

Jörg Müller

Struktur- und Funktionsanaloga der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase

Doktorarbeit / Dissertation

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

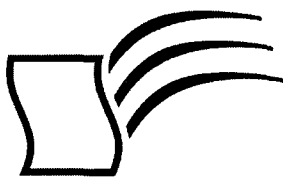
Copyright © 1997 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832409487

Struktur- und Funktionsanaloga der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase

Jörg Müller

Struktur- und Funktionsanaloga der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase

**Dissertation
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Juni 1997 Abgabe**



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

**Hermannstal 119 k
22119 Hamburg**

**agentur@diplom.de
www.diplom.de**

ID 948

Müller, Jörg: Struktur- und Funktionsanaloga der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase /

Jörg Müller - Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 1998

Zugl.: Tübingen, Universität, Dissertation, 1997

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR

Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg

Printed in Germany



Diplomarbeiten Agentur

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit

Ihr Team der Diplomarbeiten Agentur

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey —
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —

Hermannstal 119 k —
22119 Hamburg —

Fon: 040 / 655 99 20 —
Fax: 040 / 655 99 222 —

agentur@diplom.de —
www.diplom.de —

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.1997

Dekan : Prof. Dr. K.-A. Kovar

1. Berichterstatter : Prof. Dr. U. Weser

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. h. c. W. Voelter

Danksagung

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. U. Weser in der Anorganischen Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, im Zeitraum von Februar 1992 bis Oktober 1996 angefertigt. Die experimentellen Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (We 401/24/1-3) gefördert.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Weser für die Überlassung des überaus interessanten Themas, für die Unterstützung während dieser Zeit und dafür, daß er mir in meiner Forschung freie Hand gelassen hat, ohne das Ziel aus den Augen zu verlieren.

Mein Dank gilt im besonderen Dr. H.-J. Hartmann für viele interessante Diskussionen und seine ständige Hilfsbereitschaft bezüglich der Lösung aufgetretener Probleme.

Frau S. Abram, Herrn D. Schübl, Frau Dr. C. Maichle-Mössmer und Prof. Dr. J. Strähle, Anorganische Chemie I, danke ich für die Durchführung der Kristallstrukturanalysen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. K. Felix. Die pulsradiolytischen Messungen der SOD mimetischen Aktivität der Komplexe $[\text{Cu(II)PuPy}](\text{ClO}_4)_2$ und $[\text{Cu(II)PuPhePy}](\text{ClO}_4)_2$ wurden gemeinsam mit ihm am Strahlenbiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Arbeitskreis Prof. Dr. E. Lengfelder) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. R. Gebhardt und seinem Arbeitskreis danke ich für die großzügige Bereitstellung von Hepatozyten und Gerätschaften zur Arbeit mit Zellkulturen. Mein besonderer Dank gilt Frau M. Fausel für ihre Hilfe und Anleitung beim Arbeiten mit Hepatozyten und bei der Durchführung verschiedener biochemischer Testverfahren.

Herrn J. Zhou (Arbeitskreis Prof. Dr. A. Rieker, Institut für organische Chemie) danke ich für die Durchführung der zykl voltammetrischen Messung des Redoxpotentials von $[\text{Cu(II)PuPhePy}](\text{ClO}_4)_2$.

Herrn L.-O. Klotz danke ich für die gute Zusammenarbeit und den regen Gedankenaustausch im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Herrn Dr. A. E. Liczmanski (Lublin, Polen) danke ich für viele interessante Diskussionen während seines Aufenthalts in Tübingen.

Herrn Dr. D. Deters danke ich für die Einweisung an verschiedenen Meßgeräten. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Ch. Sievers speziell bezüglich der ESR-Spektroskopie.

Abschließend möchte ich Frau H. Etspüler, Frau I. Hähnlein, Herrn Dr. H.-J. Hartmann, Frau Y. Kaup, Herrn L.-O. Klotz, Herrn Dr. A. E. Liczmanski und Herrn Ch. Sievers für ihre Kooperationsbereitschaft sowie für ein außerordentlich gutes Arbeitsklima danken.

In Liebe, meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Reaktive Sauerstoffspezies	1
1.2. Kupfer,Zink-Superoxid-Dismutase	9
1.3. Cu_2Zn_2 -Superoxid-Dismutase-mimetische Komplexe . .	17
1.4. Übergangsmetallkomplexe als Nukleasen	29
1.4.1. Interkalierende Metallkomplexe	29
1.4.2. "Kovalent" bindende Koordinationsverbindungen	42
1.5. Zelltoxizität von Kupferverbindungen	46
1.6. Engere Problematik	51
 2. Material und Methoden	 53
2.1. Chemikalien	53
2.2. Geräte	55
2.3. Präparatives	56
2.3.1. Liganden	56
2.3.2. Kupferkomplexe	60
2.3.3. Zinkkomplex	67
2.3.4. Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient	68
2.3.5. Rattenhepatozyten	69
2.4. Spektroskopie	70
2.4.1. Infrarotspektroskopie	70
2.4.2. Circular dichroismus	70
2.4.3. Elektronenabsorption	70

2.4.4.	Atomabsorption	71
2.4.5.	Elementaranalysen	72
2.4.6.	Elektronenspinresonanz	72
2.4.7.	Kristallstrukturen	73
2.4.8.	Zyklovoltammetrie.	73
2.5.	Biochemische Analytik	74
2.5.1.	Pulsradiolyse	74
2.5.2.	Nitrotetrazoliumblau Test	74
2.5.3.	Thiobarbitursäure Test	76
2.5.4.	Tetrazoliumblau Test (3-[4,5-Dimethyl-thiazol- 2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid = MTT) . .	77
2.5.5.	Lactat-Dehydrogenase Test	78
3.	Ergebnisse und Diskussion	79
3.1.	Präparatives	79
3.1.1.	Liganden	79
3.1.2.	Komplexe	79
3.2.	Physikochemische Eigenschaften	84
3.2.1.	Infrarotspektroskopie	84
3.2.2.	Elektronenabsorption	93
3.2.3.	Elementaranalysen und Atomabsorption	96
3.2.4.	Elektronenspinresonanz.	99
3.2.5.	Redoxpotentiale	101
3.3.	Kristallstrukturen.	105
3.4.	Enzymatische Aktivität der Kupferkomplexe.	120

3.4.1.	Nitrotetrazoliumblau Test	120
3.4.2.	Pulsradiolyse	127
3.5.	Thermodynamische Stabilität der Kupferkomplexe . . .	129
3.5.1.	Thermodynamische Gleichgewichtskonstanten . .	129
3.5.2.	Nitrotetrazoliumblau Test	134
3.5.3.	Elektronenspinresonanz	140
3.6.	DNS-Spaltung durch Kupferkomplexe	143
3.6.1.	Thiobarbitursäure Test	143
3.7.	Membrangängigkeit	145
3.7.1.	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient	145
3.8.	Zelltoxizität	149
3.8.1.	Tetrazoliumblau Test (3-[4,5-Dimethyl-thiazol- 2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid = MTT) . .	150
3.8.2.	Lactat-Dehydrogenase Test	153
 4.	Schlußfolgerung	 155
 5.	Zusammenfassung	 168
 6.	Literatur	 170
 7.	Anhang	 197

Abkürzungen

A	Hyperfein-Kopplungskonstante
$B_{rel.}$	relative Gleichgewichtskonstante
c	Konzentration
d	Küvettschichtdicke
Da	Dalton
E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E^0	Normalpotential
g	Lande-Faktor
IC_{50}	Kupferkonzentration, die für 50 % Hemmung der NBT Reduktion erforderlich ist.
λ	Wellenlänge
LC_{50}	Letale Konzentration, die bei 50 % der Versuchszellen zum Tod führt.
k_1	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung
k_1'	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante pseudo 1. Ordnung
k_2	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 2. Ordnung
K	thermodynamische Gleichgewichtskonstante
K_p	Verteilungskoeffizient
pK_s	- log (Gleichgewichtskonstante der Säuredissoziation)
vs NHE	gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode
A	Adenin
Ac	Acetyl
acsal	Acetylsalicylat
A-DNS	rechtsgängige Desoxyribonukleinsäurehelix (Basenpaare um 19° zur Helixachse geneigt)
AGAGLU	([(Amino-2-ethyl)-2-aminomethyl]-2-pyridin-6-carboxyl-histidyl- δ -(2-amino-2-deoxy-D-glucosyl)glutamylglycylaminol-4-phenyl-1-aminoacridin)
AS	Aminosäure
bcp	2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin

B-DNS	rechtsgängige Desoxyribonukleinsäurehelix (Basenpaare senkrecht zur Helixachse)
bim	2,2'-Biimidazol
BLM	Bleomycin
bpy	2,2'-Bipyridin
bpz	2,2'-Bipyrazin
btz	2,2'-Bithiazol
Bu	Butyl
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
cH₂	zyklo-Histidylhistidin
desf	Desferrithiocin
dip	4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin
dipsal	Diisopropylsalicylat
dmp	2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin
DNase I	DNS-Polymerase I
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EdaPhePy	N,N'-Bis(2-pyridyl-phenyl-methylen)-1,2-ethandiamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESR	Elektronenspinresonanz
G	Glycin oder Guanin
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
H	Histidin
hat	1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylen
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyll-ethansulfonsäure
HP	Hydrogenphosphat
H₂P	Dihydrogenphosphat
H₂TMPyP	Meso-tetra(N-methyl-4-pyridiniumyl)porphin
HSA	Human Serumalbumin
Hstz	4-Amino-N-2-thiazolybenzolsulfonamid
Im	Imidazol bzw. substituiertes Imidazol
imet	Indomethacin

INT	3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-tetrazoliumchlorid
IR	infrarot
K	Lysin
KP	Kaliumphosphat
Kryp	1,4,12,15,18,26,31,39-Oktaazapentazyklo[13.13.13.1 ^{6,10} .1 ^{20,24} .-1 ^{33,37}]tetratetrakontan-6,8,10,20,22,24,33,35,37-nonan
L	Leucin oder Ligand
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Metallzentrum
m	mittlere Intensität
MDA	Malondialdehyd
Me	Methyl
MPE	Methidiumpropyl-EDTA
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
p-asal	p-Aminosalicylat
PBS	phosphatgepufferte Saline
Pda-5-MeIm	N,N'-Bis(4-(5-methylimidazolyl)-methylen)-1,3-propandiamin
PdaPhePy	N,N'-Bis(2-pyridyl-phenyl-methylen)-1,3-propandiamin
penicil	Penicillamin
phen	1,10-Phenanthrolin
Pip	2-[(2-Pyridyl)-ethyliminomethyl]-pyridin
PuAcPy	N,N'-Bis(2-pyridyl-methyl-methylen)-1,4-butandiamin
PuIm	N,N'-Bis(2-imidazolylmethylen)-1,4-butandiamin
Pu-5-MeIm	N,N'-Bis(4-(5-methylimidazolyl)-methylen)-1,4-butandiamin
Pu-6-MePy	N,N'-Bis(2-(6-methylpyridyl)-methylen)-1,4-butandiamin
PuPy	N,N'-Bis(2-pyridyl-methylen)-1,4-butandiamin
PuQu	N,N'-Bis(8-chinoliny1-methylen)-1,4-butandiamin
Ribofl	Riboflavin
RSA	Rinder Serumalbumin
s	starke Intensität

SA	Serumalbumin
sal	Salicylat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Cu₂Zn₂-Superoxid-Dismutase
T	Thymin
TAAB	Tetraanhydroaminobenzaldehyd
tap	1,4,5,8-Tetraazaphenanthren
TBS	Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
tmp	3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VIS	visible = sichtbar
Xan	Xanthin
XOD	Xanthin-Oxidase
Y	Tyrosin
Z-DNS	linksgängige Desoxyribonukleinsäurehelix (Basenpaare um 9 ° zur Helixachse geneigt)

1. Einleitung

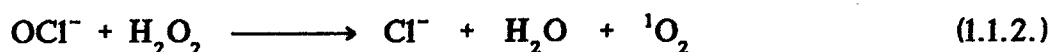
1.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Molekularer Sauerstoff im $^1\Sigma_g$ -Triplett-Grundzustand ist im Vergleich zu Singulett-Sauerstoff wenig reaktiv. Die Sauerstoffaktivierung kann physikalisch durch energieabhängige Spinumkehr bzw. Spinpaarung erfolgen. Es entsteht $^1\Delta_g$ - und $^1\Sigma_g^+$ -Singulett-Sauerstoff [1]. Biologisch relevant ist die $^1\Delta_g$ -Form. Chemisch läßt sich Sauerstoff durch eine endergonische $1e^-$ -Reduktion zum Superoxid-anion (O_2^-) aktivieren (Abb. 1.1.1.). Alle weiteren $1e^-$ -Reduktionsschritte über Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) bis zum Wasser sind exergonische Reaktionen. Daraus ergibt sich die zentrale Rolle des Singulett-Sauerstoffs und des Superoxid-anions im biologischen Geschehen.

α^*2p	$\square$	$\square$	$\square$	$\square$	$\square$
π^*2p	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\square$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
$\pi 2p$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
$\alpha 2p$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
α^*2s	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
$\alpha 2s$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
α^*1s	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
$\alpha 1s$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
	Grund-	Singulett	Singulett	Super-	Peroxid
	zustand			oxid	
	$^1\Sigma_g O_2$	$^1\Delta_g O_2$	$^1\Sigma_g^+ O_2$	O_2^-	O_2^{2-}

Abbildung 1.1.1. Spin- und Bindungszustände im Sauerstoffmolekül.

Singulett-Sauerstoff, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), besitzt im Gegensatz zu Sauerstoff im Grundzustand π^* -Elektronen mit antiparallelem Spin. Die für den Triplett-Sauerstoff "spin-verbotenen" Reaktionen mit Atomen und Molekülen im Grundzustand finden mit Singulett-Sauerstoff statt, der sich durch Energiezufuhr aus Triplett-Sauerstoff darstellen läßt. Die 92 kJ mol^{-1} Aktivierungsenergie für den $^1\Delta_g$ -Zustand können Lichtquanten über bestimmte Transfermoleküle wie Chlorophyll, Rose Bengal und einige andere liefern ^[2]. Als Dunkelreaktion produziert auch die Reaktion von enzymatisch dargestelltem Hypochlorit (OCl^-) mit Wasserstoffperoxid Singulett-Sauerstoff (1.1.1. und 1.1.2.). Die Hypochloritbildung wird durch Chloro-Peroxidase



(E = Enzymkatalyse)

katalysiert ^[3]. Die Singulett-Sauerstoffbildung kann durch die unspezifische Lichtemission (680 und 703 nm) beim bimolekularen physikalischen Zerfall zu Triplett-Sauerstoff oder durch die spezifische Infrarotemission (1270 nm) beim monomolekularen Zerfall nachgewiesen werden ^[4].

Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit organischen Verbindungen lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- a) "Löschung" des physikalischen Anregungszustands,
- b) Chemische Reaktion mit $^1\text{O}_2$ unter Modifikation der organischen Verbindung.

Neben synthetischen Reaktionspartnern sind als natürliche Substanzen Carotin und α -Tocopherol (Vitamin E) zu nennen. Die natürlichen Verbindungen werden zu einem geringen Prozentsatz durch Singulett-Sauerstoff chemisch modifiziert, was nach ca. 20 wiederholten Reaktionen zu einer Umwandlung dieser Verbindungen führt. Da der Körper diese Substanzen nicht selbst synthetisieren kann, müssen sie ständig als Vitamine von außen zugeführt werden.

Singulett-Sauerstoff reagiert mit organischen Verbindungen, die eine oder mehrere Doppelbindungen besitzen. Er ist in seiner Reaktivität dem Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}$ vergleichbar. Die Produkte der Oxidation durch $^1\text{O}_2$ und $\cdot\text{OH}$ sind in einigen Fällen unterschiedlich und lassen dadurch Rückschlüsse auf das entsprechende Oxidans zu [5].

Superoxid kann unter bestimmten Bedingungen während der mitochondrialen Respiration entstehen. Das bedeutet, daß die Zellatmung durch sogenannte Blocker nach dem Cytochrom-b-Pool (Komplex III), z. B. durch Antimycin, oder an der Cytochrom-Oxidase (Komplex IV) durch Cyanid gehemmt wird. Auf diese Weise entsteht auf zwei voneinander unabhängigen Wegen Superoxid. Im Komplex I werden Elektronen von NADH auf ein Flavoprotein übertragen. Ein eng mit dem Flavoprotein verknüpftes Nicht-Hämeisenzentrum übernimmt die Reduktionsäquivalente und reduziert molekularen Sauerstoff zu Superoxid. Als Elektronendonator im Komplex II dient Succinat, aber auch exogenes NADH oder andere Reduktionsmittel. Die Elektronen werden ebenfalls, wie im Komplex I, auf einen Flavoprotein/Nicht-Hämeisenzentrum-Komplex übertragen und an einen Ubichinon/Ubihydrochinon-Pool weitergegeben. Ubihydrochinon

kann unter Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid Semiubichinon bilden, das in einem weiteren $1e^-$ -Oxidationsschritt zu Ubichinon reagiert oder zu Ubichinon/Ubihydrochinon disproportioniert. Die Bildung von Superoxid wurde bei Rinderherz-Mitochondrien in Anwesenheit von Succinat, Katalase und Antimycin A durch Oxidation von Adrenalin zu dem Farbstoff Adrenochrom nachgewiesen. Die Adrenochrombildung konnte durch Zugabe von Superoxid-Dismutase unterbunden werden ^[6].

Eine weitere Quelle der Superoxidbildung ist das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte Cytochrom-P-450-System. Cytochrom-P-450 enthält eine Hämgruppe pro Polypeptidkette. Der fünfte Ligand des Eisens ist ein Cystein. Oxidationsreaktionen, Hydroxylierungen, Dealkylierungen, oxidative Deaminierungen, Sulfoxidbildungen und Dehalogenierungen werden durch Cytochrom-P-450 katalysiert ^[7]. Wird der P-450-Zyklus der Hydroxylierung nicht vollständig durchlaufen, dann werden Elektronen durch Flavoproteine, Nicht-Hämeisenproteine oder durch Autooxidation einer P-450-Zwischenstufe ^[8] direkt auf Sauerstoff übertragen und dadurch Superoxid gebildet.

Des weiteren wurde eine NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in plasmatischen Membranen von Zinkmangelpflanzen beobachtet ^[9]. Unter anderem existiert in der pflanzlichen plasmatischen Membran auch eine NAD(NADP)H-Oxidase, die bei der Erkennungs- und Abwehrreaktion gegenüber infektiösen Mikroorganismen beteiligt ist. Die Pflanzenzellen reagieren also ähnlich wie Leukozyten.

Unter diesen bilden Blutmonozyten, polymorphonukleare Granulozyten und Alveolarmakrophagen, aktiviert durch phagozytierbare Partikel, lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe oder membranschädigende Substanzen wie Detergentien, sowie chemotaktische Substanzen, Superoxid und Wasserstoffperoxid. Sauerstoff wird auf Kosten von NADPH unter Beteiligung eines Cytochroms vom b-Typ, einem Flavoprotein, einem Nicht-Hämeisenzentrum und einem bestimmten Ubichinon zu Superoxid reduziert ^[10]. Dies geschieht auf der Außenseite der Membran, während auf der Innenseite NADPH durch eine Reduktase mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion ständig wieder regeneriert wird.

Als Superoxidquelle für analytische Zwecke dient im allgemeinen Xanthin/Xanthin-Oxidase (XOD) oder pulsradiolytisch erzeugtes Superoxid. Die physiologische Bedeutung des Superoxids ergibt sich einerseits aus seiner eigenen Reaktivität bzw. der des Hydroperoxylradikals ($\text{HO}_2^\cdot$), andererseits aus der Reaktivität der Produkte weiterer Reduktionsschritte, wie Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal.

Das Superoxidanion stellt in wässrigem Medium eine schwache Base dar ($\text{pK}_s = 4,88$). Verschiebt sich der pH-Wert des Mediums zum Säuren, so erfolgt eine Protonierung des Superoxids. Das Hydroperoxylradikal ist als Neutralmolekül lipidlöslich und zeigt gegenüber dem Superoxidanion eine deutlich erhöhte Oxidationskraft ($E^0_{\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2} = 0,89 \text{ V}$; $E^0_{\text{HO}_2^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2} = 1,44 \text{ V}$ ^[11]). Es entsteht bevorzugt in der sogenannten Gouy-Chapman-Stern-Schicht, der Grenzschicht zwischen äußerem Medium und Membran. In dieser Grenzschicht können lokale pH-Gradienten von bis zu drei pH-Einheiten auftreten. Das Superoxidanion gelangt in protonierter

Form als Hydroperoxyradikal bis in die Membran, wo es zur Abstraktion von diallylischem Wasserstoff der Membranlipide und im weiteren zur Kettenreaktion führt, welche eine Lipidperoxidation zur Folge hat (Abb. 1.1.2.).

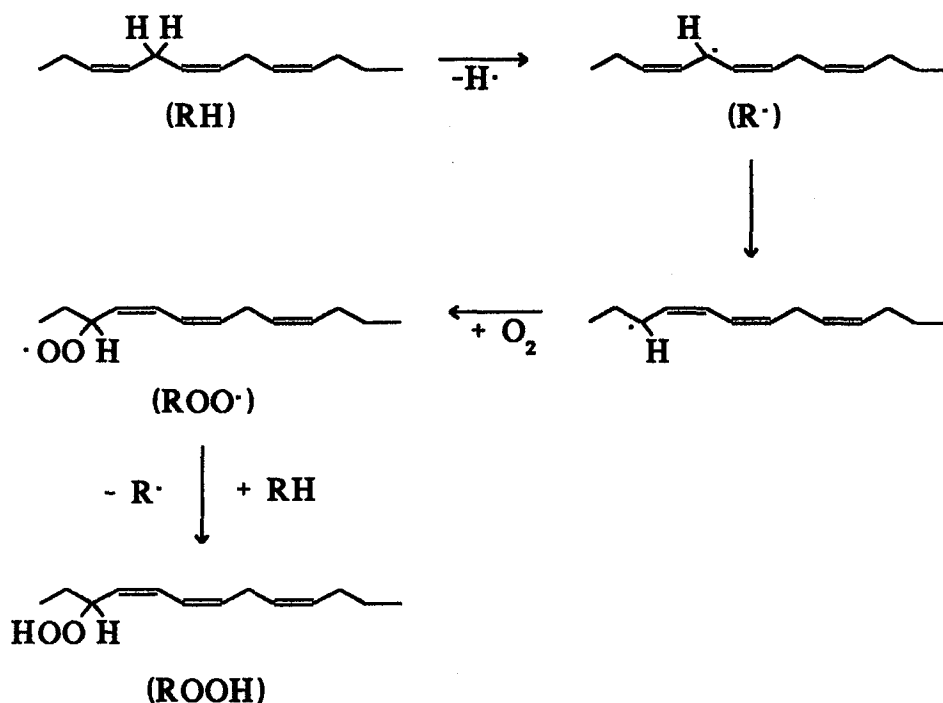
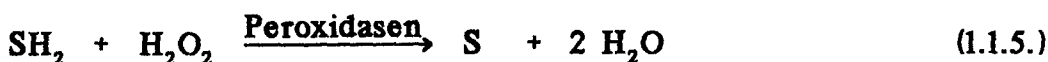
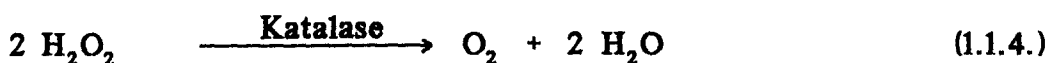
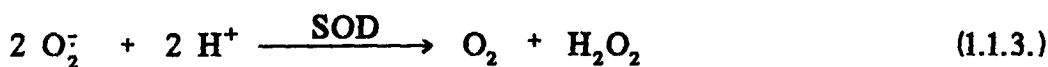


Abbildung 1.1.2. Reaktionsschritte der Peroxidation ungesättigter Lipide; H-Abstraktion, Dienkonjugation, Oxidation, Kettenreaktion mit einem weiteren ungesättigten Lipid ^[12].

Superoxid kann, neben der aus einem Schritt der Dismutation stammenden Reduktion, auch aktiv über Semichinone zu Wasserstoffperoxid reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit der Wasserstoffperoxidbildung besteht in einer direkten 2e^- -Reduktion von Sauer-

stoff durch Hydrochinone. Der Nachweis, ob es sich um ein Folgeprodukt der Superoxidbildung oder eine direkte $2e^-$ -Reduktion handelt, läßt sich über die Enzyme SOD und Katalase führen. Wird die Wasserstoffperoxidbildung ausschließlich durch Katalase gehemmt, so handelt es sich um eine $2e^-$ -Reduktion. Wird die Wasserstoffperoxidbildung durch Superoxid-Dismutase beschleunigt und läßt sie sich anschließend durch Katalasezugabe hemmen, so verläuft der Mechanismus über Superoxid als Zwischenstufe (1.1.3. bis 1.1.4.).



Neben der Katalase als Wasserstoffperoxid-Entgiftungsenzym sind auch Peroxidasen in der Lage Wasserstoffperoxid umzusetzen (1.1.5.). Sie oxidieren ein Substrat und bilden im Gegensatz zur Katalase zwei Moleküle Wasser pro Molekül H_2O_2 . Der Sauerstoff, der aus der Katalase-katalysierten Umsetzung von Wasserstoffperoxid stammt, ist Triplett-Sauerstoff, also die relativ unreaktive Form.

Eine der reaktivsten Sauerstoffspezies entsteht in der sogenannten Fenton-Reaktion. Reagiert Wasserstoffperoxid mit Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer, die zuvor in die reduzierte Form überführt wurden, so wird die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten und ein Elektron übertragen. Es entstehen Hydroxidionen und äußerst reaktive Hydroxylradikale (Abb. 1.1.3.).

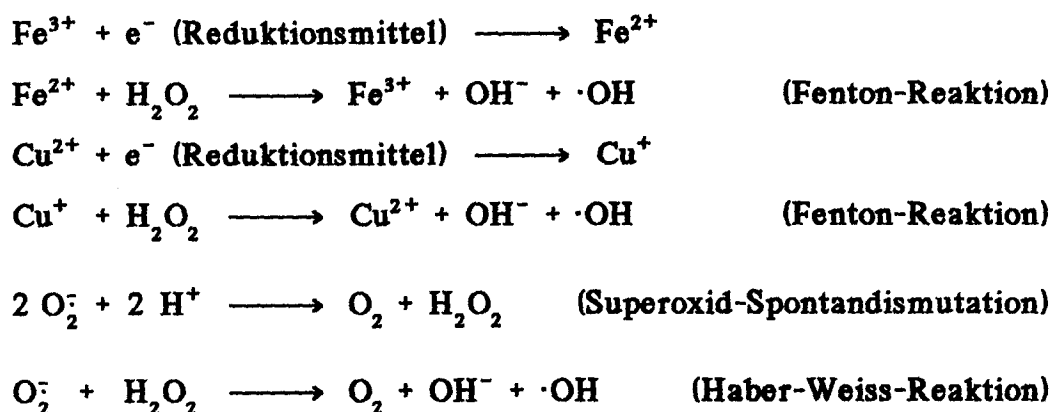


Abbildung 1.1.3. Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion ^[14, 15].

Als Reduktionsmittel für das jeweilige Übergangsmetall kann neben Glutathion, Ascorbinsäure, Hydrochinon oder Riboflavin natürlich auch Superoxid dienen, wobei molekularer Sauerstoff entsteht. Ausgehend von Superoxid als Wasserstoffperoxidquelle hat die sich anschließende Haber-Weiss-Reaktion praktisch keine Bedeutung. Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Spontandismutation und der Haber-Weiss-Reaktion zeigt ^[13, 14], daß Superoxid wesentlich schneller dismutiert als mit Wasserstoffperoxid zu reagieren (Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für die Spontandismutation $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Haber-Weiss-Reaktion $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dient als Reduktionsmittel nicht Superoxid direkt, sondern ein durch Superoxid reduziertes Übergangsmetall in Form eines Chelatkomplexes, so ist die sogenannte Fenton-Reaktion ^[15] bevorzugt. Die Hydroxylradikalbildung muß also Metall-katalysiert erfolgen.

Die $1e^-$ -Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Chinone wie Menadion oder Ubichinon ^[16] als Reduktionsmittel führt ebenfalls zur Hydroxylradikalbildung.

Eine weitere Quelle für Hydroxylradikale ergibt sich in Verbindung mit der Ozon-Toxizität. So können Hydroxylradikale, durch aromatische Verbindungen beschleunigt, über Ozonid-Ionen (O_3^-) bei niedrigen pH-Werten gebildet werden ^[17, 18].

Die biologische Wirkung des Hydroxylradikals ist vor allem die Oxidation von Makromolekülen, wie Peptiden, ungesättigten Fettsäuren, Zuckern und Nukleinsäuren.

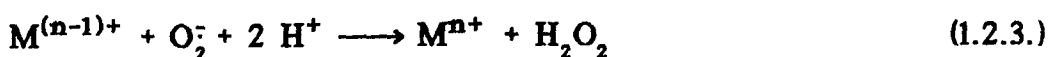
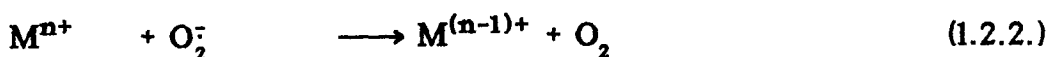
1.2. Kupfer,Zink-Superoxid-Dismutase

Die katalytische Wirkung der Superoxid-Dismutasen besteht darin, die Spontandismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (1.2.1.) um das 10 000fache zu beschleunigen. Dieses wird erreicht, indem redox-aktive Metallionen ($M^{n+}/M^{(n-1)+}$) im katalyti-

Spontandismutation



Metall-katalysierte Superoxiddismutation



schen Zentrum nach einem sogenannten "Pingpong-Mechanismus" mit Superoxid reagieren. Ein Schritt besteht in der Oxidation von Superoxid zu Sauerstoff unter $1e^-$ -Reduktion des Metallzentrums (1.2.2.). Der zweite Schritt ist die Protonen-abhängige Reduktion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid unter $1e^-$ -Oxidation des Metallzentrums (1.2.3.). Das Metall im aktiven Zentrum kann Eisen (bakteriell) ^[19], Mangan (bakteriell, mitochondrial) oder Kupfer

(zytoplasmatische Cu_2Zn_2 -Superoxid-Dismutase) darstellen. Im weiteren beschäftige ich mich mit dem Kupfer,Zink-Enzym. Wenn ich den Begriff SOD verwende, bezieht er sich im folgenden auf Cu_2Zn_2 -Superoxid-Dismutase.

Die SOD ist ein Protein mit einer Masse von 32 kDa, bestehend aus zwei Untereinheiten mit einer Masse von je 16 kDa. Jede Untereinheit trägt im katalytischen Zentrum je ein Zink- und ein Kupferatom. Innerhalb der Aminosäuresequenz sind die Aminosäuren, die für die Funktion der SOD essentiell sind, von Spezies zu Spezies stark konserviert. Es handelt sich um ein sogenanntes "nicht-blaues" Kupferprotein vom Typ II ^[20, 21].

SOD wurde erstmals von T. Mann und D. Keilin (1939) aus Rindererythrozyten isoliert und Kupfer als Bestandteil identifiziert. Daher erhielt das Protein den Namen Erythrocuprein^[22]. Die katalytische Funktion der Dismutation von Superoxid durch Cuprein wurde von J. M. McCord und I. Fridovich (1969) vorgeschlagen, die erstmals von Superoxid-Dismutase sprachen ^[23]. R. J. Carrico und H. F. Deutsch zeigten (1970), daß SOD neben zwei Kupferatomen auch zwei Zinkatome enthält ^[24]. Dies wurde per Röntgenstrukturanalyse durch D. C. Richardson, C. J. Bier und J. S. Richardson (1972) bestätigt ^[25]. Zwei Jahre später (1974) veröffentlichten Richardson et al. eine verbesserte Kristallstruktur mit einer Auflösung von 5,5 Å ^[26]. Die Funktion des Cupreins wurde Ende der sechziger, Anfang der siebziger Jahre kontrovers diskutiert. Alternativ schlugen W. Paschen und U. Weser (1973) den Namen Singlet Oxygen Decontaminase entsprechend der Abkürzung SOD vor. Sie hatten festgestellt, daß Cuprein Singulett-Sauerstoff abfängt, eine Eigenschaft,