
| Bidest | bidestilliertes Wasser | H ₂ O | Wasser |
| C | Kohlenstoff | H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| Cyt. c | Cytochrom c | HUVEC | <i>human umbilical vein</i> |
| CL | Chemilumineszenz | | <i>endothelial cells</i> - humane |
| Coel. | Coelenterazin | | umbilikalvenöse |
| (d)E | Extinktion(sänderung) | | Endothelzellen |
| DEPMPO | 5-Diethoxyphosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid, <i>spin trap</i> | HS | Harnsäure |
| | | HX | Hypoxanthin |
| | | IDP | Diphenyliodonium |
| DMPO | 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid, <i>spin trap</i> | IRS | Ischämie-Reperfusionsschaden |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure | KAT | Katalase |
| DPI | Diphenyliodonium | KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| ε | <i>epsilon</i> – molarer Extinktionskoeffizient | LDL | <i>low density lipoprotein</i> – |
| e ⁻ | Elektron(en) | | Lipoprotein niederer Dichte |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | oxLDL | oxidiertes LDL |
| Enz | Enzym | Luc ⁽²⁺⁾ | Lucigenin |
| ESR | Elektronenspin-Resonanz | •Luc ⁺ | Lucigeninradikal |
| ET-1 | Endothelin-1 | LPO | Lipidperoxidation |
| FAD | Flavinadenindinucleotid | M | molar (Mol pro Liter) |
| FeSO ₄ | Eisen(II)-sulfat | mRNS | <i>messenger</i> |
| Fe ²⁺ | Eisen(II)-Ionen | | Ribonucleinsäure |
| Fe ³⁺ | Eisen(III)-Ionen | n | Anzahl, |
| GPX | Glutathionperoxidase | | Stichprobenumfang |

| | | | |
|----------------------------------|---|------------------|---|
| NaCl | Natriumchlorid | PBS | <i>phosphat buffered saline</i> – phosphatgepufferte Salzlösung |
| NAD(P) ⁺ | Nicotinamidadenin- dinucleotid(-phosphat) (oxidiert) | ROS | <i>reactive oxygen species</i> - reaktive Sauerstoffspezies |
| NAD(P)H | Nicotinamidadenin- dinucleotid(-phosphat) (reduziert) | rLU | <i>relative Light Unit</i> - relative Lichteinheiten |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogen- phosphat | RNS | Ribonucleinsäure |
| NaOH | Natriumhydroxid | s | Sekunden |
| NBT ⁽²⁺⁾ | Nitroblautetrazolium | SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| •NO | Stickstoffmonoxid | SOD | Superoxiddismutase |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase | U | <i>units</i> – (internationale) Einheiten |
| O ₂ | Sauerstoff | | |
| •O ₂ ⁻ | Superoxidanion | X | Xanthin |
| •OH | Hydroxylradikal | XDH | Xanthindehydrogenase |
| OH ⁻ | Hydroxidion | XO | Xanthinoxidase |
| OHOO ⁻ | Peroxynitrit | XO _{bm} | ... aus Buttermilch |
| p | Signifikanzniveau | XO _K | ..., Kontrollpräparation |
| pH | negativer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration | XO _{mo} | ... von Mikroorganismen |
| | | XOR | Xanthinoxidoreduktase |

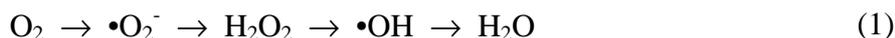
- *Symbol für ein ungepaartes Elektron*

1 Einleitung

1.1 Sauerstoff

Sauerstoff (O_2) zeigt in seinem Reaktionsverhalten eine Besonderheit, die in seiner Elektronenkonfiguration begründet liegt. In den zwei äußeren Molekülorbitalen befinden sich zwei ungepaarte Außenelektronen, die einen parallelen Eigendrehimpuls (Spin) besitzen. Sollte Sauerstoff einen anderen Stoff oxidieren und somit ein Elektronenpaar aufnehmen, so müßte dieses ebenfalls einen parallelen Spin besitzen. Ein Elektronenpaar in einem Orbital hat aber aus thermodynamischen Gründen gewöhnlich einen antiparallelen Spin. Diese Spinrestriktion ist für den reaktionsträgen Grundzustand von O_2 verantwortlich und schützt somit biologische Strukturen vor oxidativer Schädigung [9, 28, 95].

Eine Umgehung dieser Restriktion kann durch eine Reaktion mit Übergangsmetallionen erfolgen. Sie besitzen ungepaarte Außenelektronen, können in mehreren stabilen Oxidationsstufen existieren und sind als aktive Zentren in vielen Enzymen anzutreffen [9, 26, 33]. Produkt dieser univalenten (1-Elektronen-Übergänge) Reaktionen sind die 4 Reduktionsstufen des O_2 bis hin zum Wasser:



Die dabei entstehenden Superoxidanionen ($\bullet O_2^-$), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) werden - neben anderen - unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) zusammengefaßt.

1.2 Freie Radikale und ROS

Als freie Radikale werden Atome oder Moleküle mit einer ungeraden Anzahl an Elektronen bezeichnet, die unabhängig existieren können. Prinzipiell sind drei Formen der Radikalentstehung möglich:

- die Elektronenaufnahme eines Nichtradikals führt zu einem Radikalanion
- bei Elektronenabgabe durch ein Nichtradikal wird ein Radikalkation gebildet
- die homolytische Aufspaltung einer kovalenten Bindung ergibt ungeladene Radikale.

Auf Grund ihres ungünstigen energetischen Zustandes sind sie bestrebt, durch Elektronenaufnahme oder -abgabe eine stabile Elektronenkonfiguration zu erreichen.

Dadurch können Radikale zur Schädigung des betreffenden Reaktionspartners führen. Die Entstehungsquellen von ROS sind vielfältig: so werden ca. 2 % des aufgenommenen Sauerstoffs im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien in ROS umgewandelt. Dieser Anteil erhöht sich proportional zur Sauerstoffspannung und macht einen wesentlichen Teil der Sauerstofftoxizität aus [84, 95].

Weiterhin entstehen ROS im Stoffwechsel von Xenobiotika und bei vielen enzymkatalysierten Reaktionen. So sind z.B. die Prostaglandinsynthase, die NO-Synthase (NOS), die Xanthin- und die NADPH-Oxidase in der Lage, ROS zu bilden [9, 40, 93].

Freie Radikale bzw. ROS sind in vielfältige pathophysiologische Prozesse involviert, dabei haben die jeweiligen Schädigungsmechanismen verschiedene Ansatzpunkte. Neben einer direkten Interaktion mit der genetischen Information (Induktion von DNS-Strangbrüchen und Punktmutationen) ist die Inhibierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen möglich. Sauerstoffradikale können ebenfalls Enzyme und Proteine inaktivieren und Lipidperoxidationen (LPO) initiieren [68, 80, 95].

ROS haben jedoch auch eine nicht zu unterschätzende Bedeutung im physiologischen Stoffwechsel. So entstehen z.B. ROS bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsvorgänge. Sie fungieren als *second messenger*, stellen chemotaktische Faktoren bei entzündlichen Prozessen dar und dienen der Abwehr von Bakterien durch phagozytierende Zellen [28]. Weiterhin sind sie an der vasomotorischen Regulation beteiligt [13, 30].

1.2.1 Superoxidanion ($\bullet\text{O}_2^-$)

Superoxidanionen entstehen durch univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff:



Auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit und ihrer Polarität sind sie nicht in der Lage, intrazellulär größere Strecken zurückzulegen bzw. Membranen zu permeieren. In wässriger Lösung, besonders bei saurem pH-Wert, dismutieren die $\bullet\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 und liefern damit einen Ausgangsstoff für die $\bullet\text{OH}$ -Generierung durch die FENTON-Reaktion [26, 28]. Der Hauptbildungsort der $\bullet\text{O}_2^-$ sind die Elektronentransportketten in den Mitochondrien, außerdem sind sie Produkt vieler enzymkatalysierter Reaktionen (NO-Synthase, Xanthin- und NADPH-Oxidase) [84, 93]. Neben ihrer Funktion als *second messenger* nehmen $\bullet\text{O}_2^-$ eine wichtige Rolle in der Vasoregulation ein und sind an der Genese der Arteriosklerose

beteiligt [89, 96]. Weiterhin können $\bullet\text{O}_2^-$ aus Speicherproteinen wie Ferritin Eisen freisetzen [4, 54].

1.2.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

H_2O_2 kann neben einer direkten enzymatischen Bildung durch spontane oder vor allem durch eine Superoxiddismutase-katalysierte Dismutation von $\bullet\text{O}_2^-$ entstehen:



Auf Grund seiner stabilen Elektronenkonfiguration ist es kein Radikal und somit wenig reaktionsfreudig [95]. Bei einer Halbwertszeit von einigen Sekunden liegt die intrazelluläre Konzentration im mikromolaren Bereich. Das ungeladene H_2O_2 kann größere Distanzen zurücklegen und Membranen permeieren [26, 70]. H_2O_2 hat als Vorstufe zur Bildung von Hydroxylradikalen durch die $\bullet\text{O}_2^-$ -vermittelte FENTON-Reaktion eine große pathophysiologische Bedeutung. Der enzymatische Abbau von H_2O_2 im Sinne einer Entgiftung kann durch Katalase (KAT) und durch Glutathionperoxidase (GPX) erfolgen [1, 28].

1.2.3 Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$)

Das $\bullet\text{OH}$ zählt zu den aggressivsten Sauerstoffradikalen [95]. Durch sein stark positives Redoxpotential von 183 mV ist es eines der stärksten Oxidationsmittel in wässrigen Lösungen [12]. Der Hauptreaktionsmechanismus besteht dabei in der Abstraktion von Wasserstoffatomen aus kovalenten C-H-Bindungen und in der Adduktierung an Doppelbindungen oder an aromatische Strukturen [9, 71]. Als Hauptquelle für die Entstehung von $\bullet\text{OH}$ in biologischen Systemen gilt die Eisen(II)-vermittelte FENTON-Reaktion [54]. Durch seine extreme Kurzlebigkeit (biologische Halbwertszeit 1 ns) kann es jedoch nur Stoffe in unmittelbarer Nähe seines Entstehungsortes angreifen [12, 70]. Solange nicht jedes entstehende $\bullet\text{OH}$ durch einen Abfänger (*scavenger*) direkt entgiftet werden kann, ist eine Generierung praktisch immer mit Schäden verbunden. Das $\bullet\text{OH}$ ist der Hauptinitiator für Lipidperoxidationen (LPO). Diese finden vor allem in Zellbereichen wie Membranen statt, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind [68].

1.3 Oxidativer Streß

Im ausbalancierten Zellstoffwechsel befinden sich Radikalbildung und Radikalentgiftung im Gleichgewicht. Oxidativer Streß bezeichnet das zeitweilige „Überwiegen“ von ROS durch deren zunehmende Generierung oder durch verringerte antioxidative Kapazität, z.B. bei Fehlernährung oder schweren Krankheiten. Gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Radikalinteraktionen und Schädigungsmechanismen, die zum oxidativen Streß führen, ist hauptsächlich die $\bullet\text{OH}$ -Bildung durch die FENTON-Reaktion. Die hierdurch verursachten Erkrankungen sind vielfältig. Als Beispiel sind die Arteriosklerose, der Diabetes mellitus und der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) zu nennen [7, 64, 90, 95]. Weiterhin können radikalvermittelte DNS-Schädigungen einen prädisponierenden Faktor für die spätere Entstehung von Neoplasien darstellen [70, 95].

1.3.1 FENTON-/HABER-WEISS-Reaktion

Lange Zeit postulierte man eine direkte Reaktion zwischen $\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2 , die zur Bildung von hochtoxischem $\bullet\text{OH}$ führen sollte. Nach ihren Entdeckern wurde sie HABER-WEISS-Reaktion genannt [8]. Auch für die Xanthinoxidase (XO) wurde ein Mechanismus zur $\bullet\text{OH}$ -Generierung diskutiert [41, 83]. Später konnte jedoch festgestellt werden, daß für eine $\bullet\text{OH}$ -Bildung die Katalyse durch Übergangsmetallionen notwendig ist. In biologischen Systemen spielt neben anderen Übergangsmetallen, wie z.B. Kupfer, das Eisen (Fe) die wichtigste Rolle [27, 33, 54]:



Diese Reaktion wurde nach FENTON benannt. Für die Reduktion des Fe^{3+} sind *in vivo* vor allem die $\bullet\text{O}_2^-$ verantwortlich [26]:



Die $\bullet\text{O}_2^-$ können jedoch unter bestimmten Bedingungen durch andere Stoffe wie Vitamin C oder Glutathion ersetzt werden [8, 33]. Für den aus (4) und (5) bestehenden Reaktionsmechanismus ist der Term ‘ $\bullet\text{O}_2^-$ -vermittelte FENTON-Reaktion’ gebräuchlich.

Auf Grund der geringen Menge an freiem Eisen sind die $\bullet\text{O}_2^-$ für die Unterhaltung der Reaktion zwingend notwendig, da sonst nur ein Zyklus nach Gleichung 4 möglich wäre. Diese Limitierung kann jedoch bei Zuständen mit Eisenüberladung

(bei hereditärer Hämochromatose oder nach Massivtransfusionen) aufgehoben werden, so daß unter diesen Bedingungen mit einer verstärkten $\bullet\text{OH}$ -Generierung zu rechnen ist [28].

1.4 ROS-generierende Enzymsysteme

1.4.1 Xanthinoxidase (XO)

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist ein im Purinstoffwechsel involviertes zytosolisches Enzym, welches in 2 möglichen Formen existiert: in der hauptsächlich vorhandenen Dehydrogenaseform (XDH, 80 %) und in der Oxidaseform (XO, 20 %) [62, 75]. Beide katalysieren den Abbau von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure (HS), die XDH verwendet dabei als Elektronenakzeptor oxidiertes Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+):



Während der Ischämiephase des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) kann eine Umwandlung der XDH-Form in die XO-Form erfolgen [44, 89]. Die XO ist ein dimeres Protein mit zwei unabhängigen aktiven Zentren. Diese enthalten jeweils eine Molybdän-, zwei Eisen/Schwefel- und eine Flavinadenindinucleotid-Untereinheit (FAD). HX bzw. X wird am Molybdän oxidiert, die Übertragung der Elektronen am FAD auf den Akzeptor Sauerstoff führt zur Bildung von H_2O_2 und $\bullet\text{O}_2^-$ in einem Verhältnis von ca. 80 : 20 [5, 19, 31]:



Ein hoher pH-Wert, eine hohe O_2^- - und geringe X-Konzentration führen zur Verschiebung des Verhältnisses $\text{H}_2\text{O}_2 / \bullet\text{O}_2^-$ zu Gunsten der $\bullet\text{O}_2^-$ [20].

Beim IRS erfolgt nach Einsetzen der Reperusionsphase mit Reoxigenierung eine XO-katalysierte Generierung von ROS nach Gleichung 7. Die nachfolgende FENTON-vermittelte $\bullet\text{OH}$ -Bildung führt zur Schädigung biologischer Strukturen [7, 76, 90].

Wichtige Hemmstoffe der XO sind das Allopurinol (ALP) und sein Metabolit Oxypurinol. ALP ist ein Substratanalogen, welches an die Molybdänuntereinheit bindet und zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt [5, 31, 51].

Zur Klärung der Genese vieler ROS-vermittelter Erkrankungen ist die Kenntnis des genauen Schädigungsmechanismus notwendig. Der Einsatz der XO als *in vitro*-Generator für ROS bietet hierfür gute Voraussetzungen. So z.B. ihr Produktspektrum ($\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2

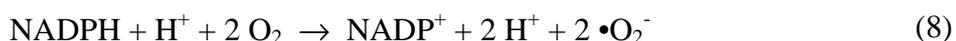
als Vorstufen für die FENTON-Reaktion), ihre stöchiometrisch eindeutige Reaktion und die Detektionsmöglichkeit sowohl ihrer Ausgangsstoffe wie auch der Produkte [55]. Weiterhin ist die einfache Isolierbarkeit der XO in höheren Mengen vorteilhaft.

Bedingt durch unterschiedliche Präparationsmethoden sind artifizielle Enzymformen bekannt. Hier soll das *deflavo*-Enzym genannt werden. Dieses kann infolge fehlender Oxidaseaktivität keine ROS generieren [5, 39]. Um die Verwendung einer solchen Präparation als *in vitro*-Quelle für ROS zu verhindern, soll in dieser Arbeit exemplarisch das Reaktionsverhalten von XO verschiedener Herkunft, von Buttermilch und von Mikroorganismen, untersucht werden [91].

1.4.2 NAD(P)H-Oxidase

Die phagozytäre NADPH-Oxidase ist ein Enzymkomplex aus vier Untereinheiten. Es lassen sich zwei zytosolische (p47^{phox} und p67^{phox}) und zwei membrangebundene (gp91^{phox} und p22^{phox}, diese bilden das Flavocytochrom b₅₅₈) unterscheiden [23, 78].

Bei Aktivierung der NADPH-Oxidase durch z.B. opsonierte Bakterien kommt es durch die Phagozytose des Fremdmaterials zu einer intravesikulären Lage der NADPH-Oxidase. Dabei erfolgt eine kalziumabhängige Phosphorylierung der zytosolischen Faktoren durch die Proteinkinase C mit Translokation und „Andocken“ an das Flavocytochrom b₅₅₈. Weitere notwendige zytosolische Aktivierungsfaktoren sind p40^{phox} und p21^{rac} [23]. Als Produkt dieser Aktivierung entstehen •O₂⁻:



Die Dismutation der generierten •O₂⁻ zum H₂O₂ und die nachfolgende Bildung von •OH führen zur Zerstörung bzw. Lyse des inkorporierten Fremdmaterials [50, 78, 95]. Dabei wird ein als *respiratory burst* bezeichnetes, ca. 20faches Ansteigen des extramitochondrialen Sauerstoffverbrauches beobachtet [11, 28]. Das verbrauchte NADPH kann durch den Hexosemonophosphatweg wieder bereitgestellt werden.

Die NADPH-Oxidase kann durch Diphenyl- (IDP) bzw. Diphenyleniodonium (DPI) gehemmt werden [29, 65]. Als Flavoenzyminhibitoren blockieren sie das Flavin, welches die Substratbindungsstelle für NAD(P)H darstellt. Aus diesem Grund sind DPI bzw. IDP keinesfalls spezifisch für die NADPH-Oxidase, sondern hemmen weitere flavinhaltige Enzyme wie die XO und die NOS [36, 65].

Die NADPH-Oxidase-Untereinheiten konnten in anderen Geweben bzw. Zellen wie Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden.

Auch in diesen Geweben wird somit eine Funktion der NADPH-Oxidase vermutet [36, 37, 58]. Ungeklärt ist jedoch die Substratspezifität (NADH bzw. NADPH) dieser Enzyme, so daß hierfür die Schreibweise 'NAD(P)H-Oxidase' verwendet wird. Von der phagozytären Form unterscheiden sich diese NAD(P)H-Oxidasen weiterhin durch eine ca. 10^3 fach geringere $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion ohne *respiratory burst* [30].

Bei den vaskulären Enzymformen wird eine enge Interaktion mit der vasomotorischen Regulation diskutiert [23, 30]. Für die vasokonstriktorischen Peptide Angiotensin-II und Endothelin-1 (ET-1) konnte eine Expressionsstimulation der membrangebundenen Untereinheit gp91^{phox} der NAD(P)H-Oxidase in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden [14, 60, 73]. In dieser Arbeit soll nun geklärt werden, ob sich durch ET-1 auch eine funktionelle Stimulierung der NAD(P)H-Oxidase im Sinne einer Erhöhung der generierten Radikalmenge nachweisen läßt.

1.5 Antioxidativer Schutz

1.5.1 Superoxiddismutase (SOD)

Die SOD katalysiert die Dismutation von $\bullet\text{O}_2^-$:



Diese Reaktion läuft 10^4 fach schneller als die Spontandismutation ab und wird nur durch die Diffusion vom Substrat zum Enzym limitiert [26]. Auf Grund des dabei entstehenden H_2O_2 ist diese Reaktion keine Entgiftung. Durch die Entfernung von $\bullet\text{O}_2^-$ wird jedoch die Reduzierung von Fe^{3+} zu FENTON-fähigem Fe^{2+} nach Gleichung 5 verhindert und der Ablauf einer FENTON-Reaktion eingeschränkt.

SOD kommt in verschiedenen Formen vor. Neben der mitochondrialen Mangan-SOD macht die Cu-Zn-SOD mit 95 % den Hauptanteil bei Säugetieren aus [20]. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit Kupfer (Cu) im katalytischen Zentrum. Als Mechanismus wird eine zweimalige Reaktion der $\bullet\text{O}_2^-$ mit dem Cu angenommen. Dadurch entstehen einerseits höhere und andererseits niedrigere Oxidationsstufen der $\bullet\text{O}_2^-$: O_2 sowie H_2O_2 [20].

SOD weist eine hohe Konzentration in stoffwechselaktiven Organen wie Herz, Lunge, Leber und Niere auf, liegt dabei hauptsächlich intrazellulär-zytoplasmatisch vor und ist nicht membranpermeabel [28].

1.5.2 Katalase (KAT)

Das Enzym Katalase ist ein tetrameres Hämprotein mit je einer zentralen Eisen-Häm-Gruppe. Es führt durch einen Zwei-Elektronen-Übergang unter Bildung des Zwischenproduktes *compound-I* zur direkten Entgiftung von H₂O₂ zu H₂O und O₂ [1]:



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist praktisch nur durch die Diffusion von H₂O₂ zum Enzym begrenzt. Die Freisetzung von O₂ läßt sich polarographisch bestimmen und gilt als indirekter H₂O₂-Nachweis [1, 25]. Durch Wegnahme des Ausgangsstoffes H₂O₂ kann KAT eine (*in vitro*-)Bildung von •OH durch die FENTON-Reaktion vollständig verhindern [26]. Da aber KAT vor allem intrazellulär-mikrosomal vorkommt, hat sie im H₂O₂-Stoffwechsel im Vergleich zum GPX/GSH-System nur eine untergeordnete Bedeutung [95].

1.5.3 Glutathionperoxidase (GPX)

Die GPX führt zur Entgiftung von H₂O₂ unter Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH):



GSH wird zu GSSG oxidiert und steht nicht mehr als Antioxidans zur Verfügung. Die Rückführung der oxidierten in die reduzierte Form unter Verbrauch von NADPH erfolgt durch die Glutathionreduktase [28].

Auf Grund der zur Katalase komplementären Kompartimentierung – die GPX befindet sich hauptsächlich im Zytosol und in der Mitochondrienmatrix – und ihrer geringen Substratspezifität besitzt die GPX als antioxidatives Enzym einen hohen Stellenwert [95].

1.5.4 Antioxidantien

Der Begriff Antioxidantien beinhaltet im engeren Sinn Substanzen, die ohne die Vermittlung von Enzymen mit freien Radikalen reagieren und diese neutralisieren können (Abfänger = *scavenger*). Die Wirksamkeit des Abfangens der Radikale wird vor allem durch die Konzentration der *scavenger*-Moleküle bestimmt.

Das schon als Substrat für die GPX genannte Glutathion (GSH) zählt auf Grund seiner hohen intrazellulären Konzentration von ca. 5 mM zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe [28, 95]. Die Harnsäure kommt im Blutplasma in Konzentrationen von bis zu 450 µM vor und gehört damit zu den wesentlichen extrazellulären Abfängern [34].

Das Vitamin E ist das bedeutendste lipidlösliche Antioxidans. Es kann sich in Membranen einlagern und dort zur Termination von Lipidperoxidationen führen [80]. In der wässrigen Phase ist das Vitamin C neben dem GSH der wesentliche *scavenger*. Es fungiert weiterhin als Regenerator für das Vitamin E [9, 81, 95].

1.5.5 Bindung von Eisen

Die $\bullet\text{OH}$ gelten als Hauptverursacher für oxidative Schäden. Ein direktes Abfangen schon gebildeter $\bullet\text{OH}$ ist infolge der *in vivo* begrenzten Fängerkonzentration und der Kurzlebigkeit von $\bullet\text{OH}$ nur in engem Rahmen möglich [81]. Der Organismus versucht somit, die $\bullet\text{OH}$ -Bildung zu verhindern. Dazu ist das Entgiften der zur $\bullet\text{OH}$ -Entstehung notwendigen ROS wie $\bullet\text{O}_2^-$ oder H_2O_2 durch die oben beschriebenen antioxidativen Substanzen notwendig.

Dem Eisen kommt als notwendigem Redoxpartner in der FENTON-Reaktion (Gleichung 4) ein großer Stellenwert zu. Ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus ist somit die Bindung von Eisen. Es wird in den Transport- und Speichermolekülen Transferrin und Ferritin in einem nicht-FENTON-fähigen Zustand „eingepackt“. Damit ist das reaktionsfähige Eisen vor direkter Interaktion mit H_2O_2 geschützt [27, 54, 81].

1.6 Vasomotorische Regulation

In der vasomotorischen Regulation kommt dem Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) eine zentrale Bedeutung zu. Als sogenannter *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) wird $\bullet\text{NO}$ durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin gebildet und führt zur Vasodilatation. Durch Reaktion des $\bullet\text{NO}$ mit $\bullet\text{O}_2^-$ ist eine physiologische Modulation des Gefäßtonus möglich:



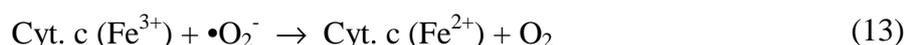
Diese Interaktion, die dreifach schneller abläuft als die durch SOD vermittelte Dismutation von $\bullet\text{O}_2^-$, ist jedoch auch pathophysiologisch für die Genese der Arteriosklerose bedeutsam. Der übermäßige Verbrauch von $\bullet\text{NO}$ bedingt eine Verschlechterung der Gefäßrelaxation. Das entstehende Peroxynitrit (ONOO^-) führt durch seine Zytotoxizität zur oxidativen Gewebe- und DNS-Schädigung [10, 30, 66, 69]. Die endotheliale NAD(P)H-Oxidase gilt als Hauptquelle für $\bullet\text{O}_2^-$ [22, 57, 60]. Über deren Reaktion zum

ONOO⁻ nach Gleichung 12 und weitere Mechanismen kommt es zu einer Oxidierung von *low density*-Lipoprotein (LDL bzw. oxLDL). oxLDL kann von Endothelzellen und infiltrierenden Makrophagen aufgenommen werden. Es entstehen Schaumzellen, welche die Integrität der Endothelschicht zerstören. Weiter anhaftende Thrombozyten, Makrophagen und Fibroblasten führen zur Organisation einer Plaque und im späteren Verlauf zu einem Thrombus [13, 28, 72].

1.7 Methodische Grundlagen

1.7.1 Cytochrom c-Reduktion

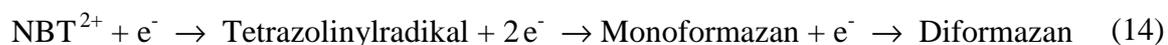
Cytochrom c (Cyt. c) ist eine seit langem etablierte Detektorsubstanz für •O₂⁻, die ursprünglich zur Bestimmung der SOD-Aktivität eingesetzt wurde [15, 50, 52]. Grundlage dafür ist die spektralphotometrische Unterscheidbarkeit der zwei Redoxformen *ferrri*-Cyt. c (Fe³⁺) und *ferro*-Cyt. c (Fe²⁺). Hierbei weist die reduzierte Form bei 550 nm eine höhere Extinktion auf. Die oxidierte Form wird durch Ein-Elektronen-Übertragung vom •O₂⁻ in die reduzierte Form umgewandelt. Deren Zunahme kann bei 550 nm verfolgt werden:



Über das Lambert-Beersche Gesetz läßt sich die Menge des gebildeten Ferrocycenchroms bzw. des dazu notwendigen Reduktionsmittels quantifizieren.

1.7.2 NBT-Reduktion

Nitroblautetrazolium (NBT) wird durch •O₂⁻ zu dem blauvioletten, schwerlöslichen Farbstoff Formazan reduziert. NBT liegt als Ditetrazoliumsalz vor, die Reduktion erfolgt durch vier Elektronen über radikalische Intermediate:



Die Entstehung von Formazan ist optisch sichtbar bzw. kann spektralphotometrisch bei 570 nm verfolgt werden [15]. Als Nachweistest für die Fähigkeit der Phagozyten zur Bildung von •O₂⁻ erlangte die NBT-Reduktion klinische Bedeutung [28]. Störungen dieser Abwehrfunktion kommen in Form der sogenannten ‚septischen Granulomatose‘ zum Ausdruck. Sie bezeichnet die fehlende Bildung von •O₂⁻ durch die NADPH-Oxidase. Daraus resultiert ein Unvermögen der Phagozyten zur Lyse des inkorporierten Fremdmaterials mit Immunschwäche und charakteristischer Granulombildung [78].

1.7.3 Luminometrie

Die Luminometrie zählt zu den photometrischen Methoden. Entsteht bei einer chemischen Reaktion ein Produkt in angeregtem Elektronenzustand, so wird bei Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand meßbares Licht (Chemilumineszenz, CL) ausgesendet [92]. Als lumineszierende Stoffe werden sogenannte CL-Substrate eingesetzt, hierzu zählen das Coelenterazin und das Lucigenin.

Lucigenin-vermittelte CL

Lucigenin liegt als zweiwertiges Kation (Luc^{2+}) vor und wird durch Reduktion in das Lucigeninradikal ($\bullet\text{Luc}^+$) umgewandelt:



Eine weitere Reduktion des $\bullet\text{Luc}^+$ führt zum instabilen Dioxetan. Beim Nachweis von $\bullet\text{O}_2^-$ übernehmen diese die Funktion des Reduktionsmittels für das $\bullet\text{Luc}^+$. Dioxetan zerfällt in 2 Moleküle N-Methylacridon, wobei sich eines davon in angeregtem Zustand befindet. Kehrt dieses in den Grundzustand zurück, wird ein luminometrisch meßbares Photon ausgesendet [16]:



Lucigenin gilt als sensitiver und spezifischer Detektor für $\bullet\text{O}_2^-$ [24]. In den letzten Jahren ist seine Verwendung jedoch in die Kritik geraten. Grund hierfür ist die Möglichkeit der artifiziellen $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung durch Lucigenin selbst [3, 45, 46, 87].

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob Lucigenin bei Einsatz als $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor unter den hier gegebenen Bedingungen (Vermessung von $\bullet\text{O}_2^-$ -bildenden Systemen wie XO/X) zu einer artifiziellen $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung führen kann.

Coelenterazin-vermittelte CL

Coelenterazin ist ein biolumineszentes Protein der Qualle *Aequora victoria*. Es wurde ursprünglich als Kalziumindikator eingesetzt, gewinnt aber auf Grund seiner hohen Sensitivität für den ROS-Nachweis zunehmend an Bedeutung. Das membranpermeable Coelenterazin wird durch $\bullet\text{O}_2^-$ unter Emission von luminometrisch meßbaren blauen Licht zum Coelenteramid oxidiert. Neben $\bullet\text{O}_2^-$ kann durch Coelenterazin auch Peroxynitrit detektiert werden [48, 61, 79].

1.7.4 Polarographie

Die Polarographie stellt eine indirekte quantitative Nachweismethode für H_2O_2 dar. Die Konzentration des durch Katalase freigesetzten O_2 ist dabei nach Gleichung 10 halb so groß wie die Konzentration des ursprünglich vorhandenen H_2O_2 [25]. Durch die Verwendung der Polarographie ist es möglich, die Wirkung von Enzyminhibitoren zu untersuchen, die sonst mit den verschiedenen Detektormolekülen interagieren könnten [35]. Weiterhin erlaubt der Vergleich des gemessenen Sauerstoffverbrauchs mit der Menge an direkt detektierten ROS eine Bewertung der verwendeten Nachweismethoden in Hinblick auf eine artifizielle ROS-Bildung.

1.7.5 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine der sensitivsten Möglichkeiten zum Nachweis von Radikalen. Diese sind durch ihre ungepaarten Außenelektronen paramagnetisch, d.h. sie besitzen ein magnetisches Moment. Die Elektronen weisen neben ihrer Ladung auch einen Eigendrehimpuls (Spin) auf. Dadurch können sie in einem Magnetfeld in zwei Zuständen bestehen: parallel zum Feld auf einem niedrigeren Energieniveau oder antiparallel auf einem höheren Energieniveau. Für den Übergang vom niedrigeren zum höheren Energieniveau muß Energie in Form elektromagnetischer Wellen (Mikrowellen) zugeführt werden. Diese kehren den Spin der Elektronen um, wenn sie mit der nötigen Energie in Resonanz stehen. Praktisch wird die zu untersuchende Probe mit einer konstanten Mikrowellenfrequenz bestrahlt und die angelegte magnetische Feldstärke B_0 verändert. Bei Resonanz entsteht ein Absorptionssignal der Mikrowellen mit einem Peak im ESR-Spektrum. In diesem wird somit die Absorption der eingestrahlten Energie gegen die jeweilige Feldstärke B_0 aufgetragen. Das aufgezeichnete Spektrum ist charakteristisch für das jeweilige Radikal, entspricht jedoch der 1. Ableitung des eigentlichen Signals. Eine Quantifizierung ist durch 2malige Flächenintegration und den Vergleich mit einem Standard, der eine bekannte Spinzahl (1 Spin = 1 Molekül) besitzt, möglich. Instabile, kurzlebige Radikale wie z.B. $\bullet\text{O}_2^-$ und $\bullet\text{OH}$ können mit sog. *spin traps* stabilere, für das jeweilige Radikal spezifische Addukte bilden und sind somit der Detektion zugänglich. In dieser Arbeit wurden hierfür die Verbindungen 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) und 5-Diethoxy-Phosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DEPMPO) verwendet [17, 18].

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll das Reaktionsverhalten der Xanthinoxidase (XO) charakterisiert werden, um ein Grundlagenverständnis für die komplexe Chemie der Sauerstoffradikale und deren Nachweismöglichkeiten zu erhalten.

Die XO kann aus einer Vielzahl von Quellen durch unterschiedliche Präparationsmethoden isoliert werden. Da sich daraus differente Meßergebnisse und Fehlinterpretationen ergeben können, sollen in dieser Studie XO verschiedener Herkunft in Bezug auf gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verglichen werden. Verwendet werden dabei Enzyme aus Buttermilch und von Mikroorganismen.

Die XO katalysiert eine stöchiometrisch genau definierte Reaktion. Dadurch ist die Anwendung verschiedener Nachweisverfahren für ROS und eine Korrelation der Ergebnisse mit den grundlegenden Reaktionsparametern der XO-Reaktion möglich. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit besteht folglich in der Beurteilung der verwendeten Meßmethoden.

Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen nun auf die membrangebundene NAD(P)H-Oxidase von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) angewendet werden. Es soll eine Charakterisierung des Enzyms hinsichtlich der generierten ROS und der Nachweis der möglichen funktionellen Stimulierbarkeit durch das Hormon Endothelin-1 erfolgen.

Folgende Vorhaben lassen sich definieren:

- Charakterisierung des allgemeinen Reaktionsverhaltens der Xanthinoxidase
 - Vergleich des Reaktionsverhaltens von XO aus Buttermilch und Mikroorganismen
- Beschreibung und Beurteilung der verwendeten Detektionssysteme
 - Luminometrie: Lucigenin- bzw. Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz
 - Spektralphotometrie: Cytochrom c- und NBT-Reduktion
 - Polarographie
 - ESR-Spektroskopie: Verwendung der *spin traps* DMPO und DEPMPO
- Charakterisierung der NAD(P)H-Oxidase in HUVEC
 - Nachweis der funktionellen Stimulierbarkeit durch Endothelin-1

3 Material und Methodik

3.1 Chemikalien

Xanthinoxidase aus Buttermilch (XO_{bm} , Grad I), Xanthinoxidase von Mikroorganismen (XO_{mo} , lyophilisiertes Pulver mit BSA und Glutamat als Stabilisatoren), Lucigenin (Bis-N-Methylacridiniumnitrat), Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30 gew.-%ige Lösung in H_2O), Salicylsäure, Nicotinamidadenindinucleotid(-phosphat) [$NAD(P)H$], Eisen(II)-sulfat ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$), Superoxiddismutase (SOD, Lyophilisat aus Rindererythrozyten), Xanthin (X), Allopurinol (ALP), Nitroblautetrazolium (NBT), 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO), Endothelin-1 (ET-1), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$), Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$), Natriumhydroxid (NaOH) und Natriumchlorid (NaCl) sind Produkte der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland. Coelenterazin wurde von Molecular Probes Eugene, Oregon, USA, bezogen, Katalase (KAT, aus Rinderleber) war von ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Deutschland. Cytochrom c (oxidierte Form von Pferdeherzen, salzfrei) und Xanthinoxidase aus Kuhmilch (XO_K) sind Produkte der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland. 5-Diethoxy-Phosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DEPMPO) und Glutathion (reduzierte Form, GSH) wurden von Calbiochem, La Jolla, CA, USA, bezogen. Ethanol (96 % v/v) war von Merck, Darmstadt, Deutschland.

3.2 Herstellen der Stammlösungen

Zur Herstellung der eingesetzten Lösungen wurde pyrogenfreies, bidestilliertes Wasser (Bidest) benutzt. Der Phosphatpuffer nach Sørensen mit einer Stammkonzentration von 66 mM wurde durch Mischen von 82 Teilen einer 66 mM Na_2HPO_4 -Stammlösung und 18 Teilen einer 66 mM KH_2PO_4 -Stammlösung hergestellt. Zum Ausgleich der Osmolarität erfolgte die Zugabe von 54 mM NaCl. Der entstandene PBS-Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4.

Die XO aus Buttermilch wurde unverdünnt als Suspension in 2,3 M Ammoniumsulfat und 1 mM Salicylsäure mit einer Stammaktivität von 25 U/ml eingesetzt. Um Differenzen im Reaktionsverhalten der XO-Präparationen durch Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel zu vermeiden, wurde das XO-Lyophilisat von Mikroorganismen im gleichen Medium suspendiert.

XO aus Kuhmilch, suspendiert in 3,2 M Ammoniumsulfat mit 10 mM EDTA, wurde ebenfalls wie die mikrobielle Präparation unverdünnt eingesetzt. Die Stammaktivitäten betragen auch hier jeweils 25 U/ml. Die 8,5 mM Stammlösungen von Xanthin und Allopurinol wurden durch Lösen in 100 mM NaOH hergestellt.

SOD als Lyophilisat wurde in PBS pH 7,4 mit einer Stammkonzentration von 4 mg/ml gelöst. KAT wurde unverdünnt (Stammaktivität 38000 bzw. 62700 U/ml) eingesetzt. Die Lucigenin-Stammlösung (10 mM) wurde durch Lösen in PBS pH 7,4 hergestellt und lichtgeschützt aufbewahrt. Coelenterazin wurde in stickstoffbegastem Ethanol (96 % v/v) mit einer Stammkonzentration von 1 mM gelöst und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Cytochrom c wurde ebenfalls in PBS pH 7,4 mit einer Stammkonzentration von 1 mM gelöst. Eine 10 mM Stammlösung von NBT wurde durch Lösen in Bidest hergestellt. Die Stammlösungen für DMPO und DEPMPO (1 M bzw. 212 mM in Stickstoff-äquilibriertem PBS pH 7,4) wurden gleichfalls lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. H_2O_2 wurde auf eine Stammkonzentration von 10 mM mit Bidest verdünnt. FeSO_4 wurde ebenfalls in Bidest mit einer Stammkonzentration von 10 mM gelöst.

Die Einwaage der Chemikalien erfolgte auf einer Analysenwaage Typ „870/13“ der Firma Kern, Albstadt-Ebingen, Deutschland. Alle Konzentrationsangaben ohne nähere Erläuterung verstehen sich als Initialkonzentrationen im Reaktionsansatz. Soweit möglich wurden alle Stammlösungen täglich frisch hergestellt und ihre Konzentrationen unter Verwendung der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten spektralphotometrisch kontrolliert.

3.3 Generelle Versuchsanordnung

Die Durchführung der verschiedenen Experimente erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur in PBS pH 7,4 als Reaktionsmedium statt. Das Finalvolumen der Meßansätze betrug 1 ml, bei polarographischen Messungen 1,6 ml und bei ESR-Messungen 350 μl . SOD-Zugaben erfolgten in einer Menge von 40 μg ad 1 ml. KAT wurde in einer Aktivität von 380 bzw. 627 U ad 1 ml hinzugefügt. Abweichende Meßbedingungen für die NAD(P)H-Oxidase in den HUVEC sind gesondert aufgeführt. Um durch den Zusatz von unterschiedlich gelösten Reaktanten eine pH-Verschiebung auszuschließen, wurde nach jeder Messung der pH-Wert mit einem „pH-Meter 765 Calimatic“ der Firma Knick, Berlin, Deutschland, kontrolliert.

3.4 Spektralphotometrische Untersuchungen

Eingesetzt wurde ein Spektralphotometer Typ „DU 640“ der Firma Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA mit Präzisionsküvetten „UV 6040“ aus Quarzglas, Schichtdicke $d = 1$ cm, der Firma Helma, Mühlheim, Deutschland. Unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ läßt sich aus der gemessenen Extinktion E und des jeweiligen stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ die Konzentration c der detektierten Substanz berechnen.

3.4.1 Harnsäure-Bildung und XO-Aktivitätsmessung

Die Bildung der HS läßt sich spektralphotometrisch bei 293 nm verfolgen und über den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{293 \text{ nm}} = 12,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ quantifizieren [34, 38]. Auf Grund der 1:1-Stöchiometrie entspricht der ermittelte Wert der praktisch vorhandenen initialen X-Konzentration. Die Reaktion wurde nach Leerwertregistrierung durch Zugabe von XO zum Ansatz mit $170 \mu\text{M}$ X gestartet. Die Eigenabsorption der XO bei 293 nm ist von der gemessenen Extinktion abgezogen worden. Der Einfluß von Allopurinol (ALP) wurde durch kurzzeitige Inkubation der XO mit $100 \mu\text{M}$ ALP und nachfolgende Zugabe zum X-Ansatz untersucht.

Aus der gebildeten Menge von HS pro Zeiteinheit ergibt sich die eingesetzte Aktivität der XO. Nach der Definition gilt: 1 U XO wandelt $1 \mu\text{mol}$ X zu HS in 1 min bei 25°C und pH 7,5 um. Die eingesetzten XO-Aktivitäten lagen zwischen 6 und 50 mU und wurden vor jeder Verwendung der XO kontrolliert.

Um die Forderung nach einer Substratkonzentration $\approx 10 \cdot K_m$ zu erfüllen, wurden $170 \mu\text{M}$ X eingesetzt und die Konzentration der X-Stammlösung mit $\epsilon_{270 \text{ nm}} = 11,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt [38].

3.4.2 Lucigenin-Einfluß auf die XO-Aktivität

Um eine mögliche Beeinflussung der XO-Aktivität durch Lucigenin festzustellen, wurde die oben beschriebene Aktivitätsmessung mit verschiedenen Lucigenin-Konzentrationen durchgeführt. Im Ansatz befanden sich damit 25 mU XO_{bm} und jeweils 0, 10, 50 bzw. $250 \mu\text{M}$ Lucigenin. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von $170 \mu\text{M}$ X.

3.4.3 Cytochrom c-Reduktion

Die Reduktion von Cytochrom c läßt sich anhand der Extinktionszunahme bei 550 nm verfolgen. Der Meßansatz enthielt 50 μM Cytochrom c (oxidierte Form), 170 μM X und 6-30 mU XO. Die Reaktion wurde nach Leerwertregistrierung mit X oder XO gestartet. Sollte der Einfluß von 40 μg SOD bzw. 380 U KAT untersucht werden, erfolgte die Zugabe vor dem Start der Reaktion. Zur Berechnung der reduzierten Menge an Cytochrom c bzw. der dazu notwendigen $\bullet\text{O}_2^-$ über das Lambert-Beersche Gesetz wurde ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{550\text{ nm}}$ von $21,1\text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ verwendet [15, 96]. Die Darstellung der Absorptionsspektren erfolgte mit 50 μM Cytochrom c, die oxidierte Form wurde dabei durch eine Spatelspitze Natriumdithionit vollständig reduziert. Dadurch war eine Kontrolle der Stammkonzentration möglich.

3.4.4 Lucigenin-Einfluß auf die Cytochrom c-Reduktion

Um den Einfluß von Lucigenin als artifiziellen $\bullet\text{O}_2^-$ -Generator zu untersuchen, wurde der oben beschriebene Cytochrom c-Assay mit der XO_{bm} als $\bullet\text{O}_2^-$ -Quelle und verschiedenen Lucigenin-Konzentrationen durchgeführt. Im Ansatz befanden sich somit 30 mU XO_{bm} , 50 μM Cytochrom c und jeweils 0, 10, 50 bzw. 250 μM Lucigenin. Gestartet wurde durch Zugabe von 170 μM X.

3.4.5 NBT-Reduktion

Die reduktive Umwandlung von Nitroblautetrazolium in den blauen Farbstoff Formazan läßt sich spektralphotometrisch bei 570 nm verfolgen. Im Meßansatz befanden sich 100 μM NBT, 170 μM Xanthin und 6-30 mU XO. Der eventuelle Zusatz von 40 μg SOD erfolgte vor Reaktionsbeginn. Nach Leerwertaufzeichnung wurde durch Zugabe von X bzw. XO gestartet.

Der Einfluß von Allopurinol (ALP) wurde durch kurzzeitige Inkubation der XO mit 100 μM ALP und nachfolgende X-Zugabe untersucht.

3.5 Luminometrie

3.5.1 Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz

Zur Anwendung kam ein Luminometer „LB 9501“ der Firma EG & G Berthold, Wildbad, Deutschland. Als Reaktionsgefäße dienten Plastik-Röhren der Firma Sarstedt, Nürnberg, Deutschland. Bei der Untersuchung zum Einfluß der Lucigeninkonzentration auf das

CL-Signal wurden zwischen 1 und 500 μM Lucigenin eingesetzt. Für den Vergleich der CL-Intensität mit Coelenterazin kamen 10 μM Lucigenin zum Einsatz. Alle weiteren Messungen erfolgten mit 50 μM Lucigenin. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin 6-30 mU XO, 170 μM Xanthin und wahlweise 40 μg SOD. Gestartet wurde durch Zugabe von XO oder X. Die Wirkung von Allopurinol (ALP) wurde durch kurzzeitige Inkubation der XO mit 100 μM ALP und nachfolgende X-Zugabe geprüft. Die Meßwertregistrierung erfolgte in Form von relativen Lichteinheiten pro Sekunde (rLU/s).

3.5.2 Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz

Die Meßbedingungen entsprachen denen des Lucigenin-Assays. Im Ansatz befanden sich 10 μM Coelenterazin, 6 mU XO und 170 μM Xanthin. Die Reaktion wurde durch XO bzw. X gestartet, wahlweise erfolgte die Zugabe von 40 μg SOD.

3.6 Polarographie

3.6.1 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Veränderungen des Sauerstoffgehaltes im Reaktionsansatz ließen sich durch einen Oxygraphen der Firma Oroboros/Anton Paar, Innsbruck, Österreich nachweisen. Dieser ist nach dem Prinzip der Clark-Elektrode aufgebaut. Das Reaktionsvolumen betrug hierbei 1,6 ml. Die Messungen erfolgten in einer luftdicht verschlossenen Kammer unter konstantem Rühren. Eine Nullwertkontrolle wurde durch Hinzufügen von Natriumdithionit, das O_2 quantitativ bindet, durchgeführt. Die Ausgangskonzentration von Sauerstoff entsprach dem bei 25° C luftäquilibrierten Wert von ca. 260 μM .

Der Reaktionsansatz enthielt 30 mU/ml XO und 170 μM Xanthin. Die Zugabe der Reaktanten erfolgte über eine sauerstoffdichte Mikroliterspritze (Innovative Laborsysteme GmbH, Stützerbach, Deutschland). Gestartet wurde die Reaktion mit X bzw. XO nach Stabilisierung des Meßsignals. Der Einfluß von ALP wurde durch kurzzeitige Inkubation der XO mit 100 μM ALP untersucht. Nach vollständigem Substratumsatz wurde die Sauerstofffreisetzung aus akkumuliertem H_2O_2 durch Hinzufügen von 627 U/ml KAT bestimmt.

3.6.2 Lucigenin-Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch

Eine artifizielle $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung durch Lucigenin im XO/X-System muß durch einen zusätzlichen Sauerstoffverbrauch detektierbar sein. Der unter 3.6.1 vorgestellte

Reaktionsansatz enthielt somit zusätzlich Lucigenin-Konzentrationen von jeweils 10, 50 und 250 μM . Als ROS-Quelle diente die XO_{bm} mit einer Aktivität von 30 mU/ml, gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 170 μM X nach Signalstabilisierung.

3.7 ESR-Spektroskopie

ESR-Untersuchungen erfolgten mit ESR-Spektrometern („ERS 220“ bzw. „miniscope ms100“) der Firma Magnettech, Berlin, Deutschland. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 350 μl . Damit wurde eine Quarz-Flachzelle (Spaltbreite 0,3 mm) befüllt, im Spektrometer ausgerichtet und das Spektrum bei 9,53 GHz („ERS 220“) bzw. 9,48 GHz („ms100“) aufgenommen. Als *spin traps* kamen DMPO und DEPMPO zur Anwendung. Zur Positivkontrolle diente eine Spektrenregistrierung von $\bullet\text{OH}$ -Radikalen. Diese wurden durch eine FENTON-Reaktion aus 1 mM H_2O_2 und 200 μM FeSO_4 (bei 12 mM DEPMPO) bzw. 1 mM H_2O_2 und 250 μM FeSO_4 (bei 50 mM DMPO) im Reaktionsmedium Bidest generiert [94].

3.7.1 DEPMPO

DEPMPO-Untersuchungen fanden unter Verwendung des „ERS 220“-Spektrometers statt. Der Meßansatz enthielt 12 mM DEPMPO, 30 mU/ml XO, 170 μM Xanthin und wahlweise 40 $\mu\text{g/ml}$ SOD ad 350 μl PBS. Eine Meßreihe wurde mit 40 mU/ml XO_{bm} und 15 mM H_2O_2 ohne X durchgeführt. Das Spektrum wurde mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Mikrowellenleistung 10 mW, Feldbereich 15 mT, Scan-Zeit 120 s, Modulationsamplitude 0,35 mT, Verstärkung 1.

3.7.2 DMPO

Die XO_{bm} wurde weiterhin mit der *spin trap* DMPO und dem „miniscope ms100“ vermessen. Im Ansatz mit einem Finalvolumen von 350 μl PBS befanden sich hierbei 50 mM DMPO, 50 mU/ml XO und 170 μM X, wahlweise wurden 40 $\mu\text{g/ml}$ SOD bzw. 380 U/ml KAT zugegeben. Die Spektrenregistrierung erfolgte mit den nachstehenden Parametern:
Mikrowellenleistung 75 mW, Feldbereich 10 mT, Scan-Zeit 60 s, Modulationsamplitude 0,1 mT, Verstärkung 500.

3.8 NAD(P)H-Oxidase

Für die Durchführung der Experimente wurden Primärkulturen von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet. Die Zellgewinnung, -kultivierung und Inkubation mit Endothelin-1 (ET-) bzw. Diphenyliodonium (IDP) erfolgte im molekularbiologischen Labor des Institutes für Pathophysiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.8.1 Präparation und Meßverfahren

HUVEC wurden direkt in Pyrex-Glasröhren (Dunn Corp., Asbach, Deutschland) kultiviert. Die ET-1-Inkubation (10 nM) erfolgte über einen Zeitraum von 90 min. Nach Dekantieren des Mediums, vorsichtigem Spülen mit PBS (37 °C) und Wiederauffüllen mit PBS (37 °C) ad 1 ml wurden die Röhrchen sofort in das Luminometer überführt und die Messung nach Zugabe von Coelenterazin (10 µM) gestartet. Somit konnte der Einfluß der Endothelin-1-Inkubation direkt an intakten Zellen gemessen werden. Die Meßwerte sind als relative Lichteinheiten $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein}^{-1}$ ausgedrückt. Nach Meßbeginn wurden NADPH (100 µM) und SOD (40 µg) zugegeben, der Einfluß von IDP (500 µM) wurde durch 90minütige Inkubation der Zellkulturen untersucht.

3.8.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zellpräparation erfolgte mit dem „BCA Protein Assay Reagent“ (Pierce Corp., Rockford, Irland) und wurde im molekularbiologischen Labor des Institutes für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.9 Statistische Auswertung

Alle angegebenen Zahlenwerte verstehen sich als Mittelwerte der Kontroll- bzw. Wiederholungsmessungen \pm Standardfehler des Mittelwertes aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen. Für die statistische Analyse der Daten wurde der Student's *t*-Test verwendet. Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn sich bei der statistischen Analyse eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % ($p < 0,05$) ergab.

4 Ergebnisse

4.1 Reaktionsverhalten der XO_{bm} im Vergleich mit der XO_{mo}

4.1.1 Bestimmung der Harnsäurebildung und Aktivitätsmessung

Die Bildung von Harnsäure (HS) aus Xanthin (X) durch die Xanthinoxidase aus Buttermilch (XO_{bm}) kann spektralphotometrisch bei 293 nm verfolgt werden, ebenso die Abnahme der X-Konzentration bei 274 nm (Abb. 1a). Den zeitlichen Verlauf der Spektrenänderung zeigt Abb. 1b:

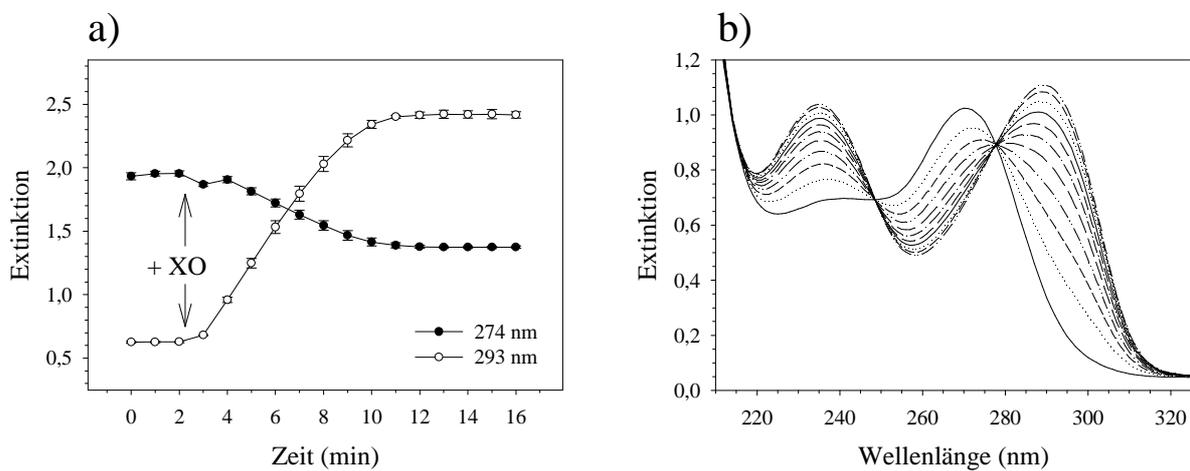


Abbildung 1: Umwandlung von X in HS: a) zeigt die **Abnahme der Extinktion bei 274 nm** als Maß des X-Verbrauches und die gleichzeitige **Zunahme der Extinktion bei 293 nm** als Maß der HS-Bildung. In b) ist der **Zeitverlauf** dieser Umwandlung über einen Wellenlängenbereich von 210 bis 325 nm dargestellt. Ansatz: 10 mU XO_{bm} , 170 μ M X ad 1 ml PBS.

Der Umsatz von X zu HS durch die XO_{bm} erfolgt äquimolar. Die Konzentration von X mit theoretisch eingesetzten 170 μ M wurde so gewählt, daß Sauerstoff als weiteres Substrat mit einer Konzentration von ca. 260 μ M im Überschuß vorliegt. Sobald das X verbraucht ist, muß die HS-Bildung und somit die Extinktionszunahme bei 293 nm zum Stillstand kommen. Dies wird in Abb. 2a durch das Plateau ca. 6 min nach Reaktionsbeginn deutlich (Kontrolle).

Nach Inkubation des XO_{bm} -Ansatzes mit dem Hemmstoff Allopurinol (ALP) und nachfolgender X-Zugabe läßt sich im Vergleich zum Kontrollwert ohne ALP keine Extinktionszunahme und damit keine Umwandlung von X zu HS mehr beobachten.

Unter Verwendung der XO aus Mikroorganismen (XO_{mo}) ist ebenfalls eine der XO_{bm} entsprechende Extinktionszunahme erkennbar (Abb. 2b). Die gemessene Extinktionsänderung $dE_{293\text{ nm}}$ beträgt dabei 1,8278 für XO_{bm} und 1,8219 für XO_{mo} . Daraus errechnet sich eine Konzentration von ca. $150\ \mu\text{M}$ an gebildeter HS. Dieser Wert stimmt weitgehend mit der theoretisch eingesetzten X-Konzentration von $170\ \mu\text{M}$ überein.

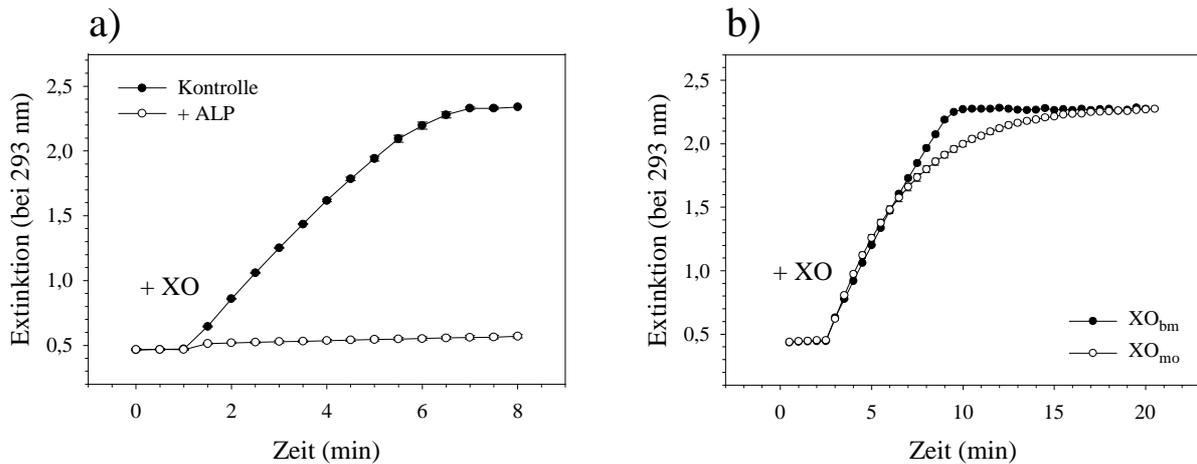


Abbildung 2: Bestimmung der HS-Bildung: a) Einfluß von ALP. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , $170\ \mu\text{M}$ X ad 1 ml PBS, wahlweise $100\ \mu\text{M}$ ALP. b) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} . Ansatz: 25 mU/ml XO_{bm}/XO_{mo} , $170\ \mu\text{M}$ X ad 1 ml PBS.

Die Aktivität des eingesetzten Enzyms ergibt sich aus dem Substratumsatz pro Zeiteinheit. Aus der schon ermittelten X-Konzentration von $150\ \mu\text{M}$, die innerhalb von 8 min umgesetzt wird, läßt sich eine XO-Aktivität von ca. 19 mU berechnen.

4.1.2 Polarographische Messung

Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration durch die XO_{bm}/X -Reaktion läßt sich polarographisch verfolgen. Sie kommt nach vollständigem Umsatz des Substrates X zum Stillstand (Abb. 3a Kontrolle). Nach Inkubation des XO_{bm} -Ansatzes mit ALP und Starten der Reaktion mit X ist kein O_2 -Verbrauch mehr zu beobachten. Weder XO noch X allein im Ansatz führen zu einer meßbaren Signalverringerng.

Die Abb. 3b zeigt im direkten Vergleich das Vermögen beider XO-Präparationen, Sauerstoff zu verbrauchen und hauptsächlich in H_2O_2 umzusetzen. XO-Zugabe zum X-Ansatz bewirkt einem Abfall der Sauerstoffkonzentration um $157,0 \pm 2,4\ \mu\text{M}$ (XO_{bm}) respektive $150,9 \pm 2,9\ \mu\text{M}$ (XO_{mo}). Durch Zugabe von 627 U/ml Katalase (KAT) nach Reaktionsende wird bisher akkumuliertes H_2O_2 in H_2O und O_2 umgewandelt. Es kommt zu

einem sprunghaften Anstieg der Sauerstoffkonzentration um $71,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ bzw. $65,0 \pm 3,3 \mu\text{M}$ O_2 für XO_{bm} bzw. XO_{mo} . Nach Gleichung 10 ergeben sich daraus für das gebildete H_2O_2 Konzentrationen von $143,5 \pm 3,3 \mu\text{M}$ (XO_{bm}) und $129,9 \pm 6,5 \mu\text{M}$ (XO_{mo}). Somit werden ca. 91 % respektive 86 % des verbrauchten O_2 in H_2O_2 umgewandelt.

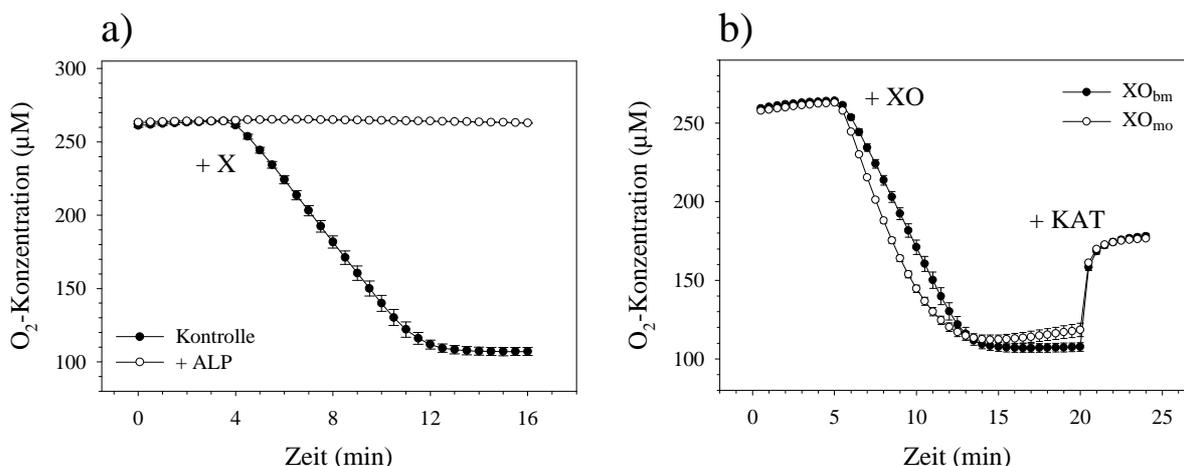


Abbildung 3: Messung des O_2 -Verbrauchs: a) Einfluß von ALP. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 170 μM X ad 1,6 ml PBS, wahlweise 100 μM ALP. b) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} . Ansatz: 30 mU/ml $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{XO}_{\text{mo}}$, 170 μM X ad 1,6 ml PBS, 627 U/ml KAT.

4.1.3 Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz (CL)

Chemiluminometrisch läßt sich unter Verwendung von Lucigenin (Luc) und XO_{bm} ein CL-Signal detektieren, welches nach dem Verbrauch von X zusammenbricht (Abb. 4a Kontrolle). Der Hemmstoff ALP verhindert nach seiner Inkubation mit XO_{bm} jegliche Signalbildung nach X-Zugabe.

Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) zur laufenden Reaktion führt zur sofortigen Auslöschung des CL-Signals. Ebenso verhindert SOD im XO_{bm} -Ansatz jegliche Signalentstehung nach X-Zusatz (Abb. 4b). Mit XO bzw. X allein im Ansatz läßt sich kein Signal detektieren.

Die Abhängigkeit des XO_{bm} -vermittelten Signals von der eingesetzten Lucigeninkonzentration ist in Abb. 4c dargestellt. Es zeigt sich ein annähernd hyperbelförmiger Kurvenverlauf. Ab einer Konzentration von ca. 150 μM ist nur noch eine geringe Steigerung des Signalniveaus zu beobachten. Bei Einsatz von 50 μM Lucigenin ist annähernd die Hälfte der maximalen Signalintensität detektierbar.

Die Abbildung 4d zeigt den direkten Vergleich der CL-Signale beider XO-Präparationen. Mit der XO_{bm} ist ein Signal in Höhe von 37724 ± 3673 rLU/s detektierbar. Nach dem Verbrauch von $170 \mu\text{M}$ Xanthin kommt es zum Zusammenbruch der Chemilumineszenz. Bei Verwendung der XO_{mo} läßt sich nur ein schwaches Signal detektieren, das mit 135 ± 5 rLU/s um den Faktor 300 kleiner als das vergleichbare XO_{bm} -Signal ist.

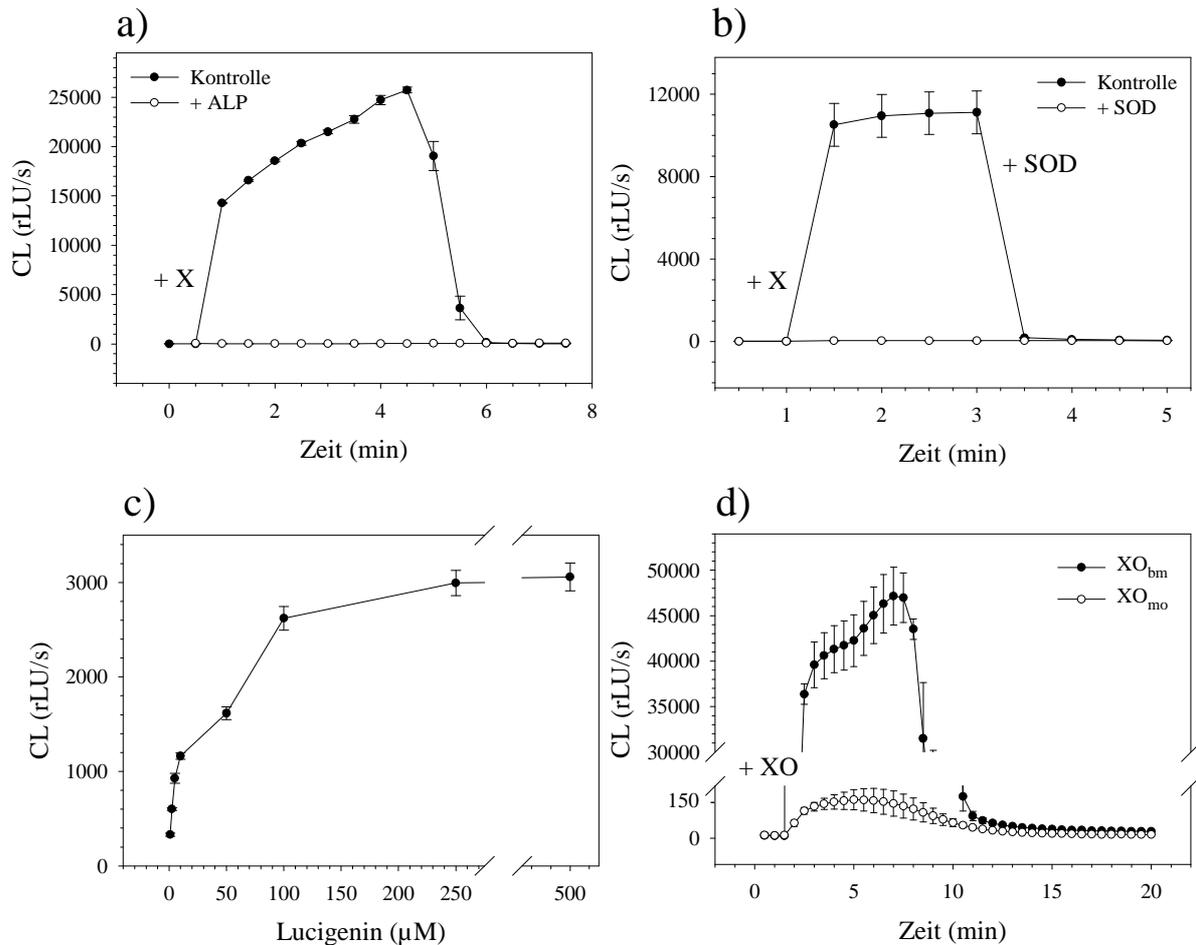


Abbildung 4: Lucigenin-vermittelte CL: a) Einfluß von ALP. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 50 μM Luc, 170 μM X ad 1 ml PBS, wahlweise 100 μM ALP. b) Einfluß von SOD. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 50 μM Luc, 170 μM X, 40 μg SOD ad 1 ml PBS. c) Einfluß der Lucigeninkonzentration. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 170 μM X, 1-250 μM Luc ad 1 ml PBS. d) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} . Ansatz: 25 mU/ml XO_{bm}/XO_{mo} , 50 μM Luc, 170 μM X ad 1 ml PBS.

4.1.4 Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz

Im XO_{bm}/X -System ist mit Coelenterazin (Coel.) ein ca. 25fach höheres CL-Signal im Vergleich zu Lucigenin nachweisbar (Abb. 5a).

Mit der XO_{bm} läßt sich ein Signal in Höhe von 18759 ± 1420 rLU/s generieren, welches sich durch Zugabe von SOD auf 150 ± 9 rLU/s verringert (Abb. 5b).

Bei Einsatz der mikrobiellen XO ist im Vergleich zur XO_{bm} ein um den Faktor 60 geringeres Signal von 309 ± 19 rLU/s detektierbar. Dieses verkleinert sich nach Zusatz von SOD auf 133 ± 1 rLU/s. Mit XO bzw. X allein im Ansatz kann kein Signal gemessen werden.

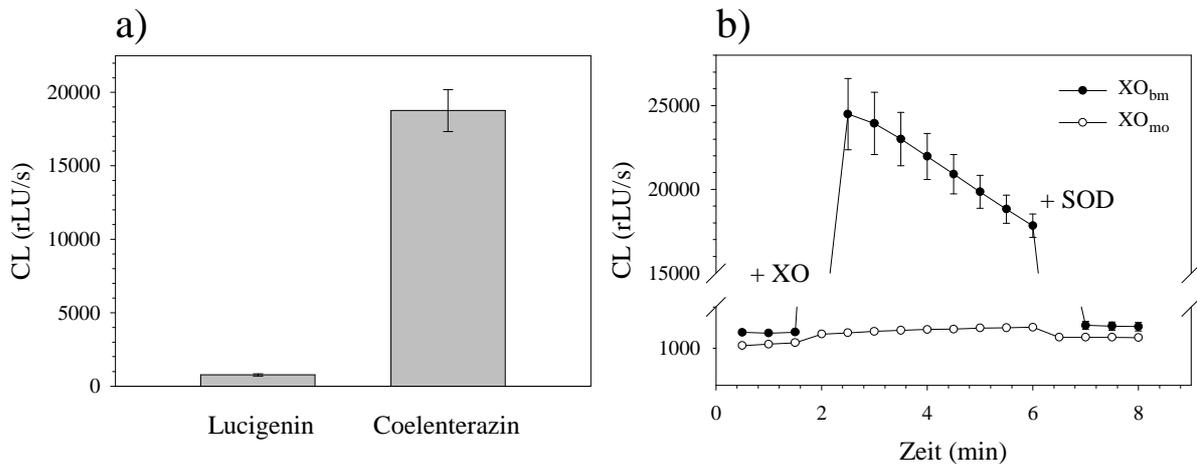


Abbildung 5: Coelenterazin-vermittelte CL. a) Vergleich der CL-Intensitäten von Luc und Coel. Ansatz: 6 mU/ml XO_{bm} , 10 μ M Luc/Coel., 170 μ M X ad 1 ml PBS. **b) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} .** Ansatz: 6 mU/ml XO_{bm}/XO_{mo} , 10 μ M Coel., 170 μ M X ad 1 ml PBS, 40 μ g/ml SOD.

4.1.5 Cytochrom c-Assay

In Abb. 6a sind die unterschiedlichen Spektren der oxidierten und reduzierten Form von Cytochrom c (Cyt. c) als Grundlage des Assays aufgezeichnet.

Die Reduktion von Cytochrom c durch XO_{bm} zeigt Abb. 6b. Zugabe von X zum XO_{bm} -Ansatz führt zu einer Extinktionszunahme, die bei 550 nm verfolgt werden kann. Nach Durchschreiten eines Scheitelpunktes kommt es zu einer Extinktionsabnahme bis unter den Leerwert, die als eine Reoxidation von Cyt. c aufgefaßt werden kann (Kontrolle). SOD verhindert fast vollständig die Extinktionszunahme. Auch hier ist nach dem Scheitelpunkt eine weitere Extinktionsabnahme bis unter den Leerwert zu beobachten. Die Reoxidation von Cytochrom c wird durch KAT komplett verhindert (Abb. 6c).

In der Abb. 6c wird der XO_{bm}/X -Reaktionsansatz mit KAT gezeigt. Die durch SOD hemmbare Extinktionszunahme als Maß der $\bullet O_2^-$ -Generierung beträgt 0,7261. Das entspricht einer Konzentration von reduziertem Cytochrom c bzw. $\bullet O_2^-$ von 34,4 μ M. Bezogen auf die X-Finalkonzentration von 170 μ M werden somit ca. 20 % des

verbrauchten O_2 zu $\bullet O_2^-$ reduziert. Es verbleibt jedoch ein nicht durch SOD hemmbarer Anteil an reduziertem Cytochrom in Höhe von 7%.

Mikrobielle XO im X-Ansatz kann Cytochrom c nicht reduzieren (Abb. 6d). Auch hier ist eine Extinktionsabnahme im Sinne einer Oxidation von Cytochrom c zu beobachten. Diese Abnahme unterschreitet deutlich den Leerwert. KAT verhindert die Oxidation (nicht gezeigt). Mit Xanthin bzw. XO allein im Ansatz kann keine Extinktionsänderung beobachtet werden.

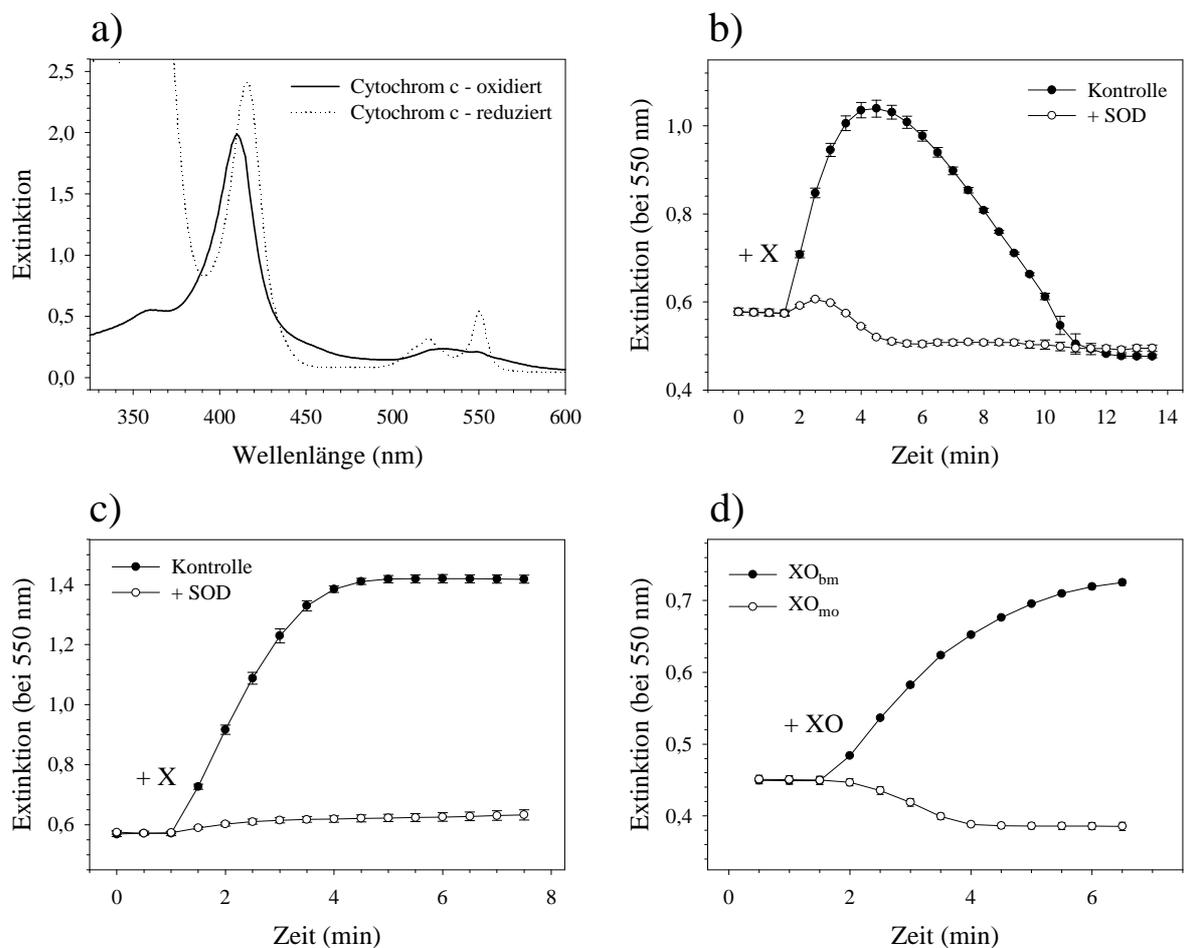


Abbildung 6: Cytochrom-c-Reduktion. a) Darstellung der Absorptionsspektren der oxidierten und der reduzierten Form. Ansatz: 50 μM Cyt. c ad 1 ml PBS, die Reduktion erfolgte durch Zusatz einer Spatelspitze Natriumdithionit. b) Einfluss von SOD. Ansatz: 6 mU/ml XO_{bm} , 50 μM Cyt. c, 170 μM X ad 1 ml PBS, wahlweise 40 $\mu g/ml$ SOD. c) Einfluss von KAT und SOD. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 50 μM Cyt. c, 170 μM X, 380 U/ml KAT ad 1 ml PBS, wahlweise 40 $\mu g/ml$ SOD. d) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} . Ansatz: 6 mU/ml XO_{bm}/XO_{mo} , 50 μM Cyt. c, 170 μM X ad 1 ml PBS.

4.1.6 NBT-Assay

Nitroblautetrazolium (NBT) kann durch $\bullet\text{O}_2^-$ zum blauen Farbstoff Formazan reduziert werden. Unter Verwendung der XO_{bm} zeigt sich eine deutliche Extinktionszunahme bei 570 nm als Maß der Formazanbildung, die nach dem Verbrauch von X zum Stillstand kommt (Abb. 7a Kontrolle). Nach Inkubation des XO_{bm} -Ansatzes mit ALP und Starten der Reaktion mit X ist keine Extinktionsänderung mehr zu beobachten.

SOD im Ansatz verhindert die Formazanbildung nur partiell, es verbleibt ein Anteil von 46 % NBT, der unspezifisch und somit nicht durch $\bullet\text{O}_2^-$ reduziert wird.

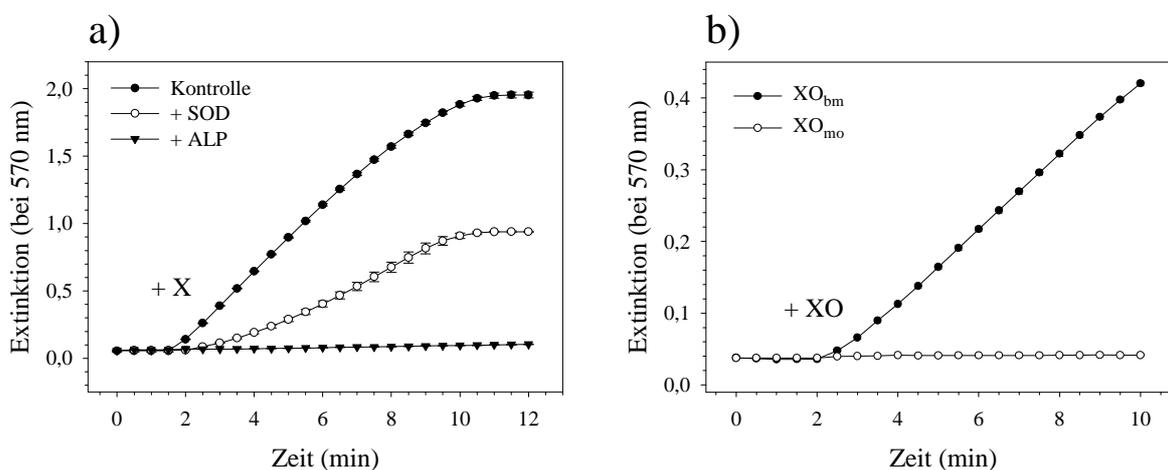


Abbildung 7: NBT-Reduktion: a) Einfluß von SOD und ALP. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 100 μM NBT, 170 μM X ad 1 ml PBS, wahlweise 40 $\mu\text{g/ml}$ SOD bzw. 100 μM ALP. **b) Vergleich der Enzyme XO_{bm} und XO_{mo} .** Ansatz: 6 mU/ml $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{XO}_{\text{mo}}$, 100 μM NBT, 170 μM X ad 1 ml PBS.

Bei Verwendung der XO-Präparation aus Mikroorganismen (Abb. 7b) läßt sich keine NBT-Reduktion bzw. Formazanbildung nachweisen. Weder X noch XO haben allein im Ansatz einen Einfluß auf die Extinktion.

4.1.7 ESR-Spektroskopie

Die mittels FENTON-Reaktion aus H_2O_2 und Fe^{2+} gebildeten $\bullet\text{OH}$ reagieren mit den *spin traps* DEPMPO und DMPO unter Bildung charakteristischer Addukte. Die Spektrenregistrierung der dabei entstehenden DEPMPO-OH- und DMPO-OH-Addukte diente als Positivkontrolle für jeden Meßtag (Abb. 8a, 9a).

Bei Einsatz der *spin trap* DEPMPO kann mit der XO_{bm} ein Mischaddukt, bestehend aus DEPMPO-OOH und DEPMPO-OH, detektiert werden (Abb. 8b). Dessen Entstehung wird

durch SOD vollständig verhindert (Abb. 8c). Durch Zugabe von H_2O_2 zu einem XO_{bm} -Ansatz ohne X läßt sich ebenfalls kein Addukt nachweisen (nicht gezeigt).

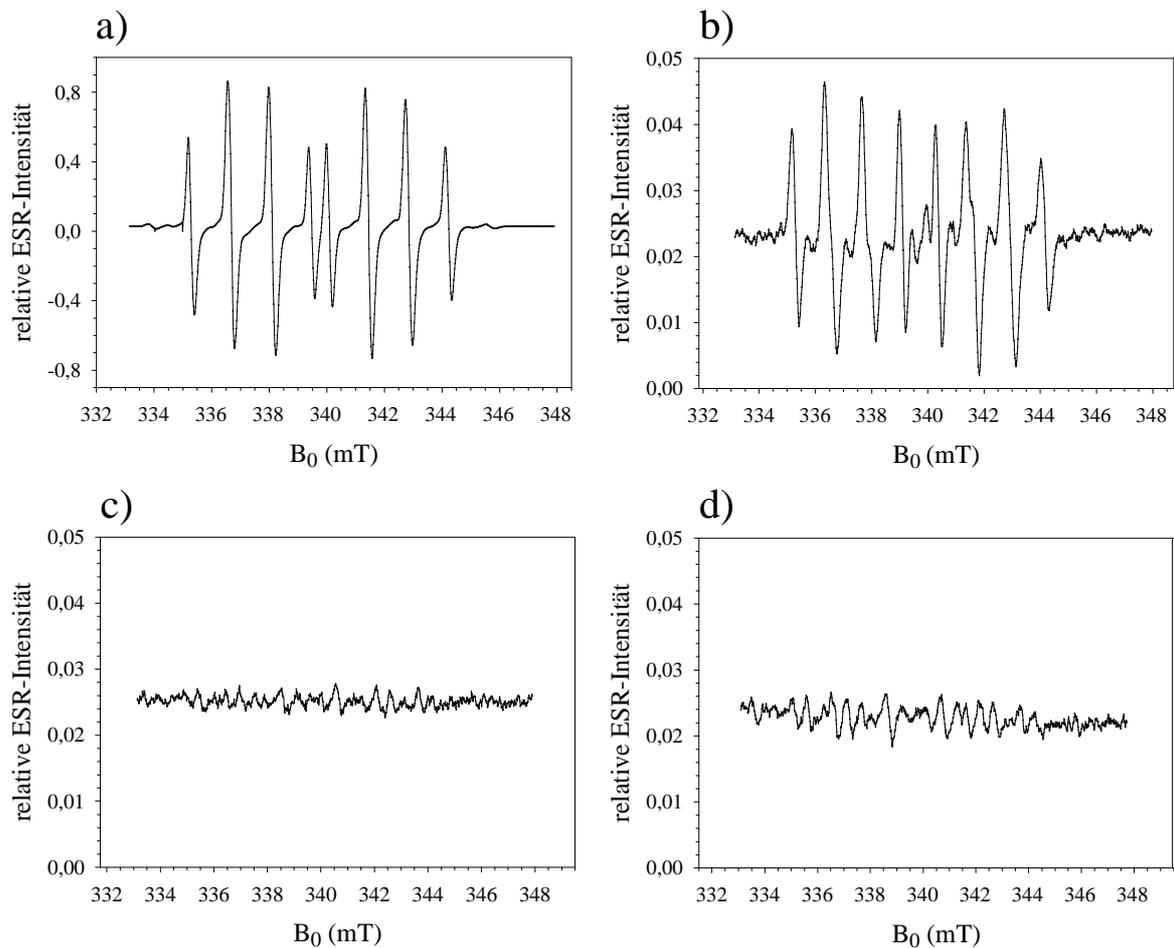


Abbildung 8: ESR-Spektroskopie mit DEPMPO: a) FENTON-vermitteltes DEPMPO-OH-Addukt. Ansatz: 1 mM H_2O_2 , 200 μM FeSO_4 , 12 mM DEPMPO ad 350 μl Bidest. b) DEPMPO-OH-Addukt generiert durch XO_{bm} /X-Reaktion. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 12 mM DEPMPO, 170 μM X ad 350 μl PBS. c) Einfluß von SOD. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm} , 12 mM DEPMPO, 170 μM X, 40 $\mu\text{g/ml}$ SOD ad 350 μl PBS. d) Verwendung der mikrobiellen XO. Ansatz: 30 mU/ml XO_{mo} , 12 mM DEPMPO, 170 μM X ad 350 μl PBS.

Mit der mikrobiellen XO kann kein DEPMPO-Addukt registriert werden (Abb. 8d).

Weitere Untersuchungen erfolgten mit der *spin trap* DMPO und einer neuen Charge XO_{bm} . Hiermit kann ein DMPO-OH-Addukt dargestellt werden, dessen Amplitude durch KAT um 33 % und durch SOD um 70 % vermindert wird (Abb. 9b-d).

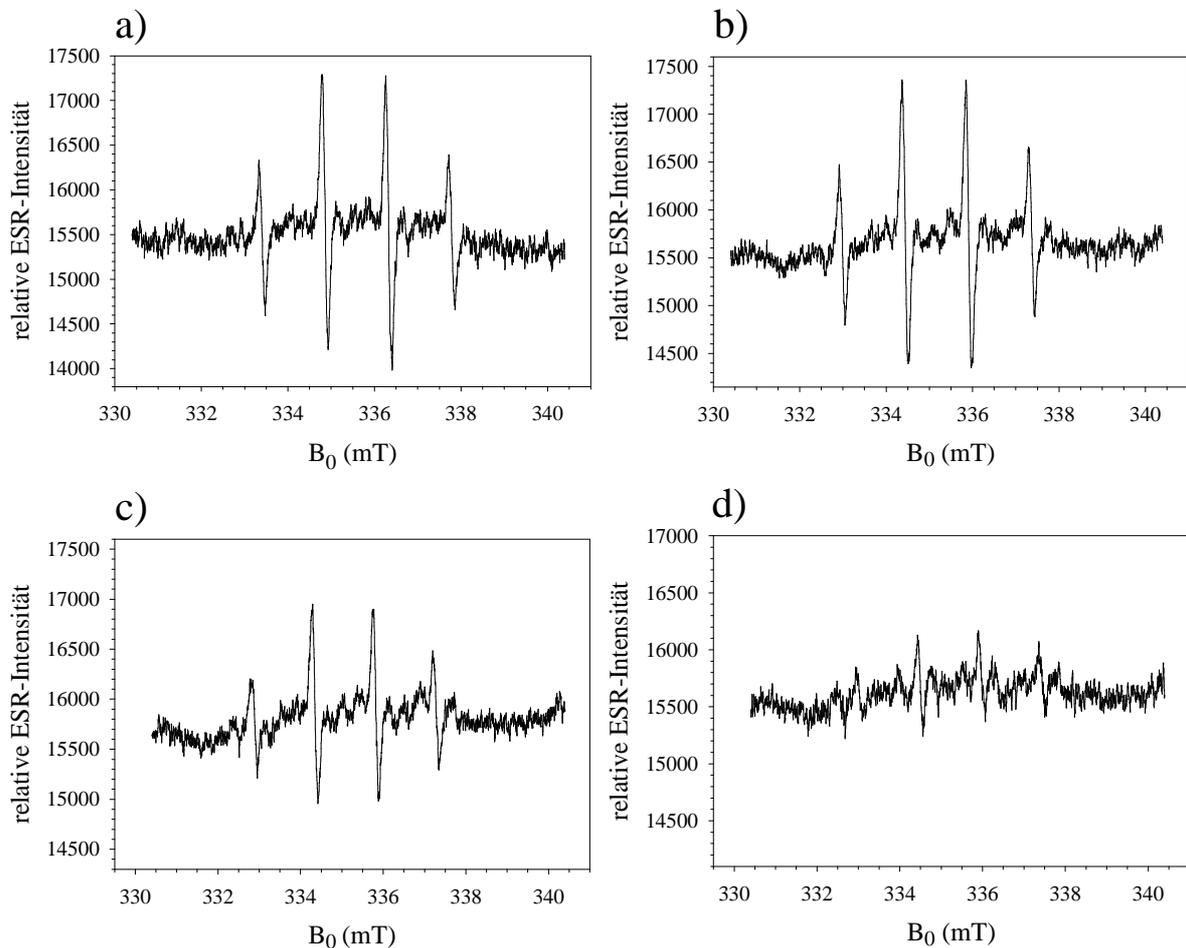


Abbildung 9: ESR-Spektroskopie mit DMPO: a) FENTON-vermitteltes DMPO-OH-Addukt. Ansatz: 1 mM H_2O_2 , 250 μM FeSO_4 , 50 mM DMPO ad 350 μl Bidest. b) DMPO-OH-Addukt durch XO_{bm} /X-Reaktion generiert. Ansatz: 50 mU/ml XO_{bm} , 50 mM DMPO, 170 μM X ad 350 μM PBS. c) Einfluß von KAT. Ansatz: 50 mU/ml XO_{bm} , 50 mM DMPO, 170 μM X, 380 U/ml KAT ad 350 μM PBS. d) Einfluß von SOD. Ansatz: 50 mU/ml XO_{bm} , 50 mM DMPO, 170 μM X, 40 $\mu\text{g/ml}$ SOD ad 350 μM PBS.

4.2 Kontrolluntersuchungen mit XO_{K}

Um auszuschließen, daß die bisherigen unterschiedlichen Meßergebnisse durch einen Präparationsartefakt der Enzyme XO_{bm} bzw. XO_{mo} bedingt sind, wurde eine weitere Milch-XO von einem anderen Hersteller (XO_{K}) auf ihr Reaktionsverhalten untersucht.

Nach Zugabe von XO_{K} zum X-Ansatz kann spektralphotometrisch bei 293 nm eine Extinktionszunahme von 1,9156 verfolgt werden. Über das Lambert-Beersche Gesetz ergibt sich eine Konzentration an gebildeter Harnsäure bzw. umgesetztem Xanthin von 157 μM (nicht gezeigt).

Polarographisch läßt sich ein Sauerstoffverbrauch von $161 \mu\text{M}$ messen. Die Zugabe von KAT führt zur Liberation von $66 \mu\text{M O}_2$. Folglich werden ca. 82 % des verbrauchten Sauerstoffs in H_2O_2 umgewandelt (nicht gezeigt).

Chemiluminometrisch läßt sich mit Lucigenin ein durch SOD vollständig hemmbares Signal in Höhe von $22294 \pm 3951 \text{ rLU/s}$ detektieren (nicht gezeigt).

Mit der *spin trap* DEPMPO kann in der ESR-Spektroskopie ein Mischaddukt aus DEPMPO-OH und DEPMPO-OOH dargestellt werden, dessen Entstehung durch SOD verhindert wird (Abb. 10).

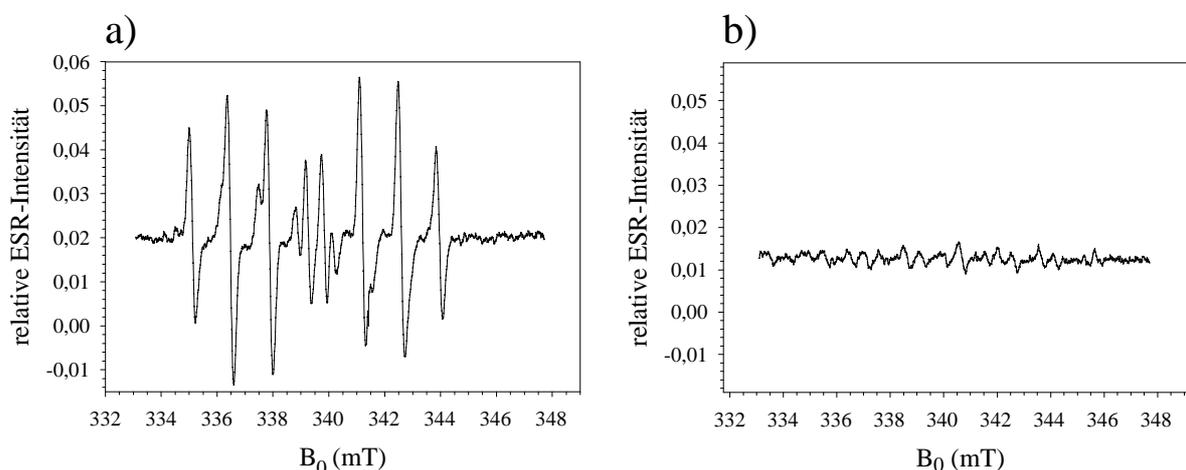


Abbildung 10: ESR-Spektroskopie mit DEPMPO: a) DEPMPO-Addukt durch XO_K/X -Reaktion gebildet. Ansatz: 30 mU/ml XO_K , 12 mM DEPMPO, $170 \mu\text{M X}$ ad $350 \mu\text{l PBS}$. **b) Einfluß von SOD.** Ansatz: 30 mU/ml XO_K , 12 mM DEPMPO, $170 \mu\text{M X}$, $40 \mu\text{g/ml SOD}$ ad $350 \mu\text{l PBS}$.

4.3 Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von Lucigenin

4.3.1 Einfluß von Lucigenin auf die XO-Aktivität

Lucigenin führt zu keiner statistisch signifikanten Beeinflussung der eingesetzten XO-Aktivität (nicht gezeigt).

4.3.2 Einfluß von Lucigenin auf den O_2 -Verbrauch

Wie schon gezeigt, kommt es durch die $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{X}$ -Reaktion zu einem polarographisch meßbaren O_2 -Verbrauch, dessen Gesamtmenge von der X-Konzentration abhängig ist. Mit Lucigenin im Ansatz läßt sich eine signifikante Steigerung der O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit feststellen (Abb. 11a). Diese Steigerung ist proportional

zur eingesetzten Lucigeninkonzentration. Lucigenin bewirkt jedoch keine darüber hinaus gehende signifikante Steigerung des O₂-Gesamtverbrauches (Abb. 11b).

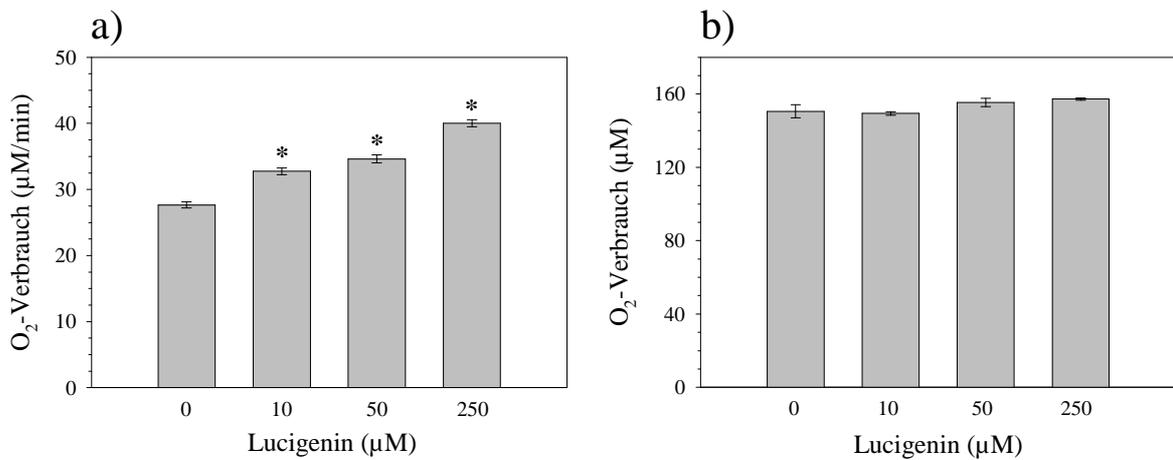


Abbildung 11: Einfluß von Lucigenin auf den O₂-Verbrauch durch XO_{bm}/X-Reaktion:

a) Verbrauchsgeschwindigkeit. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm}, 170 μM X, 0-250 μM Luc ad 1,6 ml PBS.

b) Gesamt-O₂-Verbrauch. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm}, 170 μM X, 0-250 μM Luc ad 1,6 ml PBS.

* - statistische Signifikanz

4.3.3 Einfluß von Lucigenin auf die Cytochrom c-Reduktion

Die durch die XO_{bm} gebildeten $\bullet\text{O}_2^-$ führen zu einer Reduktion von Cytochrom c. Lucigenin im XO_{bm}/X-Ansatz verstärkt signifikant die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Reduktion, und zwar wiederum proportional zur Lucigeninkonzentration (Abb. 12a).

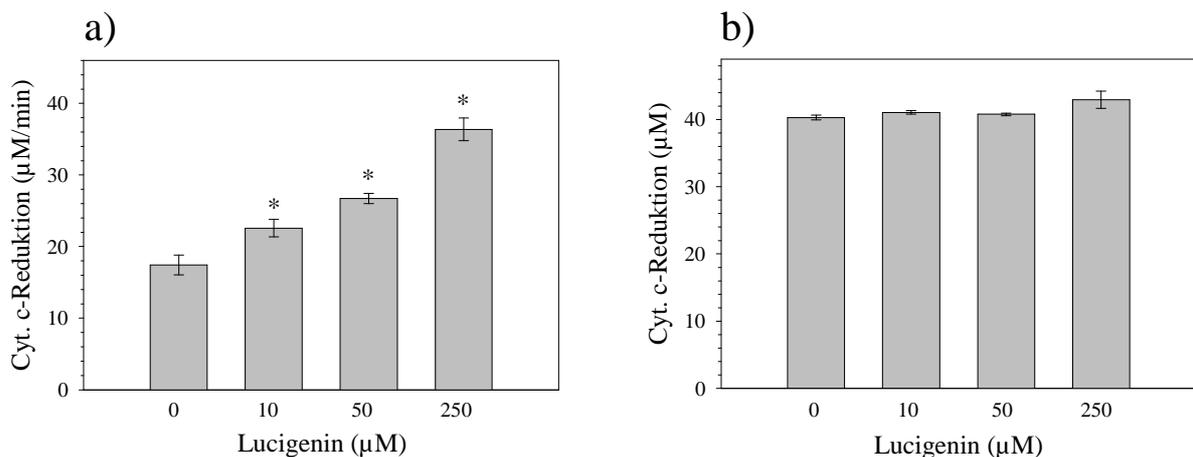


Abbildung 12: Einfluß von Lucigenin auf die XO_{bm}-vermittelte Cytochrom c-Reduktion:

a) Geschwindigkeit der Cyt. c-Reduktion. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm}, 50 μM Cyt.c, 170 μM X, 0-250 μM Luc ad 1 ml PBS.

b) Gesamtkonzentration an reduzierten Cyt. c. Ansatz: 30 mU/ml XO_{bm}, 50 μM Cyt. c, 170 μM X, 0-250 μM Luc ad 1 ml PBS. * - statistische Signifikanz

Lucigenin führt jedoch auch hier zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Gesamtmenge an reduziertem Cytochrom c (Abb. 12b).

4.4 NAD(P)H-Oxidase

4.4.1 Reaktionsverhalten

Die Zugabe von Coelenterazin (Coel.) zu den immobilisierten Endothelzellen (HUVEC) ergibt ein detektierbares CL-Signal von $170 \pm 27 \text{ rLU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein}^{-1}$. Durch Zusatz von NADPH und SOD kommt es zu einer Verringerung des Signals, welche aber statistisch nicht signifikant ist (Abb. 13a). Eine 90minütige Inkubation der Zellen mit dem Flavoenzyminhibitor Diphenyliodonium (IDP, 500 μM) hat keinen Einfluß auf die gemessene CL. Das CL-Signal ist abhängig von der Anwesenheit der Zellen. Mit 50 μM Lucigenin ist keine Signaldetektierung möglich (nicht gezeigt).

4.4.2 Endothelin-1-Stimulierung

Nach einer Inkubation der HUVEC mit Endothelin-1 (ET-1) zeigte sich eine statistisch signifikante CL-Stimulierung um ca. 38 % von $170 \pm 27 \text{ rLU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein}^{-1}$ (Kontrolle) auf $235 \pm 44 \text{ rLU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein}^{-1}$ (Abb. 13b). Die jeweilige Signalverringerng nach Zugabe von NADPH und SOD ist statistisch nicht signifikant. Eine Inkubation des Zellansatzes mit IDP in einer Konzentration von 500 μM für 90 min zeigte keinen Effekt (nicht gezeigt).

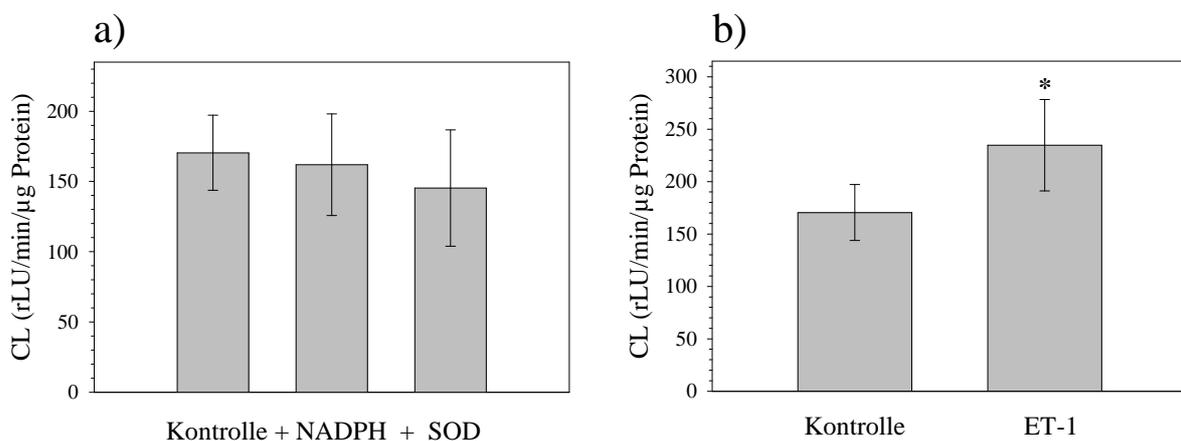


Abbildung 13: Coelenterazin-vermittelte CL in HUVEC: a) Einfluß von NADPH und SOD auf Kontrollwert. Ansatz: 10 μM Coel. ad 1 ml PBS (37 °C) in Glasröhrchen mit HUVEC bewachsen + 100 μM NADPH + 40 μg SOD. b) Einfluß von 90minütiger Inkubation der HUVEC mit 10 nM ET-1. Ansatz: 10 μM Coel. ad 1 ml PBS (37 °C) in Glasröhrchen mit HUVEC bewachsen. * - statistische Signifikanz

5 Diskussion

5.1 Vergleich der XO-Präparationen

Die Xanthinoxidase (XO) ist ein häufig verwendeter *in vitro*-Generator für reaktive Sauerstoffspezies (ROS), der eingesetzt wird, um die komplexen Schädigungsmechanismen der ROS besser deuten zu können. Bei Gebrauch der XO ist eine Bestimmung ihrer Aktivität notwendig. Dabei sollte die Substratkonzentration beim 10fachen des K_m -Wertes liegen. Für Xanthin (X) wurden K_m -Werte zwischen 1,3 μM und 27,9 μM beschrieben [19, 76]. Mit den hier eingesetzten 170 μM X ist diese Bedingung hinreichend erfüllt.

Die Verwendung von Hypoxanthin (HX) als Substrat würde im Vergleich zu X zu einer Verdopplung der ROS-Ausbeute führen:



Dieser Effekt ist aber auf Grund der *in vitro* limitierenden Sauerstoffkonzentration von ca. 260 μM ohne große Bedeutung. Weiterhin wurde bei HX-Konzentrationen größer als 1 mM ein Reaktionsabbruch auf der Stufe von X beobachtet, so daß in dieser Arbeit X als Substrat verwendet wurde [5, 32]. Dadurch werden auch spätere Berechnungen vereinfacht.

Auf Grund der stöchiometrisch genau definierten Reaktion, die durch die XO katalysiert wird, ist ein direkter Rückschluß von der eingesetzten X-Konzentration auf die Konzentrationen des verbrauchten Sauerstoffs (O_2), der gebildeten Harnsäure (HS) und der Superoxidanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) bzw. des Wasserstoffperoxids (H_2O_2) möglich. Da die XO-Reaktion einen Nachweis dieser verschiedenen Substrate bzw. Produkte erlaubt, können somit auch die unterschiedlichen Nachweismethoden quantitativ miteinander verglichen werden.

Bei der Anwendung der verschiedenen Methoden lassen sich im Hinblick auf Konzentrationen, Aktivitäten und Reaktionszeiten Differenzen zwischen den berechneten und den praktisch ermittelten Werten feststellen. Hierfür ist die abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit bei geringeren Substratkonzentrationen verantwortlich, die bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurde. Aus diesem Grund zeigt sich in der

graphischen Darstellung der Ergebnisse, so z.B. bei der HS-Bildung, ein teilweise deutlich asymptotischer Kurvenverlauf.

Zur Verringerung der Meßgenauigkeiten ist eine genaue Konstanthaltung der Reaktionsbedingungen notwendig. Hierzu zählen Temperatur, pH-Wert, Konzentrationen und Aktivitäten der eingesetzten Substanzen bzw. Enzyme. So kann z.B. die Zugabe von Reaktanten in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu einer pH-Verschiebung und damit zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität führen. Durch Einsatz einer pH-Elektrode und einer Temperatursonde war es möglich, diese Bedingungen direkt im Meßansatz zu kontrollieren. Weiterhin wurde durch die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Substanzen versucht, mögliche Fehlerquellen weitgehend zu eliminieren. Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (KAT) sind im Überschuß eingesetzt worden, um eine Limitierung durch unzureichende Aktivität auszuschließen.

Bei der Untersuchung der XO aus Buttermilch (XO_{bm}) läßt sich erwartungsgemäß der Umsatz von X zu HS und der Verbrauch von O_2 beobachten. Das hierbei akkumulierende H_2O_2 wird durch KAT zu Sauerstoff und Wasser dismutiert (Gleichung 10). Die Sauerstofffreisetzung führt zu einem polarographisch meßbaren Signalanstieg, aus dessen Höhe sich die ursprünglich vorhandene H_2O_2 -Konzentration berechnen läßt. Es zeigt sich, daß die XO_{bm} , H_2O_2 und $\bullet O_2^-$ in einem Verhältnis von ca. 91 : 9 bildet.

Nunmehr stand die Detektierung der $\bullet O_2^-$ im Vordergrund. In dieser Arbeit wurden dafür die Lucigenin- und Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz (CL), die Cytochrom c- und die NBT-Reduktion sowie die ESR-Spektroskopie verwendet. SOD führt nach Gleichung 9 zur Dismutation von $\bullet O_2^-$ und verhindert damit deren Interaktion mit den verschiedenen Detektorsubstanzen wie Lucigenin oder Cytochrom c. Die Hemmbarkeit dieser Interaktion und damit der Signalentstehung durch SOD gilt als spezifischer Nachweis für das Vorhandensein von $\bullet O_2^-$ [20, 52].

Chemiluminometrisch läßt sich mit Lucigenin und Coelenterazin ein Signal detektieren, das durch SOD nahezu vollständig hemmbar ist. Daraus läßt sich ableiten, daß sowohl Lucigenin wie auch Coelenterazin spezifisch mit $\bullet O_2^-$ reagieren und nicht durch das ebenfalls entstehende H_2O_2 beeinflußt werden können.

Bei Verwendung der Detektorsubstanzen Cytochrom c (Cyt. c) und Nitroblautetrazolium (NBT) wird eine durch SOD hemmbare Reduktion beobachtet, welche die Fähigkeit der XO_{bm} zur $\bullet O_2^-$ -Bildung zweifelsfrei belegt. Die Quantifizierung dieses SOD-sensitiven Anteils an reduziertem Cyt. c ergibt für die eingesetzte XO_{bm} ein Verhältnis an gebildetem H_2O_2 zu $\bullet O_2^-$ von 80 : 20. Damit werden frühere Ergebnisse aus der Literatur bestätigt [19].

Die XO_{bm} -vermittelte Reduktion von NBT zum Formazan ist nur zu 54 % durch SOD hemmbar. Für einen qualitativen $\bullet O_2^-$ -Nachweis ist dieser Anteil jedoch nicht von Bedeutung.

Der Hemmstoff Allopurinol (ALP) wurde bei der XO_{bm} -vermittelten HS-Generierung, der Polarographie, der Lucigenin-CL und bei der NBT-Reduktion eingesetzt. ALP verhindert nach Inkubation mit der XO_{bm} vollständig das Entstehen von HS und damit auch den Verbrauch von O_2 . Weiterhin ist in Gegenwart von ALP keine Lucigenin-vermittelte CL und keine Formazanbildung mehr zu beobachten. Die ALP-Wirkung ist somit nicht auf ein Abfangen der $\bullet O_2^-$ zurückzuführen, sondern auf eine Hemmung der Aktivität der XO.

Die Reaktion eines Radikals mit einer *spin trap* führt zu einem charakteristischen und weitgehend stabilen, paramagnetischen Addukt, das mit der ESR-Spektroskopie detektierbar ist. So entsteht aus der Interaktion mit $\bullet OH$ das OH-Addukt und aus der Reaktion mit $\bullet O_2^-$ das OOH-Addukt. Es kommt jedoch zu einer Spontanumwandlung des OOH-Adduktes in das OH-Addukt, deren Zeitbedarf abhängig von der eingesetzten *spin trap* ist [17, 18]. Aus der alleinigen Detektierung eines OH-Adduktes darf somit nicht auf eine ursächliche Bildung von $\bullet OH$ geschlossen werden.

Mit der *spin trap* DEPMPO im XO_{bm}/X -Ansatz kann ein Mischaddukt aus DEPMPO-OH und DEPMPO-OOH detektiert werden. Dies könnte als eine gleichzeitige Generierung von $\bullet OH$ und $\bullet O_2^-$ gedeutet werden. Für die XO ist eine direkte Hydroxylradikalgenerierung beschrieben worden, die zu einem DEPMPO-OH-Addukt führen würde [41, 83]. Jedoch konnte dies auf adhärentes Eisen am Enzymprotein zurückgeführt werden, welches mit H_2O_2 über die FENTON-Reaktion zum $\bullet OH$ reagiert [6]. In der hier vorliegenden Arbeit ist die Adduktentstehung vollständig durch SOD hemmbar. Als Quelle für das Mischaddukt kommen daher nur $\bullet O_2^-$ in Frage. Daß jedoch kein reines DEPMPO-OOH-Addukt detektiert werden konnte, ist auf die Spontanumwandlung von DEPMPO-OOH zu DEPMPO-OH zurückzuführen. Die Halbwertszeit von DEPMPO-OOH beträgt zwar ca. 15 min, aber auf Grund der zeitaufwendigen Befüllung und Ausrichtung der Flachzelle im „ESR-220“-Spektrometer erfolgt offenbar schon eine partielle Umwandlung zum OH-Addukt [18].

Sollte eine Enzympräparation adhärentes Eisen aufweisen, so könnte – bei Abwesenheit von X – durch zugegebenes H_2O_2 eine FENTON-Reaktion initiiert und das dabei entstehende $\bullet OH$ detektiert werden [6]. Da ohne Reduktionsmittel für das Eisen faktisch nur ein Reaktionszyklus möglich ist (Gleichung 4), muß eine ausreichend hohe Menge an Eisen vorhanden sein, um ein Addukt detektieren zu können. H_2O_2 wurde deshalb direkt zu

einem DEPMPO/XO_{bm}-Ansatz ohne das Substrat X hinzugefügt. Da sich unter diesen Bedingungen kein Addukt darstellen ließ, kann geschlußfolgert werden, daß adhärentes Eisen in dieser XO-Präparation bedeutungslos ist.

Zusammen mit der *spin trap* DMPO wurde eine weitere Charge XO_{bm} vermessen. Hiermit war ein DMPO-OH-Addukt detektierbar, dessen Amplitude durch KAT um 33 % und durch SOD um 70 % verringert wurde. Daraus läßt sich ableiten, daß am Zustandekommen des DMPO-OH-Adduktes •OH und •O₂⁻ beteiligt sein müssen. Das DMPO-OOH-Addukt konnte auf Grund der kurzen Halbwertszeit von 50 s und der nachfolgenden Umwandlung in das DMPO-OH-Addukt unter den hier gegebenen meßtechnischen Bedingungen nicht detektiert werden [18]. Der durch SOD hemmbare Anteil in Höhe von 70 % bestätigt aber das Vorhandensein von •O₂⁻ als Hauptquelle für das Addukt. Es ist gezeigt worden, daß sich der Gehalt an Eisen bei den verschiedenen XO-Präparationen unterscheidet [6]. Die partielle Hemmbarkeit der Adduktentstehung durch KAT spricht für das Vorhandensein von •OH, die über die FENTON-Reaktion aus H₂O₂ und adhärentem Eisen entstehen müssen. Somit läßt sich hier auf eine XO-Präparation mit höherem Eisengehalt schließen.

Wie schon erläutert, ist die XO ein *in vitro* oft verwendeter Generator für ROS. Bei der Auswahl einer XO kann sich der oben beschriebene Unterschied im Produktspektrum in einer verstärkten Schädigung, z.B. einer durch •OH initiierten *in vitro*-Lipidperoxidation, bemerkbar machen und sollte beim methodischen Aufbau berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden weitere Xanthinoxidasen auf ihr Reaktionsverhalten und ihre Fähigkeit zur ROS-Bildung untersucht. Da die Milchpräparation eines anderen Herstellers (XO_K) ein vergleichbares Verhalten wie die XO_{bm} zeigt, soll im weiteren nun die XO von Mikroorganismen (XO_{mo}) besprochen werden.

Unter identischen Reaktionsbedingungen (gleiche Aktivität und Substratkonzentration) setzt die XO_{mo} ebenfalls X zu HS um und verbraucht dabei erwartungsgemäß O₂. Dieser wurde zu 86 % in H₂O₂ umgewandelt. Die H₂O₂-Bildung durch die XO_{mo} liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die der XO_{bm}.

Zum Nachweis der •O₂⁻ wurden die bei der XO_{bm} etablierten Detektionsmethoden verwendet. Chemiluminometrisch ließ sich unter Verwendung von Lucigenin ein Signal detektieren. Dieses war allerdings um den Faktor 300 geringer als das unter gleichen Bedingungen detektierte XO_{bm}-Signal und somit vernachlässigbar klein. Beim Coelenterazin ließ sich ebenfalls eine Signalentstehung beobachten, welche durch SOD partiell hemmbar war. Doch auch hier war das Signal der XO_{mo} im Vergleich zur XO_{bm} um

den Faktor 60 geringer. Daraus kann abgeleitet werden, daß die chemiluminometrischen Ergebnisse eine der Aktivität entsprechende $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung durch die XO_{mo} ausschließen.

Folgerichtig war die XO_{mo} auch beim Einsatz von Cytochrom c als $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor zu keiner Reduktion von Cyt. c fähig. Selbst eine unspezifische Reduktion, wie sie für die *deflavo*-Form der XO beschrieben wurde, war nicht zu beobachten. Es fand jedoch eine Reoxidation von Cyt. c statt, die durch KAT verhindert wurde. Durch diesen indirekten H_2O_2 -Nachweis ließ sich die polarographisch festgestellte Fähigkeit der XO_{mo} zur H_2O_2 -Bildung bestätigen.

Die XO_{mo} wurde weiterhin mit dem NBT-Assay vermessen. Es zeigte sich, daß die XO_{mo} NBT nicht reduzieren kann. Eine unspezifische Reduktion, wie sie für die *deflavo*-Enzymform bekannt ist, war ebenfalls nicht zu erkennen.

In der Literatur ist eine direkte enzymatische Reduktion von H_2O_2 zum $\bullet\text{OH}$ durch die XO beschrieben worden [41, 83]. Diese $\bullet\text{OH}$ -Bildung konnte später jedoch auf eine Eisenvermittelte FENTON-Reaktion zurückgeführt werden. Als Eisenquelle wurde adhärentes Eisen am Enzymprotein ermittelt [6]. Sollte die XO_{mo} einen hohen Anteil an solch adhärentem Eisen besitzen, könnte dies eine FENTON-Reaktion ermöglichen. Die eventuell von der XO_{mo} gebildeten $\bullet\text{O}_2^-$ wären zur Rückführung von Eisen(III)-Ionen (Fe^{3+}) in Eisen(II)-Ionen (Fe^{2+}) notwendig (Gleichung 5). Das würde die fehlende Nachweisbarkeit der $\bullet\text{O}_2^-$ mit den bisherigen Methoden erklären. Daher wurde die ESR-Spektroskopie mit DEPMPO verwendet. Diese *spin trap* erlaubt auf Grund der höheren Stabilität ihres OOH-Adduktes und der höheren Affinität zum $\bullet\text{O}_2^-$ eine bessere Identifizierung eines möglichen Adduktes. Mit mikrobieller XO ließ sich kein ESR-Signal nachweisen. Eine Eisen-katalysierte $\bullet\text{OH}$ -Generierung ist damit auszuschließen.

Mit diesen verschiedenen Nachweismethoden wurde hinreichend bewiesen, daß die fehlende Möglichkeit der Detektierung der $\bullet\text{O}_2^-$ nicht auf Meßartefakte zurückzuführen ist. Die XO_{mo} ist nicht in der Lage, $\bullet\text{O}_2^-$ zu generieren. Da aber die XO_{mo} nur 86 % des O_2 in H_2O_2 umwandelt, stellt sich die Frage nach dem Verbleib der restlichen 14 % an verbrauchtem O_2 .

Es ist bekannt, daß die XO in verschiedenen Formen existiert. Hierzu zählen die *deflavo*-, die *desulfo*- und die *demolybdo*-Formen. Die *deflavo*- und *desulfo*-Enzyme stellen ein Präparationsartefakt dar, während die *demolybdo*-Form einem natürlich vorkommenden XO-Anteil entspricht [5, 39]. Gemeinsames Merkmal dieser Formen ist jedoch, daß sie gegenüber X keine Aktivität mehr besitzen. Es wäre also keine HS-Generierung zu

erwarten. Da aber die XO_{mo} neben der Harnsäurebildung auch noch Sauerstoff in H_2O_2 umsetzen kann, hat eine solche Form als Hauptbestandteil der XO_{mo} keine Bedeutung. Weitere Untersuchungen zum Reaktionsverhalten der XO_{mo} sind nötig, um die fehlende $\bullet O_2^-$ -Bildung zu erklären.

Für die praktische Verwendung der XO_{mo} ergeben sich daraus Konsequenzen. Wie oben schon genannt, sind die $\bullet O_2^-$ an der Freisetzung von Eisen aus zellulären Eisenspeichern beteiligt und schaffen durch die Regenerierung von Fe^{2+} aus Fe^{3+} die Voraussetzung für eine *in vitro*-Generierung von $\bullet OH$ aus H_2O_2 [55]. Der Einsatz der mikrobiellen XO_{mo} als Modellsystem zur ROS-Bildung ist somit abzulehnen.

5.2 Methodenkritik

Das als Dikation vorliegende Chemilumineszenzsubstrat Lucigenin (Luc^{2+}) steht im Verdacht, selbst zu einer $\bullet O_2^-$ -Bildung fähig zu sein. Nach der aufgestellten These kann das Luc^{2+} nicht durch $\bullet O_2^-$ zum Lucigeninradikal ($\bullet Luc^+$) reduziert werden, sondern nur direkt durch das Enzym (Enz) [45, 46]:



$\bullet Luc^+$ autoxidiert anschließend unter Bildung von $\bullet O_2^-$:



Dieser Mechanismus wurde vor allem bei Enzymsystemen wie Glucoseoxidase/Glucose oder XO/NADH beschrieben, die prinzipiell keine bzw. kaum $\bullet O_2^-$ generieren können [45, 47, 74]. Hierbei sind jedoch so hohe XO-Aktivitäten eingesetzt worden, daß theoretisch auch thermodynamisch ungünstige Reaktionen erzwungen werden können.

Afanas`ev et al. bestätigten später eine mögliche Reduktion von Luc^{2+} durch $\bullet O_2^-$:



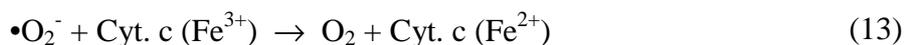
und halten auf Grund von Redoxpotentialmessungen eine Autoxidation von $\bullet Luc^+$ nach Gleichung 19 für eher unwahrscheinlich [2, 61]. Li et al. zeigten ebenfalls, daß diese Autoxidation in $\bullet O_2^-$ -bildenden Systemen wie dem XO/X-System vernachlässigbar gering ist, da $\bullet Luc^+$ zu $\bullet O_2^-$ eine viel höhere Affinität als zum O_2 hat [42]. Infolge der univalenten Elektronenübergänge ist aber auch bei einer direkten Reduktion von Luc^{2+} durch das Enzym (Gleichung 18) eine gleichzeitige enzymatische Reduktion von O_2 nicht möglich.

Gleiches gilt für die $\bullet\text{Luc}^+$ -Autoxidation und die lichtemittierende Reaktion von $\bullet\text{Luc}^+$ und $\bullet\text{O}_2^-$ (Gleichung 16). Eine Autoxidation von $\bullet\text{Luc}^+$ kann damit rein stöchiometrisch keinen Nettoeffekt auf die $\bullet\text{O}_2^-$ -Konzentration haben [2].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Lucigenin auf den Sauerstoffverbrauch und die Cyt. c-Reduktion durch das $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{X}$ -System untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Lucigenin in Konzentrationen von bis zu 250 μM die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs und der Cyt. c-Reduktion steigert. Lucigenin beeinflusst aber weder die Gesamtmenge an verbrauchtem Sauerstoff noch die an reduziertem Cyt. c. McCord und Fridovich interpretieren eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Cyt c-Reduktion als zusätzliche Bildung von $\bullet\text{O}_2^-$, die zur Erhöhung seiner Gleichgewichtskonzentration führt [53]. Das kann jedoch nur für offene Systeme gelten, in denen keine Limitierung der Verfügbarkeit von X bzw. O_2 zu erwarten ist. Die XO_{bm} bildet eine eindeutig quantifizierbare Menge von $\bullet\text{O}_2^-$. Somit muß sich eine zusätzliche Generierung in der detektierbaren Gesamtmenge niederschlagen. Da Lucigenin den Gesamt- O_2 -Verbrauch bzw. die Gesamtkonzentration an reduziertem Cyt. c nicht beeinflusst, ist daher eine zusätzliche $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung durch Lucigenin unwahrscheinlich.

Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der XO-Aktivität durch Lucigenin würde die Beschleunigung der Cyt. c-Reduktion und des O_2 -Verbrauches erklären, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, daß Cyt. c direkt durch $\bullet\text{Luc}^+$ reduziert werden kann [45, 46]. Damit wäre eine Konkurrenz zwischen $\bullet\text{O}_2^-$ und $\bullet\text{Luc}^+$ um die Reaktion mit Cyt. c (Fe^{3+}) denkbar:



Bei einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit von $\bullet\text{Luc}^+$ und Cyt. c (Gleichung 21) im Vergleich zu $\bullet\text{O}_2^-$ und Cyt. c (Gleichung 13) ließe sich die beobachtete Beschleunigung der Cyt. c-Reduktion durch Lucigenin theoretisch erklären. Wie schon erläutert, kann auf Grund der univalenten Reaktion nur jeweils O_2 oder Lucigenin durch das Enzym reduziert werden, so daß es keine Nettozunahme an $\bullet\text{O}_2^-$ geben kann.

Die beobachtete Erhöhung der O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit ist hierbei jedoch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei Verwendung von Lucigenin als $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor ist ein Kompromiß aus möglichst geringer Lucigenin-Konzentration bei ausreichender Signalstärke notwendig. Li et al. konnten bis zu einer Lucigenin-Konzentration von 100 μM keine artifizielle $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung

feststellen [42]. Bei einer initialen Lucigenin-Konzentration von 50 μM ist im $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{X}$ -System ca. die Hälfte der maximal möglichen CL-Signalhöhe detektierbar, so daß deshalb diese Konzentration – analog zu anderen Studien – eingesetzt wurde [58, 59]. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Lucigenin in $\bullet\text{O}_2^-$ -generierenden Systemen wie $\text{XO}_{\text{bm}}/\text{X}$ ein sensitiver $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor ist. Bei unbekannt Systemen, so z.B. in Homogenaten, kann aber die Gefahr des Redoxzyklus von Lucigenin mit artifizieller $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung bestehen. Die Verwendung von Lucigenin als CL-Detektor sollte sich somit nach den zu untersuchenden Systemen richten.

Als weiterer CL-Detektor wurde in dieser Studie Coelenterazin eingesetzt. Das membranpermeable Coelenterazin gilt als sensitiver Detektor für $\bullet\text{O}_2^-$ und ermöglicht weiterhin den Nachweis von Peroxynitrit [61, 79, 82]. Im direkten Vergleich zeigte sich eine 25fach höhere Empfindlichkeit der Coelenterazin-CL gegenüber der Lucigenin-CL. Aus diesen Gründen wurde Coelenterazin für den späteren ROS-Nachweis bei der endothelialen NAD(P)H-Oxidase eingesetzt.

Die Cytochrom c-Reduktion ist ein seit langem etabliertes Nachweisverfahren für $\bullet\text{O}_2^-$. Es wurde berichtet, daß Cytochrom c (Fe^{2+}) durch H_2O_2 oxidiert werden kann [50, 86]. Diese Oxidation ist jedoch nach Auffassung von Turrens et al. auf eine photochemische Zersetzung durch das UV-Licht der Strahlungsquelle zurückzuführen [85]. In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß Cytochrom c (Fe^{2+}) sowohl durch eine H_2O_2 -Stammlösung als auch durch XO/X -generiertes H_2O_2 oxidiert werden kann. Diese Oxidation ist durch KAT hemmbar. Ein photochemischer Artefakt wurde durch Ausschalten der UV-Strahlungsquelle ausgeschlossen. Die Oxidation erfolgt bis unter den Ausgangswert, denn die verwendete oxidierte Form enthält laut Hersteller bis zu 3 % an reduziertem Cyt. c. Da durch das XO/X -System $\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2 gleichzeitig gebildet werden, führt die Reoxidation zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Meßergebnisse und verhindert demzufolge eine genaue Quantifizierung der nachgewiesenen $\bullet\text{O}_2^-$. Bei Systemen mit H_2O_2 -Generierung ist daher die Anwesenheit von KAT im Assay notwendig [50].

Die durch XO_{bm} vermittelte Cytochrom c-Reduktion wurde durch SOD zu 93 % inhibiert. Daraus ergibt sich ein unspezifisch reduzierter Anteil von 7 %. In der Literatur ist die Fähigkeit von *deflavo*-XO beschrieben worden, Cytochrom c direkt reduzieren zu können [39, 46, 52]. Da jede XO-Präparation zu einem bestimmten Anteil die *deflavo*-Form enthält, führt diese hier zu einer direkten Reduktion von Cytochrom c, die durch SOD unbeeinflusst bleibt.

Der Anteil der $\bullet\text{O}_2^-$ am Gesamt- O_2 , der durch die XO_{bm} umgesetzt wurde, schwankt zwischen den polarographisch ermittelten 9 % und den durch die Cytochrom c-Reduktion bestimmten 20 %. Diese Abweichung ist möglicherweise im methodischen Bereich zu sehen. Auf Grund des direkten und durch die SOD-Hemmbarkeit spezifischen $\bullet\text{O}_2^-$ -Nachweises durch die Cytochrom c-Reduktion ergeben sich weniger Meßungenauigkeiten als bei der indirekten Bestimmung über eine KAT-vermittelte O_2 -Freisetzung. Die ermittelten 20 % stimmen ebenfalls mit den Angaben in der Literatur überein [19, 62].

NBT kann durch $\bullet\text{O}_2^-$ zum Formazan reduziert werden. Unter Verwendung der XO_{bm} läßt sich eine Formazanbildung nachweisen, die jedoch nur zu 54 % durch SOD hemmbar ist. H_2O_2 kann als Oxidationsmittel nicht zu einer Reduktion von NBT beitragen. Eine Hemmung der XO mit ALP verhindert die Formazanbildung aus NBT und beweist die enzymvermittelte Reduktion. NBT ist als Substrat für viele Dehydrogenasen und Oxidasen bekannt. Es kann also neben der Interaktion mit $\bullet\text{O}_2^-$ direkt mit O_2 um die Elektronen vom Enzym, v.a. der *deflavo*-XO, konkurrieren [5, 39, 47]. Diese direkte enzymatische Reduktion ist somit nicht durch SOD hemmbar und macht einem Anteil von 46 % aus. Die geringe Spezifität des NBT für $\bullet\text{O}_2^-$ zeigt sich auch in der möglichen Reduktion durch andere Substanzen. Zur vollständigen Reduktion von NBT zum Formazan sind 4 Elektronen notwendig, dabei entsteht als Intermediat das Tetrazolinylnradikal (Gleichung 14). Dieses kann autoxidieren und zu einer artifiziellen $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung führen [28]:



Aus diesen Gründen sollte NBT nicht als $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor verwendet werden.

Wie schon dargestellt wurde, ist die Reduktion von Cytochrom c und NBT keineswegs spezifisch für $\bullet\text{O}_2^-$, sondern kann auch durch Substanzen wie Vitamin C, Glutathion (GSH) oder Natriumdithionit erfolgen [21]. Nur die Hemmbarkeit der Reduktion durch die SOD beweist die Vermittlung durch $\bullet\text{O}_2^-$.

Die ESR-Spektroskopie weist gegenüber den hier genannten Methoden Vorteile auf. Sie erlaubt durch die Adduktbildung eine Qualifizierung und Quantifizierung des Signals. Es ist jedoch zu beachten, daß sich das OOH-Addukt spontan in das OH-Addukt umwandelt. Mit DMPO ist auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit unter den hier gegebenen meßtechnischen Bedingungen kein XO_{bm} /X-vermitteltes OOH-Addukt detektierbar. Unabhängig vom detektierten Addukt beweist jedoch die Hemmbarkeit der Adduktbildung

durch SOD die ursächliche Beteiligung von $\bullet\text{O}_2^-$ [17]. DEPMPO reagiert 1,5fach schneller mit $\bullet\text{O}_2^-$ als das DMPO und das DEPMPO-OOH-Addukt ist mit einer Halbwertszeit von ca. 15 min deutlich stabiler. Zur Detektion von $\bullet\text{O}_2^-$ ist somit das DEPMPO besser geeignet als DMPO [18]. DEPMPO ist weiterhin als 40fach empfindlicherer $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor im Vergleich zu Cytochrom c beschrieben worden [88]. Limitierend kann sich jedoch die Sensitivität des zur Verfügung stehenden ESR-Spektrometers auswirken.

Die Verwendung der SOD erlaubt eine Unterscheidung von Reaktionen, die durch $\bullet\text{O}_2^-$ oder durch andere Substanzen vermittelt werden [20]. Sie sagt jedoch nichts über die Herkunft bzw. Entstehungsquelle der $\bullet\text{O}_2^-$ aus. Neben der direkten Bildung durch Enzyme können $\bullet\text{O}_2^-$ durch die schon beschriebenen Mechanismen des Redoxzyklus von Detektormolekülen wie Lucigenin und NBT entstehen. Wie gezeigt werden konnte, ist dieser Effekt bei etablierten ROS-generierenden Enzymsystemen wie Milch-XO/X nur von untergeordneter Bedeutung. Unter bestimmten Bedingungen, so z.B. in Gewebehomogenaten, kann es jedoch zu einer artifiziellen, durch SOD hemmbaren $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung kommen. Daraus darf nicht ohne weiteres auf das Vorhandensein von $\bullet\text{O}_2^-$ -generierenden Enzymen geschlossen werden.

Auf Grund der vielfältigen Interaktionen und der Komplexität der Radikalchemie ist nur eine sinnvolle Kombination der hier vorgestellten Detektionsverfahren ein sicherer Weg, um meßtechnische Artefakte auszuschließen.

5.3 NAD(P)H-Oxidase

Die endotheliale NAD(P)H-Oxidase gilt als Hauptbildner für vaskuläre $\bullet\text{O}_2^-$ und unterliegt vielfältigen Regulationen [22, 57, 58]. Zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose zählen die Angiotensin-II-vermittelte Hypertonie und die Hypercholesterinämie [60, 66, 96]. Es ist bekannt, daß Angiotensin-II und oxLDL zu einer Expressionserhöhung der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} führen und dadurch eine verstärkte Generierung von $\bullet\text{O}_2^-$ bewirken [72, 73]. Angiotensin-II führt weiterhin zu erhöhten Plasmaspiegeln von Endothelin-1 (ET-1), welches zu den potentesten Vasokonstriktoren gehört [56, 63, 77].

Für ET-1 konnte ebenfalls eine Stimulierung der gp91^{phox}-Expression in Endothelzellen nachgewiesen werden [14]. In diesem Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob dies auch mit einer funktionellen Erhöhung der $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung durch die NAD(P)H-Oxidase in humanen Endothelzellen (HUVEC) assoziiert ist.

Auf Grund der in den XO-Untersuchungen festgestellten hohen Sensitivität wurde der Coelenterazin-CL-Assay zur Charakterisierung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase verwendet. Das membranpermeable Coelenterazin ist als geeigneter Detektor für vaskuläre $\bullet\text{O}_2^-$ bekannt, der selbst nicht zur Radikalgenerierung beitragen kann [48, 82].

Nach ET-1-Inkubation der HUVEC konnte eine Erhöhung der CL-Ausbeute um 38 % gegenüber dem Kontrollwert nachgewiesen werden. Zur Qualifizierung dieses CL-Signals wurden Diphenyliodonium (IDP), SOD und NADPH verwendet. Die Substratspezifität der vaskulären NAD(P)H-Oxidase gegenüber NADH oder NADPH wird kontrovers diskutiert, so daß hier das Substrat der phagozytären NADPH-Oxidase eingesetzt wurde.

Das gemessene Signal ist jedoch durch keine der Substanzen signifikant beeinflussbar. Da NADPH die Zellmembran in der Regel nicht frei permeieren kann und mit intakten Zellen gearbeitet wurde, ist das Nichtansprechen des Signals auf NADPH-Zugabe möglicherweise ein guter Marker für die Integrität der Zellen [43].

Die Lokalisation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase wird – analog zum phagozytären Enzym – als membranständig mit nach extrazellulär gerichteter $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung angenommen. In der Literatur ist jedoch auch eine intrazelluläre bzw. mikrosomale Lage [23, 49, 59] beschrieben worden.

Bedingt durch die lipophilen Eigenschaften von Coelenterazin können im hier verwendeten Ansatz auch intrazellulär gebildete Radikale nachgewiesen werden. Auf Grund der fehlenden Beeinflussung durch die Hemmstoffe kann als Hauptquelle des detektierten CL-Signals ein intrazelluläres Enzym angenommen werden. SOD kann infolge der Molekülgröße nicht in die Zelle gelangen. IDP ist eine polare Substanz und somit nicht in ausreichendem Maße intrazellulär verfügbar.

Neben der NAD(P)H-Oxidase können andere zelluläre ROS-Bildner als Ursache für das detektierte CL-Signal keinesfalls ausgeschlossen werden. Die XO ist jedoch als ROS-Generator in Endothelzellen von untergeordneter Bedeutung [67]. Eine „entkoppelte“ eNOS kann unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. L-Arginin-Mangel, ebenfalls $\bullet\text{O}_2^-$ bilden. Da die CL-Messungen aber direkt im Zellkulturansatz ohne aufwendige bzw. unphysiologische Präparationsschritte stattfanden, können diese Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden [88, 93]. Eine mögliche Reaktion der $\bullet\text{O}_2^-$ mit $\bullet\text{NO}$ zum OHOO^- kann durch Coelenterazin ebenfalls detektiert werden, und auch hier wäre die Höhe des detektierten Signals von der $\bullet\text{O}_2^-$ -Konzentration abhängig.

Zusammenfassend läßt sich die Hypothese aufstellen, daß eine NAD(P)H-Oxidase die Hauptquelle für die ET-1-stimulierbare $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung in HUVEC ist. Dies wird durch nachfolgende Punkte bestärkt:

- das gp91^{phox}-enthaltende Enzym gilt als wichtigster Generator für endotheliale $\bullet\text{O}_2^-$ [22, 60].
- Weiterhin ist durch ET-1 eine Expressionsstimulation der Untereinheit gp91^{phox} nachgewiesen worden [14].
- Eine positive Korrelation zwischen der gp91^{phox}-Expression und der $\bullet\text{O}_2^-$ -Generierung in HUVEC konnte durch einen weiteren Stimulus (oxLDL) ebenfalls belegt werden [72].

Die Untereinheit gp91^{phox} könnte hierbei eine limitierende Rolle für die Funktion der endothelialen NAD(P)H-Oxidase übernehmen und zu einer Modulation der Aktivität beitragen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Reaktionsverhalten der Xanthinoxidase verschiedener Herkunft, aus Buttermilch (XO_{bm}) und von Mikroorganismen (XO_{mo}), untersucht. Es konnte erwartungsgemäß festgestellt werden, daß beide Enzyme Xanthin (X) in Harnsäure (HS) umwandeln und dabei Sauerstoff verbrauchen. Die Enzyme reduzieren ca. 80 % des verbrauchten O_2 zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die XO_{bm} generiert ein Lucigenin- bzw. Coelenterazin-vermitteltes Chemilumineszenzsignal, reduziert Cytochrom c und Nitroblautetrazolium (NBT) und ist in der Lage, mit DEPMPO und DMPO ein Addukt zu bilden. All diese Effekte sind durch Superoxiddismutase (SOD) hemmbar und bestätigen das Vermögen der XO_{bm} , neben H_2O_2 auch Superoxidanionen ($\bullet O_2^-$) zu bilden. Unter Verwendung der XO_{mo} und den oben genannten Nachweismethoden lassen sich jedoch keine $\bullet O_2^-$ nachweisen. Bei der Auswahl einer Xanthinoxidase als *in vitro*-Generator für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist daher hinsichtlich möglicher Fehlinterpretationen Vorsicht geboten.

Weiterhin erfolgte in dieser Arbeit eine methodenkritische Untersuchung der zur Detektion von $\bullet O_2^-$ verwendeten Meßsysteme am Beispiel der XO. Der Einsatz des Chemilumineszenzsubstrates Lucigenin wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Im hier verwendeten Ansatz zeigte sich bis zu einer Initialkonzentration von 250 μM Lucigenin keine artifizielle Radikalgenerierung. Die Sensitivität von Coelenterazin liegt im Vergleich zu Lucigenin um den Faktor 25 höher, so daß sich auch schwache zelluläre Signale wie das der endothelialen NAD(P)H-Oxidase detektieren lassen. Die Cytochrom c-Reduktion erlaubt als Nachweismethode für $\bullet O_2^-$ eine genaue Quantifizierung. Bei Vermessung der XO_{bm} konnte beobachtet werden, daß durch das ebenfalls gebildete H_2O_2 eine Reoxidation von Cytochrom c erfolgte. Diese wurde durch Katalase verhindert. Bei Einsatz von Cytochrom c zur $\bullet O_2^-$ -Detektierung in Systemen, die zusätzlich auch H_2O_2 bilden, kann dieser Effekt eine Verfälschung der Meßergebnisse zur Folge haben. NBT wird ebenfalls durch $\bullet O_2^-$ zum Formazan reduziert. Diese Reduktion war jedoch im hier verwendeten Meßansatz nur zu 54 % durch SOD hemmbar. Folglich sollte NBT nicht als Detektor für $\bullet O_2^-$ genutzt werden.

Die bisher genannten Methoden sind nicht spezifisch für $\bullet O_2^-$, sondern können durch eine Vielzahl verschiedener Stoffe beeinflusst werden. Daher liefert nur die Hemmbarkeit der

Nachweisreaktion durch SOD und der Einsatz mehrerer Methoden einen sicheren Hinweis auf die ursächliche Beteiligung von $\bullet\text{O}_2^-$.

Die anhand des Modellenzym XO gewonnenen methodischen Erkenntnisse wurden zur Charakterisierung der NAD(P)H-Oxidase von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) angewendet. Chemiluminometrisch konnte mit Coelenterazin eine Stimulierung der ROS-Generierung um 38 % durch das Peptid Endothelin-1 (ET-1) festgestellt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der nachgewiesenen Steigerung der mRNA-Expression von gp91^{phox}, einer membrangebundenen Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, durch ET-1-Inkubation und läßt als Interpretationsansatz eine Rolle von gp91^{phox} als limitierenden Faktor der ROS-Generierung zu.

7 Literaturverzeichnis

1. Aebi HE: Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M (eds): Methods of enzymatic analysis. VHC Verlag, Weinheim, 1987, pp. 273-286
2. Afanas`ev IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal`chik EV, Korkina LG: Direct enzymatic reduction of lucigenin decreases lucigenin-amplified chemiluminescence produced by superoxide anion. *Luminescence* 16 (2001) 305-307
3. Barbacanne MA, Souchard JP, Darblade B, Iliou JP, Nepveu F, Pipy B, Bayard F, Arnal JF: Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, esr, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol Med* 29 (2000) 388-396
4. Bolann BJ, Ulvik RJ: Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem J* 243 (1987) 55-59
5. Bray RC: Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: Boyer PD (ed): *The Enzymes*. Academic Press, New York, 1975, pp. 299-419
6. Britigan BE, Pou S, Rosen GM, Lilleg DM, Buettner GR: Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J Biol Chem* 265 (1990) 17533-17538
7. Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z: Der postischämische Reperfusionsschaden. *Urologe [A]* 41 (2002) 159-163
8. Burkitt MJ, Gilbert BC: Modell studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic Res Commun* 10 (1990) 265-280
9. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58 (1989) 79-110
10. Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Circ Res* 87 (2000) 840-844
11. Cross AR, Jones OTG: Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1057 (1991) 281-298
12. Czapski G: Reaction of •OH. *Methods Enzymol* 105 (1984) 209-215
13. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18 (2000) 655-673
14. Duerrschmidt N, Wippich N, Goetsch W, Broemme HJ, Morawietz H: Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 269 (2000) 713-717

15. Elferink JGR: Measurement of the metabolic burst in human neutrophils: a comparison between cytochrome c and NBT reduction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 43 (1984) 339-342
16. Faulkner K, Fridovich I: Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\bullet-}$. *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 447-451
17. Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Arch Biochem Biophys* 200 (1980) 1-16
18. Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, Lauricella R, Tordo P: 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline 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) 258-265
19. Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245 (1970) 4053-4057
20. Fridovich I: Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41 (1974) 35-97
21. Fridovich I: Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272 (1997) 18515-18517
22. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 87 (2000) 26-32
23. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86 (2000) 494-501
24. Gyllenhammar H: Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 97 (1987) 209-213
25. Haller T, Ortner M, Gnaiger E: A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Anal Biochem* 218 (1994) 338-342
26. Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186 (1990) 1-85
27. Halliwell B, Gutteridge JMC: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 307 (1992) 108-112
28. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. Third edition Oxford University Press (2000)

29. Hancock JT, Jones OTG: The inhibition by diphenyliodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem J* 242 (1987) 103-107
30. Harrison DG: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100 (1997) 2153-2157
31. Harrison R: Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem Soc Trans* 25 (1997) 786-791
32. Heinz F, Reckel S: Xanthine oxidase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M (eds): *Methods of enzymatic analysis*. VHC Verlag, Weinheim, 1987, pp. 210-216
33. Hippeli S, Elstner EF: Transition metal ion-catalysed oxygen activation during pathogenetic processes. *FEBS Lett* 443 (1999) 1-7
34. Hochstein P, Hatch L, Sevanian A: Uric acid: functions and determination. *Methods Enzymol* 105 (1984) 162-166
35. Jones OTG, Hancock JT: Assays of plasma membrane NADPH oxidase. *Methods Enzymol* 233 (1994) 222-229
36. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OTG: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 271 (1996) H1626-H1634
37. Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OTG: The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 355 (1994) 178-182
38. Kalckar HM: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *J Biol Chem* 167 (1947) 429-443
39. Komai H, Massey V, Palmer G: The preparation and properties of deflavo xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244 (1969) 1692-1700
40. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF: PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59 (1986) 612-619
41. Kuppusamy P, Zweier JL: Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 264 (1989) 9880-9884
42. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA: Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273 (1998) 2015-2023
43. Liersch M, Grotelüschen H, Decker K: Zur Frage der Permeation von NAD in die Leberzelle. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 352 (1971) 267-274

44. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE: Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 258 (1990) F711-F716
45. Liochev SI, Fridovich I: Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 337 (1997) 115-120
46. Liochev SI, Fridovich I: Lucigenin as a mediator of superoxide production: revisited. *Free Radic Biol Med* 25 (1998) 926-928
47. Liochev SI, Fridovich I: Superoxide from glucose oxidase or from nitroblue tetrazolium? *Arch Biochem Biophys* 318 (1995) 408-410
48. Lucas M, Solano F: Coelenterazine is a superoxide anion-sensitive chemiluminescent probe: its usefulness in the assay of respiratory burst in neutrophils. *Anal Biochem* 206 (1992) 273-277
49. Lundqvist H, Follin P, Khalfan L, Dahlgren C: Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *J Leukoc Biol* 59 (1996) 270-279
50. Markert M, Andrews PC, Babior BM: Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol* 105 (1984) 358-365
51. Massey V, Harris CM: Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* 25 (1997) 750-755
52. McCord JM, Fridovich I: Superoxide Dismutase. *J Biol Chem* 244 (1969) 6049-6055
53. McCord JM, Fridovich I: The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243 (1968) 5753-5760
54. Meneghini R: Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23 (1997) 783-792
55. Miller DM, Grover TA, Nayini N, Aust SD: Xanthine oxidase- and iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 301 (1993) 1-7
56. Miyauchi T, Masaki T: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61 (1999) 391-415
57. Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS: NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266 (1994) H2568-H2572
58. Mohazzab-H KM, Wolin MS: Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 267 (1994) L815-L822

59. Mohazzab-H KM, Wolin MS: Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery Po_2 sensor. *Am J Physiol* 267 (1994) L823-L831
60. Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G: Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 285 (2001) 1130-1135
61. Münzel T, Afanas`ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG: Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 1761-1768
62. Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Mizushima J, Hori H, Iwasaki T, Nishino T, Ichimori K, Nakazawa H: Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem Soc Trans* 25 (1997) 783-786
63. Noll G, Wenzel RR, Lüscher TF: Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem* 157 (1996) 259-267
64. Oberley LW: Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5 (1988) 113-124
65. O`Donnell VB, Tew DG, Jones OTG, England PJ: Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290 (1993) 41-49
66. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91 (1993) 2546-2551
67. Paler-Martínez A, Panus PC, Chumley PH, Ryan U, Hardy MM, Freeman BA: Endogenous xanthine oxidase does not significantly contribute to vascular endothelial production of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 311 (1994) 79-85
68. Porter NA: Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105 (1984) 273-282
69. Pryor WA, Squadrito GL: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol* 268 (1995) L699-L722
70. Pryor WA: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48 (1986) 657-667
71. Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem* 118 (1981) 328-335
72. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H: Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation* 104 (2001) 1767-1772

73. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H: Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 1845-1851
74. Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R: NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. *Eur J Biochem* 254 (1997) 541-548
75. Sarnesto A, Linder N, Raivio KO: Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab Invest* 74 (1996) 48-56
76. Saugstad OD: Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 98 (1996) 103-107
77. Schiffrin EL: Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 34 (1999) 876-881
78. Segal AW: The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 2 (1996) 129-135
79. Shimomura O: Membrane permeability of coelenterazine analogues measured with fish eggs. *Biochem J* 326 (1997) 297-298
80. Sies H: Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem* 98 (1986) 1061-1075
81. Sies H: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 275 (1993) 213-219
82. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA: Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. *Circ Res* 84 (1999) 1203-1211
83. Terada LS, Leff JA, Guidot DM, Willingham IR, Repine JE: Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves site-directed hydroxyl radical formation. *Free Radic Biol Med* 10 (1991) 61-68
84. Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17 (1997) 3-8
85. Turrens JF, McCord JM: How relevant is the reoxidation of ferrocyanochrome c by hydrogen peroxide when determining superoxide anion production? *FEBS Lett* 227 (1988) 43-46
86. Vandewalle PL, Petersen NO: Oxidation of reduced cytochrome c by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 210 (1987) 195-198
87. Vásquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard jr. KA, Martásek P, Kalyanaraman B: Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett* 403 (1997) 127-130

88. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H, Tordo P, Pritchard jr. KA: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 9220-9225
89. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. *Circulation* 99 (1999) 2027-2033
90. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML: Renal ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* 83 (1996) 162-170
91. Wippich N, Peschke D, Peschke E, Holtz J, Brömme HJ: Comparison between xanthine oxidases from buttermilk and microorganisms regarding their ability to generate reactive oxygen species. *Int J Mol Med* 7 (2001) 211-216
92. Wulff K: Luminometry. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M (eds): *Methods of enzymatic analysis*. VHC Verlag, Weinheim, 1987, pp. 340-368
93. Xia Y, Zweier JL: Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 6954-6958
94. Yamazaki I, Piette LH: ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe^{2+} ions with H_2O_2 -reactive species in oxygen toxicity in biology. *J Biol Chem* 265 (1990) 13589-13594
95. Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74 (1994) 139-162
96. Zhang H, Schmeißer A, Garlich CD, Plötze K, Damme U, Mügge A, Daniel WG: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 44 (1999) 215-222

8 Thesen

1. Verschiedene Quellen bzw. Präparationsformen eines Enzyms können sich hinsichtlich ihres Produktspektrums unterscheiden. Die Xanthinoxidase (XO) katalysiert die Umwandlung von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure (HS). Dabei wird Sauerstoff verbraucht und zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanionen ($\bullet O_2^-$) in einem Verhältnis von 80 : 20 reduziert. Im Gegensatz zur XO aus Buttermilch vermag die XO aus Mikroorganismen keine $\bullet O_2^-$ zu generieren.
2. In Hinblick auf die häufige Verwendung der XO als *in vitro*-Generator für ROS ist eine genaue Auswahl der Enzympräparation erforderlich. Zur Bildung von Hydroxylradikalen ($\bullet OH$) durch die FENTON-Reaktion sind die $\bullet O_2^-$ als Reduktionsmittel für die entstehenden Eisen(III)-Ionen notwendig. Da die mikrobielle XO keine $\bullet O_2^-$ bilden kann, sollte sie als Schädigungsgenerator nicht eingesetzt werden.
3. Die Verwendung von Lucigenin als Chemilumineszenzvermittler wird auf Grund einer möglichen artifiziellen $\bullet O_2^-$ -Bildung in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine zusätzliche Radikalbildung durch Lucigenin im Buttermilch-XO/X-System sollte sich in einem vermehrten Sauerstoffverbrauch oder in einer verstärkten Reduktion von Cytochrom c bemerkbar machen. Dies konnte nicht gezeigt werden. Somit führt Lucigenin in dem hier verwendeten System nicht zu einer zusätzlichen $\bullet O_2^-$ -Bildung.
4. Die Sensitivität der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz (CL) im Buttermilch-XO/X-System ist im Vergleich zur Lucigenin-CL 25fach höher und ermöglicht somit auch den Nachweis schwacher Signale. Als membranpermeables Detektormolekül für $\bullet O_2^-$ und Peroxynitrit wird Coelenterazin in der Literatur als geeignetes CL-Substrat zur Untersuchung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase empfohlen. Dies konnte durch eigene Befunde bestätigt werden.
5. Cytochrom c kann durch $\bullet O_2^-$ reduziert werden. Es ist als unspezifischer Elektronenakzeptor aber auch durch zahlreiche andere Substanzen wie Vitamin C oder Glutathion reduzierbar. Nur die durch Superoxiddismutase (SOD) hemmbare Reduktion gilt als Maß für detektierte $\bullet O_2^-$. Eine mögliche Reoxidation von Cytochrom c durch H_2O_2 wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Unter Verwendung

der Buttermilch-XO wurde eine Reoxidation durch akkumuliertes H_2O_2 beobachtet, die sich durch Katalase verhindern ließ. Bei Einsatz des Cytochrom c-Assays in Systemen mit H_2O_2 -Bildung ist die Zugabe von Katalase notwendig, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

6. Ebenso wie Cytochrom c kann Nitroblautetrazolium (NBT) neben $\bullet\text{O}_2^-$ durch eine Vielzahl anderer Elektronendonatoren zum Formazan reduziert werden. Es wurde gezeigt, daß die NBT-Reduktion durch das Buttermilch-XO/X-System nur zu 54 % durch SOD hemmbar war. Weiterhin ist in der Literatur die Möglichkeit einer artifiziellen Radikalgenerierung durch NBT beschrieben wurden. Aus diesen Gründen sollte NBT nicht als $\bullet\text{O}_2^-$ -Detektor verwendet werden.
7. Die Hemmbarkeit einer Nachweisreaktion durch SOD gilt als sicherer Nachweis für die ursächliche Beteiligung von $\bullet\text{O}_2^-$. Hieraus kann keine Aussage über den Ursprung der $\bullet\text{O}_2^-$ abgeleitet werden. Unter bestimmten Bedingungen können Enzymsysteme, die selbst keine $\bullet\text{O}_2^-$ generieren, Detektormoleküle wie Lucigenin und NBT direkt reduzieren. Die nachfolgende Autoxidation der Detektorsubstanzen führt dann zur Bildung von $\bullet\text{O}_2^-$. Diese sind in nachgeschalteten Reaktionen durch SOD nachweisbar und täuschen eine enzymvermittelte $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung vor. Die SOD-Wirkung sollte deshalb mit Vorsicht interpretiert werden und durch von Detektorsubstanzen unabhängige Methoden wie die Polarographie differenziert werden.
8. Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine weitere sensitive Nachweismethode für Radikale. Durch Reaktion der in dieser Arbeit verwendeten *spin traps* DMPO und DEPMPO mit dem jeweiligen Radikal entsteht ein Addukt, dessen Form und Größe eine Qualifizierung und Quantifizierung des ursprünglichen Radikals erlaubt. DEPMPO weist im Vergleich mit DMPO eine deutlich höhere Stabilität seines $\bullet\text{O}_2^-$ -Adduktes auf.
9. Nach Endothelin-1-Inkubation von kultivierten humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) läßt sich chemiluminometrisch mit Coelenterazin eine Stimulation der ROS-Generierung nachweisen.
10. Als Ursprung dieser Radikale wird die NAD(P)H-Oxidase angesehen. Dies resultiert einerseits aus der in der Literatur beschriebenen Bedeutung des Enzyms als

Hauptradikalquelle in Endothelzellen. Weiterhin korreliert die hier gemessene Stimulierung der ROS-Bildung mit der mRNA-Expressionserhöhung der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} in HUVEC nach Endothelin-1-Inkubation.

11. Das detektierte CL-Signal wird weder durch den Flavoenzyminhibitor Diphenyliodonium (IDP) noch durch SOD oder NADPH beeinflusst. Dies kann durch eine intrazelluläre Lage der NAD(P)H-Oxidase erklärt werden, die mehrfach in der Literatur beschrieben wurde. Eine Signaldetektierung ist durch das membranpermeable Coelenterazin möglich. Nicht membranpermeable Stoffe wie SOD, NADPH und das polare IDP können keine Wirkung auf das gemessene Signal ausüben.
12. Da eine Erhöhung der mRNA-Expression von gp91^{phox} durch Endothelin-1-Inkubation mit einer vermehrten Radikalgenerierung verbunden ist, kann vermutet werden, daß die gp91^{phox} den limitierenden Faktor der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität darstellt.

Anhang

9.1 Lebenslauf

| | |
|-------------------------|---|
| Name: | Nico Wippich |
| geboren am / in: | 02.08.1973 / Halle (Saale) |
| Familienstand: | ledig |
| | SCHULBILDUNG: |
| Sept. 1980 - Aug. 1990 | Polytechnische Oberschule |
| Sept. 1990 - Aug. 1992 | Gymnasium, Abitur |
| | ZIVILDIENTST: |
| Sept. 1992 - Sept. 1993 | Deutsches Rotes Kreuz Halle (Saale), Ausbildung zum Rettungssanitäter |
| | STUDIUM: |
| Okt. 1993 | Beginn des Medizinstudiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| Mai 1997 - Juni 2002 | Mitarbeit im Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| Jan. 1999 - März 1999 | Auslandsstudium am National Heart & Lung Institute, Imperial College, London, UK |
| Okt. 2000 - Sept. 2001 | praktisches Ausbildungsjahr: <ul style="list-style-type: none">- Innere Medizin im Bezirksspital Breitenbach, Kanton Solothurn, CH- Anästhesie an der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg- Chirurgie im Spital Schwyz, Kanton Schwyz, CH |
| Dez. 2001 | Hochschulabschluß in der Studienrichtung Medizin |
| Jan. 2002 - Juni 2002 | Arzt im Praktikum im Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| seit Juli 2002 | Arzt im Praktikum in der Chirurgie, Spital Schwyz, Kanton Schwyz, CH |

9.2 Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die hier vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

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

Frühere Promotionsversuche meinerseits bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgestellt.

Halle (Saale), den 15. April 2003

Nico Wippich

9.3 Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

§ Rückschloss U, Wippich N, Brömme HJ, Holtz J, Morawietz H: Similar expression of NAD(P)H oxidase subunits in neutrophils and endothelium, but a minimally expressed, angiotensin-II-inducible gp91^{phox} subunit defines the endothelial oxidase.

71st Scientific Sessions of the American Heart Association, Dallas, November 8, 1998

§ Ebelt H, Peschke D, Blume R, Brömme HJ, Wippich N, Peschke E: Vergleichende Untersuchungen zum Schädigungsmuster von Alloxan und Xanthinoxidase/Hypoxanthin an der pankreatischen B-Zelle *in vitro* – Einfluß von Melatonin.

94. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Hamburg, 26. März 1999

§ Dürrschmidt N, Götsch W, Wippich N, Brömme HJ, Morawietz H: Induktion der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} durch Endothelin in humanen Endothelzellen.

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislauf-forschung, Mannheim, 27. April 2000

§ Wippich N, Peschke D, Peschke E, Brömme HJ: Xanthinoxidasen verschiedener Herkunft unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) zu generieren.

17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 27. September 2000

§ Brömme HJ, Wippich N, Scheubel RJ, Bartling B, Silber RE, Darmer D, Holtz J: Mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c im terminal insuffizienten Humanmyokard: Caspase 9-Aktivierung und Katalyse von Radikalbildung.

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislauf-forschung, Mannheim, 21. April 2001

Die Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit erfolgte unter:

§ Dürrschmidt N, Wippich N, Goetsch W, Broemme HJ, Morawietz H: Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 269 (2000) 713-717

§ Wippich N, Peschke D, Peschke E, Holtz J, Brömme HJ: Comparison between xanthine oxidases from buttermilk and microorganisms regarding their ability to generate reactive oxygen species.

Int J Mol Med 7 (2001) 211-216

9.4 Danksagung

Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Brömme möchte ich für die Überlassung des Themas, die freundschaftliche Betreuung, die zahlreichen Ideen und kritischen Diskussionen, für die wertvollen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Verfassung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Holtz, Direktor des Institutes für Pathophysiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die mir entgegengebrachte Unterstützung und die familiäre Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors des Institutes für Pathophysiologie danke ich für die Kultivierung und Aufbereitung der Zellen und die fachliche Unterstützung.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Mörke von Fachbereich Chemie der Martin-Luther-Universität für die fachkundige Hilfe bei der Durchführung der ESR-Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre unendliche Geduld und Unterstützung danken.