

Normales Attribut des aeroben Lebens ist die strukturelle Schädigung einer Vielzahl von Verbindungen – DNA, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden – durch Oxidation. Die oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies wird oxidativer Stress genannt. Zu ihrer Verteidigung haben biologische Systeme während der Evolution enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidanssysteme entwickelt. Viele biologische Vorgänge wie Entzündung, Carcinogenese, Alterungsprozesse und Strahlenschädigung sowie photobiologische Effekte werden durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt und beeinflusst. Dieses Forschungsgebiet gibt neue Impulse für die biochemische Pharmakologie und Toxikologie, für die Strahlenbiochemie sowie für die Pathophysiologie.

1. Einleitung

Dieser Beitrag befaßt sich mit oxidativen Schädigungen in biologischen Systemen. Zunächst wird die Natur der Schädigung organischer Verbindungen besprochen. Danach wird gezeigt, daß trotz der Vielfalt der betroffenen Verbindungen die Zahl der beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies gering ist. Schließlich folgt eine Darstellung neuerer Aspekte der Verteidigung gegen oxidativen Stress und der Reparatur der Schäden mit natürlichen und synthetischen Antioxidantien.

Die Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffs wurde Anfang dieses Jahrhunderts eingehend untersucht (siehe *Warburg*^[1] sowie *Battelli* und *Stern*^[2]). *Michaelis*^[3] betonte, daß die Ein-Elektronen-Schritte der Sauerstoffreduktion, die zur intermediären Bildung von Radikalen führen, von allgemeiner Bedeutung für die Biologische Chemie sind. Sauerstoff bildet die Radikale $O_2^{\bullet-}$ und $O^{\bullet-}$; ihre protonierten Formen sind HO_2^{\bullet} bzw. HO^{\bullet} . Wie *Haber* und *Weiss*^[4] in ihrer Arbeit über die Eisensalz-katalysierte Umsetzung von H_2O_2 erkannten, haben die Radikale Peroxhydroxyl (HO_2^{\bullet}) und Hydroxyl (HO^{\bullet}) Bedeutung für chemische, photochemische und elektrochemische Prozesse. Die biologische Erforschung des Radikals $O_2^{\bullet-}$ wurde durch die Entdeckung der Superoxid-Dismutase durch *McCord* und *Fridovich*^[5] außerordentlich stimuliert. Das Radikal $O_2^{\bullet-}$ wird von Biochemikern Superoxid und von Anorganikern Hyperoxid genannt. – Alle diese Spezies sind in Tabelle 4 (Abschnitt 6) aufgelistet.

Andere reaktive Sauerstoffspezies sind nichtradikalisch. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit O_2^{2+} , dem Zwei-Elektronen-Reduktionszustand von O_2 , interessiert seit der Entdeckung von Katalase-„Compound I“ durch *Chance*^[6] in der Enzymologie. Außerdem sind die elektronisch angeregten Sauerstoffzustände wie Singulett-Sauerstoff (1O_2) und angeregte Carbonylverbindungen zu erwähnen. *Kautsky*^[7] erkannte früh die potentiell wichtige Rolle einer „metastabilen aktiven Sauerstoffspezies“ (Singulett-Sauerstoff), und *Schenck*^[8a] und *Gollnick*^[8b] trugen grundlegende Arbeiten zur Photochemie der Photooxygenierungsreaktionen bei. *Foote*^[9] klärte die Rolle des Singulett-Sauerstoffs bei der Photooxygenierung.

Die Biochemie der Sauerstoffaktivierung und die biologische Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies sind intensiv bearbeitet worden^[10–14]. Neuere Entwicklungen sind in ^[15–20] beschrieben.

2. Oxidative Schädigung von Nucleinsäuren

2.1. Ursachen und Auswirkungen

Oxidative Schädigung der DNA kann durch ionisierende Strahlung oder Licht (UV-Licht; sichtbares Licht in Gegenwart von Photosensibilisatoren) sowie durch Hydroperoxide, Sauerstoffradikale und andere oxidierende Agentien initiiert werden. Die Art des Schadens ist oft komplex. Zum Beispiel bilden sich durch γ -Bestrahlung der DNA mehrere Radikale, aber nur das Radikal 1 mit dem freien Elektron an C-4' führt zu Strangbrüchen, wie Experimente unter anoxischen Bedingungen zeigten^[21] (Abb. 1). In Gegenwart von Sauerstoff verläuft die Bildung von Strangbrüchen komplizierter über Peroxylradikale der Basen und der Zucker. Die Basenschädigung wurde besonders intensiv an Thymin und Guanin untersucht. Aus Thymin entsteht Thyminglycol 2 (Abb. 2) oder 5-(Hydroxymethyl)uracil (vgl. ^[23]). Die am leichtesten durch γ -Bestrahlung oder Photooxidation geschädigte Base ist Guanin; in Abbildung 3 werden einige Reaktionsprodukte vorgeschlagen. Adenin und Cytosin sind gegenüber Oxidationen stabiler. Aus Thymin bilden sich auch Dimere (Abb. 4). Wenn DNA mit Epoxiden reagiert, so tut sie das meist über Guanin, wie für das Addukt mit Aflatoxinepoxid (Abb. 5) gezeigt ist.

Die Strangbrüche durch ionisierende Strahlung werden zum Teil durch Hydroxylradikale hervorgerufen (siehe ^[21,22]). Auch die Strangbrüche durch Superoxidradikale werden auf die in einer Folgereaktion gebildeten Hydroxylradikale zurückgeführt^[26]. Jedoch können zusätzlich zu diesen niedermolekularen Verbindungen auch andere reaktive Spezies von Interesse sein; zum Beispiel wurden Brüche in doppelsträngiger DNA auf das Hydroperoxid der Linolsäure, 13-Hydroperoxylinolsäure, zurückgeführt^[27]. Die Bruchstelle war spezifisch an Guaninresten. Die direkt mit der DNA reagierende Substanz wurde jedoch nicht identifiziert. Möglicherweise entsteht aus dem Hydroperoxid durch homolytische Spaltung ein Hydroxyl-

[*] Prof. Dr. H. Sies
Institut für Physiologische Chemie I der Universität
Moorenstraße 5, D-4000 Düsseldorf

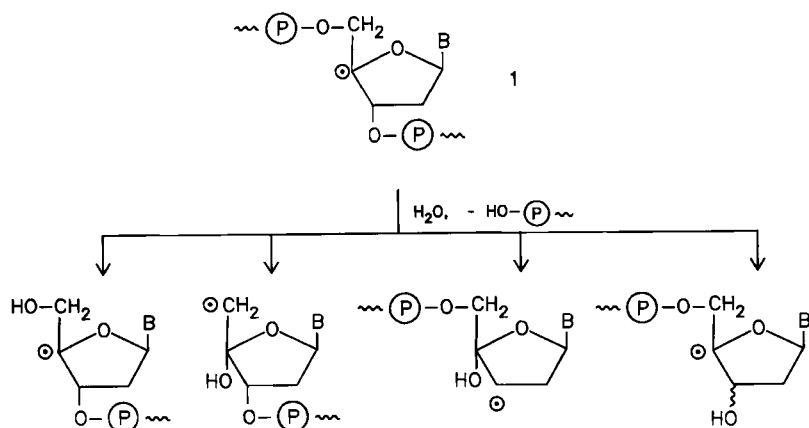


Abb. 1. Hydrolyse des C-4'-Radikals 1 der DNA unter Bildung von Strangbrüchen (anaerob). Unter aeroben Bedingungen können auch andere Brüche auftreten (modifiziert nach [21]).

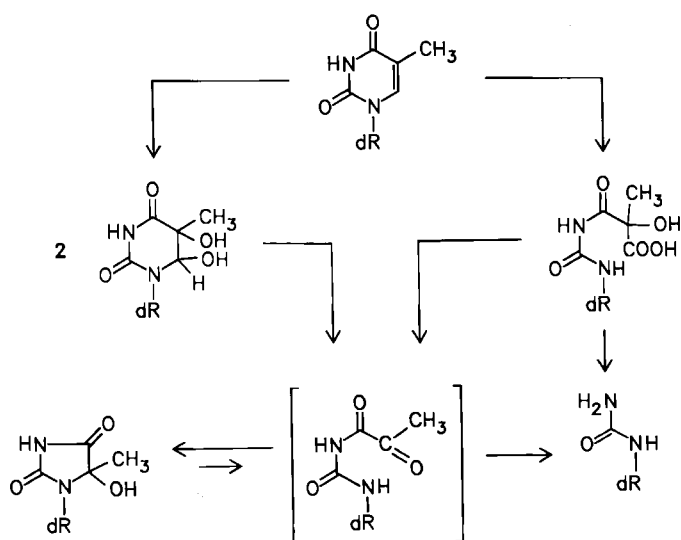


Abb. 2. Oxidativer Abbau von Thyminresten der DNA. Außer Thyminglycol 2 kann auch 5-(Hydroxymethyl)uracil gebildet werden (nach [24]).

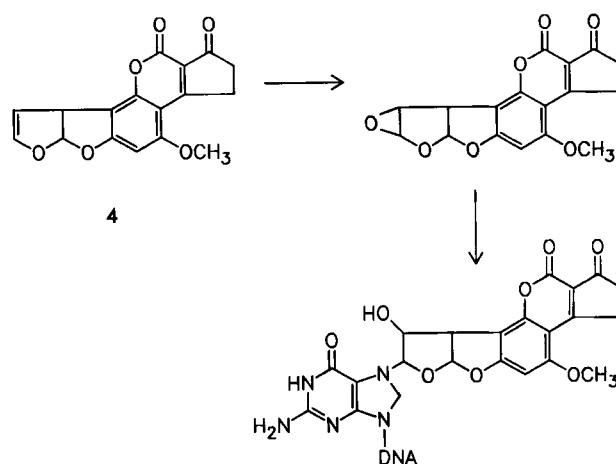


Abb. 5. Bildung des Addukts aus DNA und Aflatoxin B₁ 4 über das 2,3-Epoxid. DNA setzt sich an ihren Guaninresten um.

radikal; bei Wasserstoffperoxid ist diese Reaktion bekannt^[28].

Die Schädigung von DNA (und vielleicht auch von Nucleoproteinen) durch ionisierende Strahlung und durch oxidierende Radikale führt auch zur Veränderung von Chromosomen. Diese Veränderungen zeigen sich durch Chromosomenbrüche und können durch Messung der Chromosomen- und Chromatid-Aberrationen bestimmt werden. Chromosomenbrüche sind besonders häufig bei Erkrankungen wie *Blooms* Syndrom^[29], Lupus Erythematoses^[30] oder Fanconi-Anämie^[31]. Superoxid-Dismutase ist anticlastogen (schützt vor Chromosomenbruch)^[32]. Es wird angenommen, daß Doppelstrangbrüche der DNA der Ausgangspunkt für Chromosomenbrüche sind^[33]. Der genaue Mechanismus des Chromosomenbruchs ist noch nicht bekannt.

2.2. Reparatur

Oxidisierte Basen und Strangbrüche können enzymatisch repariert werden. Es sei angemerkt, daß die oxidative Schädigung nur ein Weg der Veränderung der DNA ist; andere mögliche Schäden kommen zum Beispiel durch Fehler bei der Replikation durch falsche Basenpaarung oder auf anderem Wege durch chemische Veränderung wie Alkylierungs- oder Desaminierungsreaktionen zustande. Die DNA einer Säugerzelle verliert pro 20 h Genera-

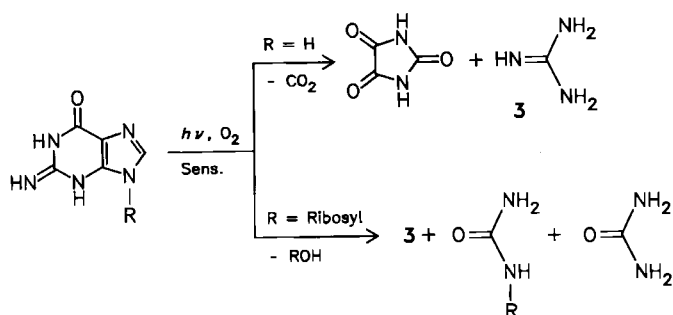


Abb. 3. Schema für den oxidativen Abbau von Guaninresten durch Photo-oxygenierung. Sens. = Sensibilisator (nach [25]).

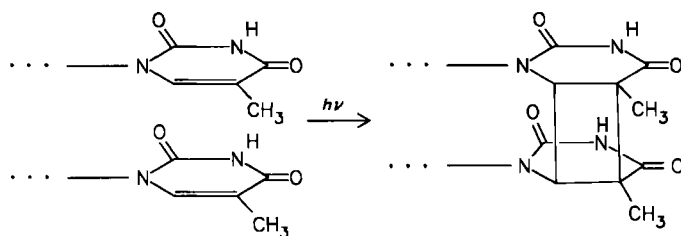


Abb. 4. Benachbarte Thyminreste können bei Bestrahlung ein Dimer mit Cyclobutanring bilden (Zucker- und Phosphatreste sind in der Zeichnung weggelassen).

tionszeit schätzungsweise 5000–10000 Purin- und 200–500 Pyrimidinreste oder tauscht sie aus^[34]. Nucleasen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, arbeiten auf mehrere Weisen^[35,36]: Beispiele sind Nucleotidexcisionsreparatur, Basenexcisionsreparatur, Rekombinationsreparatur, Mismatch-Reparatur und „error-prone“-Reparatur. Ein Thyminglycolrest in der DNA (vgl. 2 in Abb. 2) kann auf zwei Arten freigesetzt werden: als Thyminglycol durch eine spezifische Glycosylase oder als Thymidinglycol durch eine Excisions-Exonuclease (Abb. 6). Diese Basen können im Urin nachgewiesen werden und haben möglicherweise Bedeutung zur Abschätzung der oxidativen Schädigung beim Menschen^[37]. Ein ähnliches Metabolit-Paar ist 5-(Hydroxymethyl)uracil und 5-(Hydroxymethyl)-2'-desoxyuridin; eine 5-(Hydroxymethyl)uracil-Glycosylase wurde kürzlich beschrieben^[38].

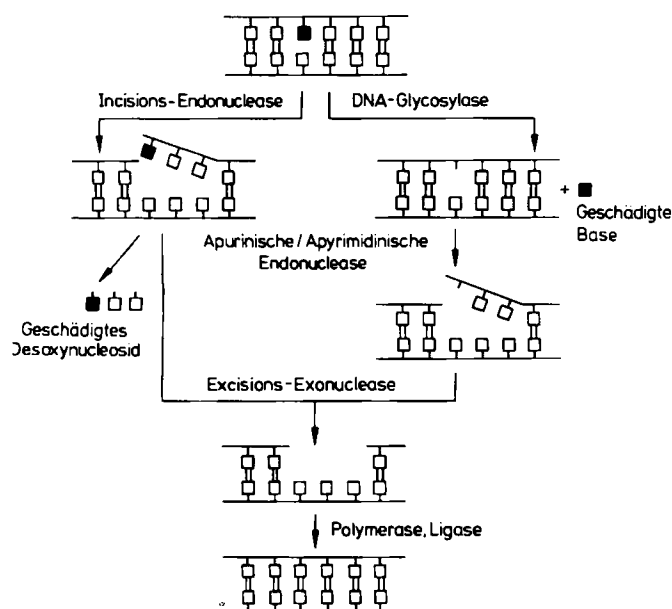


Abb. 6. Zwei Wege der Excisionsreparatur. Links: Reparatur durch Nucleotidexcision; rechts: durch Basenexcision (modifiziert nach [35]).

DNA mit Thymidindimeren, die als Hauptläsion bei der Bestrahlung mit UV-Licht auftreten (Abb. 4), kann nicht nur mit der dimerspezifischen Endonuclease und danach der DNA-Polymerase^[39] repariert werden, sondern auch durch eine lichtabhängige Reparaturreaktion. Diese Photoreaktivierung wird durch ein Flavinenzym katalysiert^[40].

3. Oxidative Schädigung von Aminosäuren und Proteinen

Die Oxidation von Aminosäure-Seitenketten in Proteinen ist seit kurzem als potentiell interessantes biologisches Signal erkannt worden. Die reversible Oxidation-Reduktion von Thiolgruppen hat beim oxidativen Stress mehrfache Bedeutung (siehe Abschnitt 3.1, 3.4 und 3.5). Auch andere Typen der Oxidation reaktiver Gruppen sind reversibel, zum Beispiel die Oxidation von Methionin zum Sulf-oxid und dessen enzymatische Reduktion zu Methionin^[41]. Es können aber auch irreversible oxidative Schädigungen von Aminosäuren auftreten, zum Beispiel Ringöffnung bei Histidin oder Tryptophan (siehe Abb. 7).

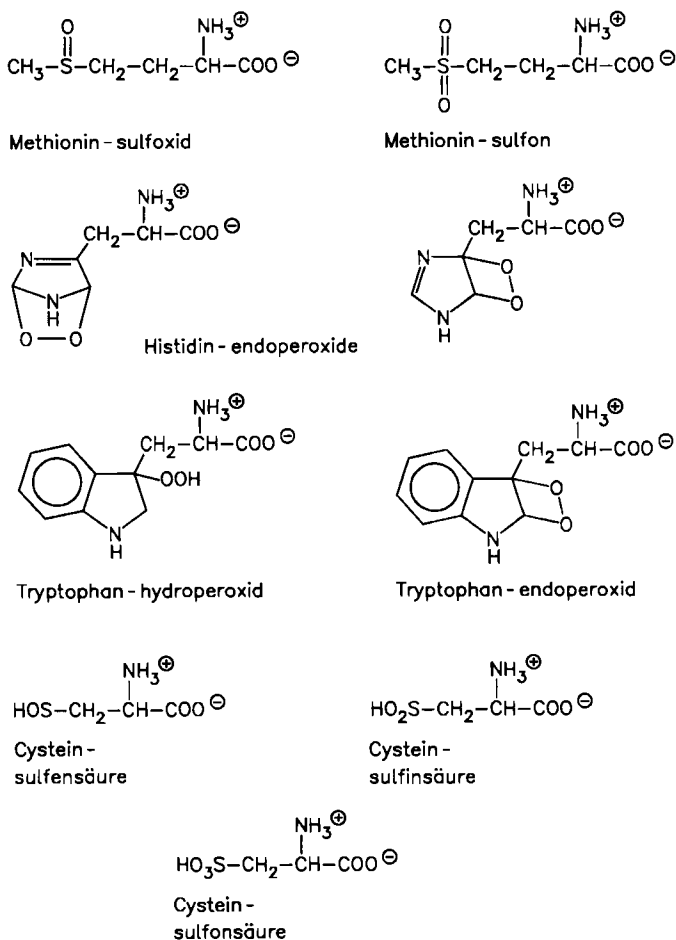


Abb. 7. End- oder Zwischenprodukte des oxidativen Abbaus einiger Aminosäuren, der biologische Bedeutung haben könnte. Aussagen über die Stereochemie der Verbindungen sind nicht beabsichtigt.

3.1. Methionin

Methionin kann durch HO^\bullet , $^1\text{O}_2$ oder H_2O_2 zum Sulf-oxid und weiter zum Sulfon oxidiert werden. Diese Reaktionsfolge hat sich als interessantes metabolisches Signal erwiesen^[42]. Tabelle 1 enthält eine Anzahl von Enzymen, bei denen die Oxidation eines spezifischen Methioninrests zu Funktionsänderungen führt, meist zum Verlust der Funktion. Ein besonders interessantes Beispiel bietet α_1 -Antitrypsin. Die Oxidation von Methionin-358 im aktiven Zen-

Tabelle 1. Einige Proteine und Peptide, die durch Oxidation beeinflusst werden.

Oxidierter Aminosäure	Protein oder Peptid	Lit.
Methionin	Ribosomales Protein L 12 (<i>E. coli</i>)	[42]
	Lysozym	
	Pepsin	[43]
	Ribonuclease	
	Phosphoglucomutase	
	α_1 -Proteinase-Inhibitor	
	Calmodulin	
	ACTH (adrenocorticotropes Hormon)	
	Chemotaktische Faktoren	
	fMet-Leu-Phe	
	Complement C5a	
Histidin	α_1 -Antitrypsin	[48, 49]
	Glutamin-Synthetase (<i>E. coli</i>)	

trum bewirkt eine drastische Verringerung der inhibitorischen Aktivität gegen Elastase^[43]. Die mangelnde Kontrolle der Elastase wurde in Zusammenhang mit dem Auftreten von Lungenemphysemen gebracht^[44]. In der Tat kann die Emphysementwicklung durch intravenöse Injektion von α_1 -Antitrypsin^[45] begrenzt werden. Kürzlich wurde das Problem der oxidativen Inaktivierung von α_1 -Antitrypsin durch Herstellung eines Derivats mit Valin anstelle von Methionin-358 umgangen. Dieses aktive Analogon ließ sich durch positionsspezifische Mutagenese und gentechnische Methoden gewinnen^[46]. Hierdurch wird die These gestützt, daß gezielte Oxidation von Methioninresten in Proteinen biologische Bedeutung haben kann. Der menschliche α_1 -Proteinase-Inhibitor wird durch Zigarettenrauch inaktiviert (Mechanismus siehe ^[47]).

3.2. Histidin

Histidinreste in Proteinen können eine ähnliche Rolle wie Methioninreste spielen. Der selektive Verlust eines von 16 Histidinresten pro Untereinheit führt zu Inaktivierung der Glutamin-Synthetase aus *E. coli*^[48, 49]. Eine Reihe anderer Enzyme des zellulären Stoffwechsels wird ebenfalls unter oxidierenden Bedingungen inaktiviert, zum Beispiel in einem mischfunktionellen System aus NADPH, Cytochrom-P-450-Reduktase und Cytochrom P-450^[49]. Es wird diskutiert, daß diese „Markierung“ von Proteinen durch Oxidation von Histidin als Erkennungssignal für Proteasen verwendet wird und so eine Funktion im Proteinumsatz ausübt.

Die Oxidationsprodukte von Histidin sind noch nicht vollständig identifiziert. Bei Aufspaltung eines Histidinrests bildet sich eine Carbonylgruppe, die als stabiles Dinitrophenylhydrazon nachweisbar ist^[48]. Singuletsauerstoff kann die in Abbildung 7 gezeigten Produkte erzeugen^[50].

3.3. Tryptophan, Lysin und Tyrosin

Diese Aminosäuren werden ebenfalls schneller als die übrigen Aminosäuren oxidiert, jedoch scheint es noch keine detaillierten Studien über ihre Oxidation in Proteinen zu geben. Dityrosin und Isodityrosin sind die Oxidationsprodukte von Tyrosin.

3.4. Prolin

Prolin in Proteinen kann eine bevorzugte Stelle für die Hydrolyse von Peptiden sein; dabei entstehen Fragmente mit *N*-terminalen Glutamatresten^[51] (Abb. 8). Kollagen ist besonders empfindlich gegenüber oxidativem Angriff^[52].

3.5. Cystein

Obwohl die Bildung von Disulfidbrücken als solche nicht als direkte Schädigung betrachtet werden kann, da es sich um einen reversiblen Prozeß handelt, können Disulfidbrücken in Peptiden und Proteinen die biologischen Funktionen drastisch ändern. Die Änderung des Thiol/Disulfid-Status hat biologische Konsequenzen^[53–57], die unter anderem auch die von Enzymeigenschaften (K_m - oder v_{max} -Effekte) betreffen (siehe Tabelle 2). Somit dient auch

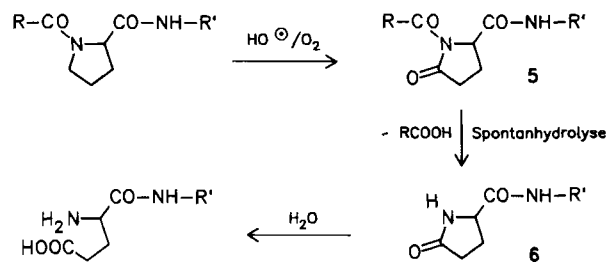


Abb. 8. Schema für die Spaltung von Proteinen bei Prolinresten nach einem Vorschlag in [51]. Zunächst wird Wasserstoff in einem komplizierten Schritt nach Initiierung durch Hydroxylradikale abstrahiert; in Gegenwart von Sauerstoff bildet sich dann über ein organisches Peroxylradikal das Pyrrolidinonintermediat 5. Dieses wird an der Peptidbindung hydrolysiert. Das entstehende Pyroglutamat 6 kann zu einem Fragment mit *N*-terminalem Glutamatrest hydrolysieren.

Tabelle 2. Enzymaktivitäten, die durch Thiol/Disulfid-Austausch modifiziert werden [55]. GSSG = Disulfid von Glutathion (GSH); Cystamin = Bis(2-aminoethyl)disulfid; DTNB = Bis(3-carboxy-4-nitrophenyl)disulfid.

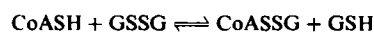
Enzym	Aktivierung durch
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	GSSG
Kollagenase (Leukocyten)	GSSG
Saure Phosphatase (Spinat)	GSSG
Fructose-1,6-Diphosphatase	Cystamin
δ -Aminolävulinat-Synthetase	GSSG
Enzym	Hemmung durch
Pyruvat-Kinase	GSSG
Phosphorylase-Phosphatase	GSSG
Phosphofructo-Kinase	GSSG
Glycogen-Synthase D	GSSG
HMG-CoA-Reduktase	GSSG
Adenylat-Cyclase (Gehirn)	GSSG
Ribonucleotid-Reduktase (<i>E. coli</i>)	GSSG
Hexokinase	Tetraethylcystamin
Tyrosin-Aminotransferase	Cystin
PDH-Kinase	DTNB
Fettsäure-Synthetase	DTNB
γ -Glutamylcystein-Synthetase	Cystamin
Papain, Trypsin	Dimethyldisulfid

der Thiolredoxstatus als metabolisches Signal. Intrazelluläre Proteine liegen im allgemeinen überwiegend in der Thiolform vor (Cysteingehalt 1.6%), während extrazelluläre Proteine (z. B. im Blutplasma) im wesentlichen Disulfidproteine sind (Halbcysteingehalt 4.1%)^[58].

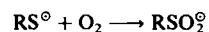
Weiterhin ist die reversible Bildung von gemischten Disulfiden (ProtSSG) aus Proteinen und niedermolekularen Thiolen (im wesentlichen Glutathion (GSH)) von Interesse. ProtSSGs wurden im löslichen Cytoplasma und in Membranen identifiziert^[54–57]. Bei der *S*-Thiolierung von Proteinen in Herzzellen, die anschließend mit Diamid und *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert wurden, zeigten sich typische Muster: Es wurden im wesentlichen Proteine mit $M_r = 23\,000$, $42\,000$ und $97\,000$ ^[59] modifiziert. Der Gehalt an gemischten Disulfiden aus Protein und Glutathion ist niedrig; beispielsweise liegt er bei 20–30 nmol/g Leber^[60, 61]. Wenn die GSSG-Spiegel erhöht werden, nimmt die Konzentration an gemischten Disulfiden ebenfalls zu^[60–62], wahrscheinlich katalysiert durch Thiol-Transferasen^[63].

Es gibt auch gemischte Disulfide (CoASSG) aus Glutathion und Coenzym A. Die Schwankungen ihrer Konzentration können metabolisch interessant sein. Nach Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid kann die Konzentration des verfügbaren freien CoASH durch die Reaktion mit

dem über die Glutathion-Peroxidase erzeugten GSSG so stark herabgesetzt sein, daß Coenzym-A-abhängige Prozesse blockiert werden^[64, 65]:



Thiolgruppen können außerdem zu Alkylthioradikalen oxidiert werden und anschließend Sauerstoff anlagern:



Weitere Umlagerungs- und Oxidationsschritte führen zu Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäuren (vgl. Abb. 7). Letztere sind als stabile Endprodukte in enzymatischen Reaktionen gefunden worden; z. B. entsteht Glutathionsulfonat bei der enzymatischen Oxidation von Glutathion durch Xanthin-Oxidase^[66] oder Meerrettich-Peroxidase^[67].

Alkylthioradikale wurden mit ESR-Methoden *in vitro* in durch Meerrettich-Peroxidase katalysierten Reaktionen nachgewiesen^[68, 69]; über die Bildung dieser Radikale im Stoffwechsel der intakten Zelle ist noch nichts bekannt. Oxidationsprodukte von Disulfiden wie Cystin-S-monoxid oder Cystin-S,S-dioxid kommen ebenfalls vor; sie können möglicherweise in Keratinfasern auftreten^[70a].

3.6. Schädigung von Proteinen durch γ -Strahlung und Radikale

In der Strahlenbiochemie hat man sich in letzter Zeit mit den Reaktionen des Hydroxylradikals HO^\bullet und der Peroxylradikale (ROO^\bullet) mit Proteinen beschäftigt (siehe ^[70b, 71]). Inaktivierung von Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe und der Schutz des Enzyms durch Antioxidantien^[71] oder die Fragmentierung von Rinderserumalbumin in Peptide^[72, 73] sind Beispiele von Studien in diesem Bereich. Die Fragmentierung über Hydroxylradikale scheint vorzugsweise an Prolinresten abzulaufen; über ein Peroxylradikal und ein Pyrrolidinonintermediat wird nach Hydrolyse ein N-terminaler Glutamatrest erhalten^[51] (vgl. Abb. 8).

4. Oxidative Schädigung von Kohlenhydraten

Wie erwähnt, ist Desoxyribose empfindlich gegenüber oxidativer Schädigung. Diese Eigenschaft wurde sogar für den Aufbau eines Tests für die Bildung von Radikalen benutzt. Im Thiobarbiturattest entsteht aus Desoxyribose ein Abbauprodukt, das mit dem aus Malondialdehyd praktisch identisch ist^[74].

Polysaccharide wie Hyaluronsäure können durch oxidativen Angriff geschädigt werden; Superoxid-Dismutase schützt Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit gegen die Depolymerisation^[75, 76]. Bei Proteoglycanen wurden ebenfalls oxidative Schädigungen nachgewiesen^[76].

5. Oxidative Schädigung von Lipiden

5.1. Ursachen und Auswirkungen

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden hinsichtlich der Chemie und Biochemie der oxidativen Reaktionen besonders häufig untersucht. Diese Fettsäuren sind im we-

sentlichen in den Phospholipiden biologischer Membranen enthalten und können durch Phospholipase A_2 vor oder nach dem oxidativen Angriff freigesetzt werden (Abb. 9). Möglicherweise dient die Oxidation vor der Freisetzung als Markierung für die Phospholipase.

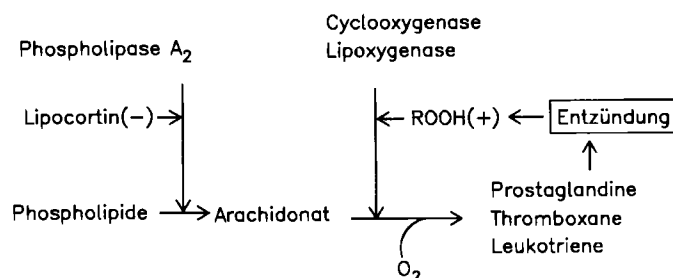


Abb. 9. Schema zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden unter Bildung von Eicosanoiden. Hingewiesen ist auf die Hemmung der Phospholipase A_2 durch Lipocortin, das durch Glucocorticoide induziert werden kann (siehe [77]), und auf den positiven Effekt organischer Hydroperoxide auf die Cyclooxygenase [78] und Lipoxygenase („Peroxidonus“).

Die spezifische enzymatische Oxidation ungesättigter Fettsäuren ist natürlich keine schädigende Reaktion, denn sie führt unter anderem zu besonders potenten und biologisch wichtigen Signalverbindungen. Die Produkte dieser spezifischen Oxidation sind die Prostaglandine, Thromboxan A_2 , Prostacyclin und die Leukotriene (siehe ^[79]). Die unspezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die „Lipidperoxidation“, führt über Radikale (Abb. 10) zu einer Anzahl stabiler Abbauprodukte (Tabelle 3).

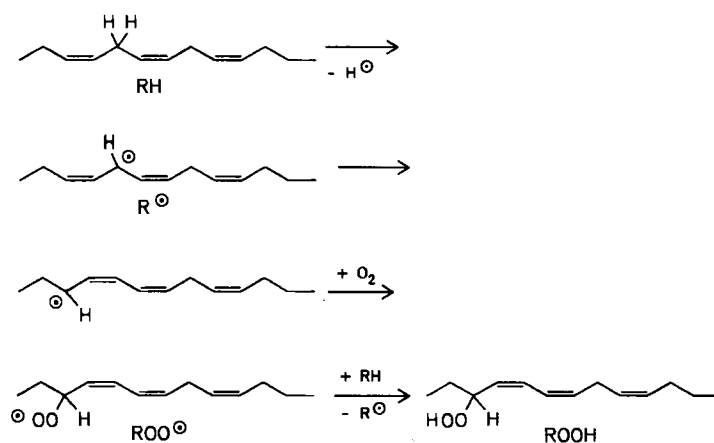


Abb. 10. Die ersten Schritte der Lipidperoxidation, schematisch dargestellt an einem ungesättigten n -Alkan (RH): H-Abstraktion, Dienkonjugation, Oxidation und Umsetzung mit RH (nach [80]).

Tabelle 3. Produkte der Lipidperoxidation [81].

Spaltprodukte des Kohlenstoffgerüsts und ihre Oxidationsprodukte:
Alkane, Alkene, n -Alkanale, 2-Alkenale, 2,4-Alkadienale, Alkatrienale, Hydroxyaldehyde, Hydroperoxyaldehyde, 4-Hydroxyalkenale, 4-Hydroperoxyalkenale, Malonaldehyd, Dicarbonylverbindungen, gesättigte und ungesättigte Ketone
Umlagerungs- und Folgeprodukte:
Hydroxysäuren, Ketosäuren, Ketohydroxysäuren, Epoxyhydroxysäuren, Dihydroxysäuren, Ketodihydroxysäuren, Trihydroxysäuren
Weitere Peroxidationsprodukte:
Cycloendoperoxide (Prostaglandin G_2) und analoge Verbindungen
Dimere und Polymere:
Dimere und Polymere mit folgenden Brücken: $-O-$, $-O-O-$, $-C-C-$

Die Produktpalette hängt im wesentlichen von der verwendeten Fettsäure ab; beispielsweise entsteht Pentan aus einer n-6 mehrfach ungesättigten Fettsäure und Ethan aus einer entsprechenden n-3-Säure. Die Chemie der Lipidperoxidation ist kompliziert und soll hier nicht im Detail besprochen werden (siehe [82]).

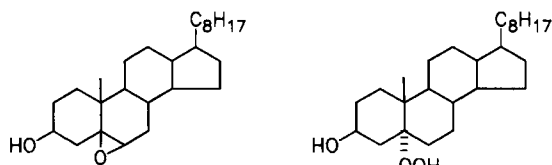


Abb. 11. Oxidationsprodukte von Cholesterin: 5,6-Epoxid und 5 α -Hydroperoxid.

Die Oxidation von Cholesterin ist von besonderem biologischem Interesse. Sie führt zunächst zum 5,6-Epoxid und weiter zum 5 α -Hydroperoxid (Abb. 11). Dieses Cholesterinepoxid kommt in der menschlichen Brustdrüsenflüssigkeit in hohen Konzentrationen vor^[83] und wurde als direkt wirkendes Mutagen identifiziert^[84].

5.2. Atherogenese

Bei der Bildung arteriosklerotischer Läsionen wurde eine Beteiligung der Lipidperoxidation vorgeschlagen. Man beobachtete, daß modifizierte Formen des menschlichen low-density-Lipoproteins (LDL) eine große Anreicherung von Cholesterinestern in Makrophagen bewirken können, z. B. nach Behandlung mit Malonaldehyd^[85]. 4-Hydroxynonenal kann LDL ebenfalls modifizieren, und zwar genügt ein Hundertstel bis ein Tausendstel der bei Malonaldehyd benötigten Konzentration^[86]. Außer der erhöhten Anreicherung von Cholesterinestern führt die Bindung von modifiziertem LDL an Makrophagen auch zu einer verstärkten Freisetzung einer Anzahl lysosomaler Enzyme^[87a]. Die molekulare Basis der Modifikation von LDL durch Endothelzellen, welche zur erhöhten Aufnahme durch Makrophagen führt, ist noch nicht geklärt^[87b].

6. Reaktive Sauerstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die meisten sind Radikale; der Begriff „Sauerstoffradikale“ wird mehr oder weniger als Synonym für reaktive oder aggressive Sauerstoffspezies verwendet. Es sei jedoch daran erinnert, daß molekularer Sauerstoff im Grundzustand (Triplet) als Diradikal sehr viel weniger reaktiv ist als molekularer Sauerstoff im angeregten Zustand (¹ Δ_g O₂, kurz ¹O₂). Dieser Singulett-sauerstoff ist diamagnetisch und nicht-radikalisch^[88]. Somit fallen auch die nicht-radikalischen angeregten Zustände des molekularen Sauerstoffs und auch Sauerstoff in organischen Verbindungen, z. B. in angeregten Carbonylverbindungen und Dioxetanen^[89], sowie Ozon in die Kategorie der reaktiven Sauerstoffspezies von biologischer Be-

Tabelle 4. Reaktive Sauerstoffspezies, die Bedeutung für den oxidativen Stress haben.

Spezies	Name	Bemerkungen
O ₂ ^{•-}	Superoxid oder Hyperoxid	Ein-Elektronen-Reduktionszustand; bei vielen Autoxidationsreaktionen gebildet (siehe Tabelle 5)
HO ₂ [•]	Perhydroxyl	Protonierte Form von O ₂ ^{•-} , besser lipidlöslich
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	Zwei-Elektronen-Reduktionszustand; aus O ₂ ^{•-} über HO ₂ [•] durch Dismutation oder direkt aus O ₂ gebildet
HO [•]	Hydroxyl	Drei-Elektronen-Reduktionszustand; über die Fenton-Reaktion oder die Metall(Eisen)-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion gebildet; sehr reaktiv
RO [•]	R-oxy, z. B. Alkoxy	Sauerstoffzentriertes organisches (z. B. Lipid-)Radikal
ROO [•]	R-dioxy, z. B. Alkyldioxy	Aus organischem Hydroperoxid ROOH durch H [•] -Abstraktion gebildet
ROOH	R-hydroperoxid	Beispiele: Lipid- oder Thymin-OOH
¹ Δ_g O ₂ (auch O ₂ [•] oder ¹ O ₂)	Singulett-sauerstoff	Erster elektronisch angeregter Zustand, 22 kcal/mol über dem Grundzustand (Triplet; ³ O ₂); rote (Dimol-) und infrarote (Monomol-) Photoemission
³ R'R''CO (auch R'R''CO*)	Tripletcarbonyl	Angeregte Carbonylverbindung; blau-grüne Photoemission, z. B. über Dioxetane gebildet (siehe Abb. 13)

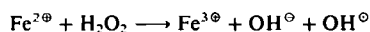
deutung. Die kinetischen Konstanten der Reaktionen von HO₂[•]/O₂^{•-} mit mehr als 300 organischen und anorganischen Verbindungen in wäßriger Lösung wurden kürzlich zusammengestellt^[90].

Die reaktiven Sauerstoffspezies bilden sich auf mehreren enzymatischen und nicht-enzymatischen Wegen. Die Ein-Elektronen-Reduktion, die zunächst zur Bildung des Radikals O₂^{•-} führt, ist eine wesentliche Quelle (Tabelle 5). Die direkte Zwei-Elektronen-Reduktion führt zu Wasserstoffperoxid; als Beispiel hierfür sei die Fettsäure-Acyl-CoA-Oxidase der Peroxysomen genannt. Das Hydroxylra-

Tabelle 5. Bildung des Radikals O₂^{•-} in biologischen Systemen [176].

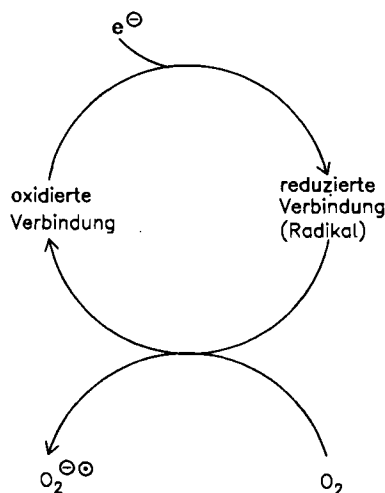
1. O ₂ ^{•-} -Bildung durch Autoxidation (inklusive „Redoxcycling“)	Lit.
Hydrochinone (Semichinon)	[177]
Flavine	[177, 178]
Hämoglobin(e)	[179, 180]
Glutathion und andere Thiole	[181, 182]
Catecholamine	[183]
Übergangsmetall-Ionen	[184, 185]
2. O ₂ ^{•-} -Bildung durch Enzyme oder Enzymkomplexe	
Flavin-abhängige Oxidationen	[186, 187]
Photosynthetische Sauerstoffreduktion	[188]
Mitochondriale Atmung	[189]
Mikrosomale Oxygenierung	[190]
NADPH-abhängige Sauerstoffreduktion durch Granulocyten und Makrophagen	[191–193]
3. Erhöhte (enzymatische) O ₂ ^{•-} -Bildung durch Xenobiotica	
Antimycin	[189]
Adriamycin	[194, 195]
Paraquat	[196, 197]
4. O ₂ ^{•-} -Bildung durch physikalische Einflüsse	
UV-Licht, Ultraschall, Röntgenstrahlen, γ -Strahlen	

dikal kann direkt durch Radiolyse von Wasser sowie über die Fenton-Reaktion entstehen:



Die Quellen für das Radikal O_2^{\ominus} durch Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff in der Zelle liegen unter anderem in den mitochondrialen und mikrosomalen elektronenübertragenden Systemen sowie in der baktericiden Aktivität von Leukocyten und Makrophagen. Die physiologische Bedeutung der zellulären Quellen ist schwer generell zu beurteilen; sie könnten einen großen Teil zur Aufrechterhaltung der stationären Konzentration dieses Radikals beitragen. Ebenso nimmt die Bedeutung von Autoxidationsreaktionen wie „Redoxcycling“ (Abb. 12) zur Erklärung des oxidativen Stress durch Xenobiotica zu; dazu gehören Verbindungen wie Chinone, die in der Krebschemotherapie eingesetzt werden^[91a].

Eine besondere Rolle kommt der stationären *Sauerstoffkonzentration* zu. Bei niedrigen O_2 -Partialdrücken, im Bereich der Hypoxie, ergibt sich ein Optimum für die Schädigung durch Lipidperoxidation, da reduktive Schritte wie die Übertragung des Elektrons im Redoxcycling (Abb. 12) oder die Reduktion von Halogenalkanen durch Cytochrom P-450 gleichzeitig mit O_2 -abhängigen Schritten der Lipidperoxidation (Abb. 10 und 13) ablaufen^[91]. Beispielsweise wurde in einem Oxystat-System an Lebermikrosomen für die Lipidperoxidation durch CCl_4 oder Halothan (CF_3CHBrCl) das Optimum mit 2 Torr für den O_2 -Partialdruck bestimmt^[91b].



reaktive Sauerstoffspezies:



Abb. 12. Schema des „Redoxcycling“. O_2^{\ominus} wird unter aeroben Bedingungen gebildet; die Elektronen werden von NADPH über Reduktasen eingeschleust.

Die reaktiven Sauerstoffintermediate werden in der Regel nach dem Prinzip der Dismutation metabolisiert (Tabelle 6). Nicht nur der Ein-Elektronen-Reduktionszustand wird in einer Dismutationsreaktion eliminiert, sondern auch Zwei-Elektronen-Reduktionsprodukte. Während die Dismutation von O_2^{\ominus} und von H_2O_2 durch Superoxid-Dismutase bzw. Katalase zum Grundzustand, also Triplett-sauerstoff, führen, liefert die „Dismutation“ von Prosta-

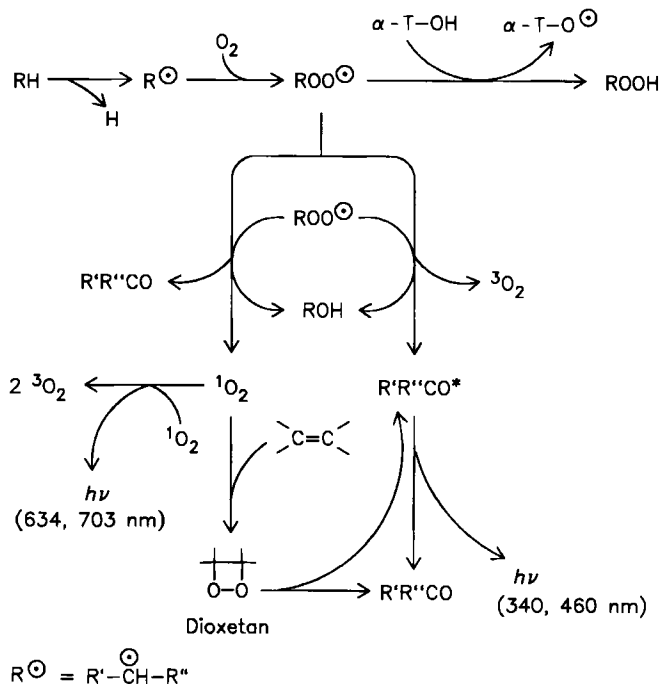


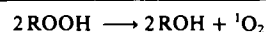
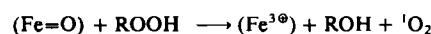
Abb. 13. Bildung von elektronisch angeregtem Sauerstoff (Singulett-Sauerstoff; linke Seite) oder angeregten Carbonylverbindungen $\text{R}'\text{R}''\text{CO}^*$ (Triplettcarbonylverbindungen; rechte Seite) von Lipidperoxyradikalen nach dem Russell-Mechanismus [92, 93]. $\alpha\text{-T-OH}$ bedeutet $\alpha\text{-Tocopherol}$ (siehe Abb. 19).

Tabelle 6. „Dismutationsreaktionen“ von Sauerstoffmetaboliten. PG = Prostaglandin.

Reaktion	Enzym
$2\text{O}_2^{\ominus} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Superoxid-Dismutase
$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Katalase
$2\text{PG G}_2 \longrightarrow 2\text{PG H}_2 + {}^1\text{O}_2$	PG-Hydroperoxidase
$2\text{ROOH} \longrightarrow 2\text{ROH} + {}^1\text{O}_2$	Cytochrom P-450
$2\text{PhI}=\text{O} \longrightarrow 2\text{PhI} + {}^1\text{O}_2$	Cytochrom P-450

glandin G_2 oder von organischen Hydroperoxiden als Produkten der Lipidperoxidation Singulett-Sauerstoff.

Singulett-Sauerstoff wird in biologischen Systemen (a) durch Lichtanregung und (b) durch chemische Anregung gebildet. Bei (a) wird ein Sensibilisator elektronisch angeregt und überträgt dann in seinem Triplettzustand die Energie auf Sauerstoff; bei (b) ist keine Aktivierung durch Licht erforderlich („Photochemie im Dunklen“^[89]). Im Prinzip gibt es zwei Wege für die chemische Anregung von Sauerstoff. Der erste führt über eine Radikal-Radikal-Wechselwirkung^[92, 93] („Russell-Mechanismus“, siehe Abb. 13), der zweite führt über Oxentransfer^[94], wobei dreiwertiges Hämeisen (Fe^{3+}) eine Rolle spielt^[94]:



Singulett-Sauerstoff könnte von besonderer Bedeutung für biologische Systeme sein, weil er eine erhebliche Strecke in Membranen diffundieren kann. In Stearinsäure-Monoschichten beträgt die Diffusionsstrecke des Singulett-Sauerstoffs für Halbinaktivierung 115 Å. (Abb. 14)^[95].

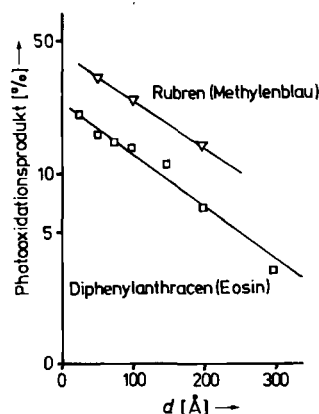


Abb. 14. Ausbeute an Photooxidationsprodukten bei der Reaktion von Rubren bzw. Diphenylanthracen in Gegenwart der Sensibilisatoren Methylenblau bzw. Eosin. Der Abstand zwischen Substrat und Sensibilisator wurde durch Stearinsäure-Monoschichten variabler Dicke d eingestellt (nach [95]).

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff in Zellen wurde bislang im wesentlichen durch die Photoemission über die Dimol-Reaktion nachgewiesen:



Die Verwendung dieser ultraschwachen Chemilumineszenz als Indikator für $^1\text{O}_2$ in intakten Zellen und Organen wird durch empfindliche Einzelphotonenzählung ermöglicht^[96]. Die Spektren sowie die Erhöhung der Photoemission durch Diazabicyclooctan und die Verminderung durch Azid dienten zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff in der intakten Leber während des Redoxcyclings von 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion)^[97] oder 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium (Paraquat)^[98]. Somit könnte Singulett-Sauerstoff die toxischen Effekte dieser Verbindungen hervorrufen. Menadion wirkt mutagen^[99]. Singulett-Sauerstoff, der durch Mikrowellenentladung erzeugt wurde, führte zu Schädigungen biologisch aktiver DNA, und zwar zum Verlust von Transformationsaktivität in einem Testsystem mit dem Plasmid pBR 322^[100a]. Ähnlich verhielt sich $^1\text{O}_2$ aus einem thermodissoziierbaren Naphthalin-endoperoxid^[100b].

Bei isolierten enzymatischen Reaktionen ähneln die Photoemissionsspektren denen der $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOCl}$ -Reaktion^[101]. Zwei Maxima in den Bereichen von $\lambda = 634 \text{ nm}$ und 703 nm wurden mit der isolierten Prostaglandin-Hydroperoxidase (Cyclooxygenase) aus Samenblasen von Schafböcken beobachtet^[94] (Abb. 15), ebenfalls mit isoliertem Cytochrom P-450 und Iodosylbenzol als Substrat (vgl. Tabelle 6)^[102]. Die Monomol-Photoemission von Singulett-Sauerstoff liegt bei $\lambda = 1270 \text{ nm}$ (im IR). Kürzlich wurde für die Lacto-Peroxidase eine Photoemission bei $\lambda = 1270 \text{ nm}$ beschrieben^[103].

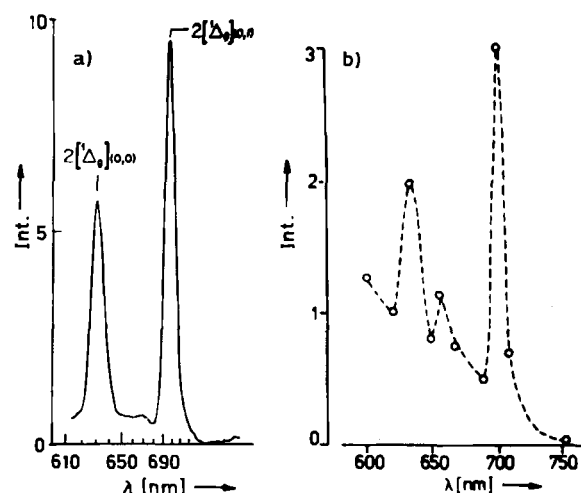


Abb. 15. Dimol-Emissionsspektrum der ultraschwachen Chemilumineszenz von Singulett-Sauerstoff; Bildung von $^1\text{O}_2$ a) durch die Hypochlorit/ H_2O_2 -Reaktion (nach [101]); b) enzymkatalysiert durch die Prostaglandin-Cyclooxygenase-Reaktion (nach [94]). Intensität der Chemilumineszenz in willkürlichen Einheiten.

7. Verteidigung gegen oxidativen Stress: Biochemische Antioxidantien

Die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies ist eine der Voraussetzungen für das aerobe Leben; die vielfältigen, in der Evolution herangereiften Verteidigungslinien bilden zusammen ein starkes Antioxidanssystem (Tabelle 7). Das Repertoire zur Kontrolle der möglicherweise gefährlichen Reaktionen von Sauerstoffmetaboliten umfaßt alle Stufen eines Schutzsystems: Verhütung, Abwehr, Reparatur. Es besteht aus nicht-enzymatischen Abfängern („Scavenger“), die im engeren Sinne mit der Bezeichnung Antioxidantien gemeint sind, sowie aus enzymatischen Systemen.

7.1. Nicht-enzymatische Antioxidantien

α -Tocopherol (Vitamin E, vgl. Abb. 19)^[104] ist das wichtigste lipidlösliche Antioxidans^[105]; seine besondere Wirkung in der Membran wird durch die spezifische physikochemische Wechselwirkung zwischen dem Phytanylrest und den Fettsäureresten der mehrfach ungesättigten Phospholipide bedingt^[106]. Die Insertion des Vitamins in die Membran erhöht seine Effektivität etwa 50fach^[107].

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist, neben Glutathion, in der wäßrigen Phase das wesentliche Antioxidans. Ascorbinsäure kann mit dem Vitamin-E-Radikal reagieren und so das Tocopherol in der Membran regenerieren^[108]. Auf weitere interessante Aspekte, auch der Ernährung^[109] (Normalbedarf: 12 mg Vitamin E und 75 mg Vitamin C pro Tag^[110]), kann hier nicht näher eingegangen werden.

Wichtige weitere Antioxidantien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

7.2. Enzymatische Antioxidantien

Die wesentlichen Enzyme sind die intensiv untersuchten *Superoxid-Dismutasen* sowie Hydroperoxidasen wie *Glutathion-Peroxidase*, *Katalase* und andere Hämproteine mit Peroxidasewirkung. Sie sind im allgemeinen durch hohe

Tabelle 7. Antioxidantien in biologischen Systemen.

Antioxidans	Bemerkungen
<i>Nicht-enzymatisch</i>	
α -Tocopherol (Vitamin E)	Membranständig: Rezeptoren? Regenerierung aus dem Radikal?
Ascorbinsäure (Vitamin C)	Wasserlöslich
Flavonoide	Pflanzliche Antioxidantien (z. B. Rutin, Quercetin)
Chemische Antioxidantien	Nahrungsmittelzusätze, z. B. BHA und BHT [a]
β -Carotin (Vitamin A)	Singulett-sauerstoff-Fänger
Harnsäure	Singulett-sauerstoff-Fänger, Radikalfänger?
Plasmaproteine	Beispiel: Coeruloplasmin
<i>Enzymatisch</i>	
Superoxid-Dismutasen	CuZn-Enzym, Mn-Enzym
GSH-Peroxidasen	Selenoenzym; von Selen unabhängige Aktivität (einige GSH-Transferasen, Cytosol und mitochondriale Matrix)
Katalase	Häm-Enzym, hauptsächlich in der peroxysomalen Matrix
<i>Antioxidansenzyme im weiteren Sinne</i>	
NADPH:Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase)	Zwei-Elektronen-Reduktion, Dicumarin-hemmbar
Epoxid-Hydrolase	
Konjugationsenzyme	UDP-Glucuronyl-Transferasen Sulfo-Transferase GSH-Transferasen
GSSG-Reduktase	
GSH-synthetisierende Enzyme	
NADPH-Versorgung	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Isocitrat-Dehydrogenasen Malat-Enzym Energieabhängige Transhydrogenase
Transportsysteme	GSSG-Export Konjugatexport
Semidehydroascorbat-Reduktase	
Methioninsulfoxid-Reduktase	
DNA-Reparaturenzyme	

[a] BHA = 2-*tert*-Butyl-4-methoxyphenol; BHT = 2,6-Di-*tert*-Butyl-4-methylphenol (siehe 8 bzw. 9 in Abb. 19).

Aktivität in der Zelle und spezifische Verteilung in Organen und im subzellulären Bereich (häufig komplementär) charakterisiert. Typisch ist ferner die Beteiligung von Metallen bei der Enzymreaktion, besonders von Kupfer, Zink, Mangan, Eisen (Häm) und Selen. Die Antioxidanssysteme haben besondere Bedeutung für die Organotropie der Toxizität („target organ toxicity“)^[111]. Für eine ausführliche Diskussion dieser Hauptenzyme in der Antioxidanskette sei auf die Literatur verwiesen (siehe ^[13–20]). Im folgenden sollen einige neuere Aspekte von nicht direkt beteiligten Reaktionen dargestellt werden.

Ein neues Protein, das Membranen vor Peroxidation schützt und GSH-Peroxidase-Aktivität gegenüber Phosphatidylcholin-hydroperoxiden zeigt, wurde identifiziert und als Selenoenzym charakterisiert^[112]. Neu ist auch ein GSH-abhängiger hitzelabiler Faktor, der die Lipidperoxidation in biologischen Membranen hemmt^[113]. Nach jüngsten Befunden handelt es sich bei diesem cytosolischen Protein nicht um eines der bekannten GSH-abhängigen Enzyme^[114a].

Einige spezielle Zelltypen können extrazelluläres GSH verwenden. Die basolaterale Membran von Darmepithelzellen hat ein Na⁺-abhängiges GSH-Aufnahmesystem, so daß exogenes GSH diese Zellen gegenüber oxidativem Angriff schützen kann^[114b]. Die meisten übrigen Zelltypen

können GSH als solches nicht verwenden, sondern müssen es intrazellulär aus den Aminosäuren synthetisieren.

Neben diesen Antioxidantien im engeren Sinne kommen zusätzliche Antioxidanssysteme im weiteren Sinne vor. Diese sind zur Aufrechterhaltung des stationären Fließgleichgewichts ebenfalls von hoher Bedeutung. Beispielsweise können viele radikalische oder nicht-radikalische Reaktionen in Zellen zur Oxidation von Thiolen führen und aus Glutathion (GSH) das Disulfid (GSSG) bilden. Daher ist die regenerierende Rückreduktion zu GSH ein zentraler Schritt in der Antioxidanskette; er wird von dem Flavoprotein GSSG-Reduktase katalysiert. Natürlich ist auch die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für dieses Enzym von Wichtigkeit. So haben NADPH-regenerierende Systeme ebenfalls Bedeutung (Tabelle 7).

Auch die Verminderung der stationären Spiegel von Verbindungen, die reaktive Sauerstoffspezies bilden können, verringert den oxidativen Stress. In dieser Hinsicht ist die Zwei-Elektronen-Reduktion von Chinonen durch NADPH:Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase) sowie die nachfolgende Konjugationsreaktion des Hydrochinons als Teil einer Antioxidans-Verteidigungslinie zu betrachten^[97, 115].

Natürlich ist auch der Export reaktiver Spezies in freier oder konjugierter Form als Entgiftungsfunktion zu verstehen, so z. B. der Transport der Konjugate oder des Glutathiondisulfids aus den Zellen. Glutathionkonjugate können an Glutathionbindungsstellen an anderen Enzymen inhibierend wirken. So wurde durch kinetische und röntgenkristallographische Studien gezeigt, daß Glutathionkonjugate an der Bindungsstelle für GSSG im aktiven Zentrum der GSSG-Reduktase binden^[116] (Abb. 16). Ein Anstieg der Konzentration von GSSG hat eine Reihe metabolischer Wirkungen, z. B. auch die Abschaltung der Proteinsynthese (siehe ^[53]).

Die Transportsysteme für GSSG und Glutathionkonjugate (Thioether) sind in letzter Zeit intensiv untersucht worden^[117] (siehe Abb. 17). In der Leber konkurrieren diese beiden Glutathion-Derivate um den Transport^[118], ein Ausdruck der Tatsache, daß das Transportsystem der Membran beide Substrate akzeptiert. In der Plasmamembran der Leberzelle scheint es eine durch GSSG aktivierbare ATPase-Aktivität zu geben^[119]. Auch im Herzen wurde eine Transportkompetition zwischen GSSG und Glutathion-Konjugaten gefunden^[120]. Mit der Kreatin-Kinase-Reaktion als Indikatorsystem wurde der (ATP/ADP)_{frei}-Quotient ≈ 10 für halbmaximalen GSSG-Transport am intakten durchströmten Rattenherz bestimmt^[121].

Interessanterweise kommt im Herzen das Isoenzym 4-4 der GSH-Transferasen in hoher Aktivität vor, welches 4-Hydroxynonenal als Substrat akzeptiert^[122] und daher dieses biologisch aktive Produkt der Lipidperoxidation entgiften kann^[123]. Kürzlich wurde ein weiteres hochaktives Isozym (8-8) beschrieben^[122].

Manche Isoenzyme der GSH-Transferasen können die GSH-Peroxidase-Reaktion mit organischen Hydroperoxiden als Substrat katalysieren^[124]. Diese nicht-selenabhängigen Aktivitäten können bei Selenmangel besondere Bedeutung erlangen, wenn die zelluläre Aktivität des Selenoenzyms GSH-Peroxidase sehr niedrig ist. Da die GSH-Transferasen jedoch H₂O₂ nicht als Substrat akzeptieren, läßt sich das Selenoenzym nicht völlig ersetzen. Dies

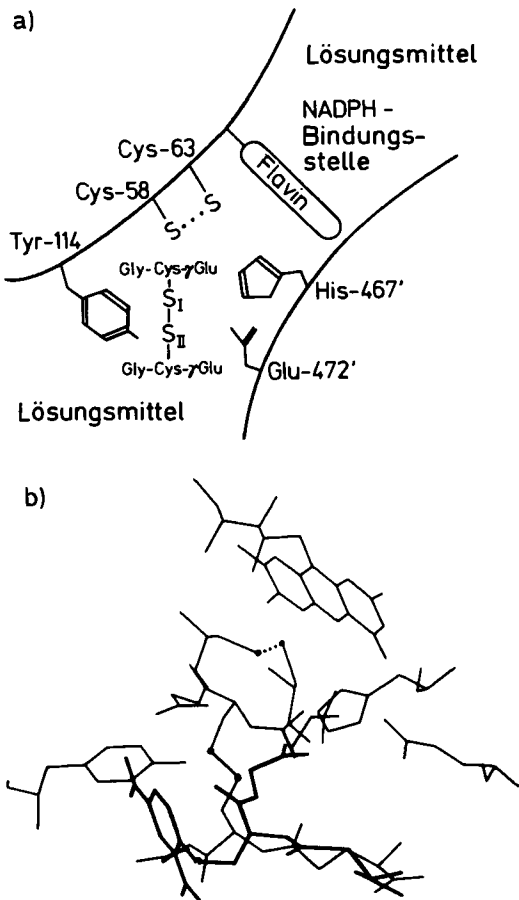


Abb. 16. a) GSSG-Bindungsstelle der Glutathion-Reduktase; b) Bindung von S-(1,2-Dinitrophenyl)glutathion (fett gezeichnet) an dieser Stelle (nach [116]).

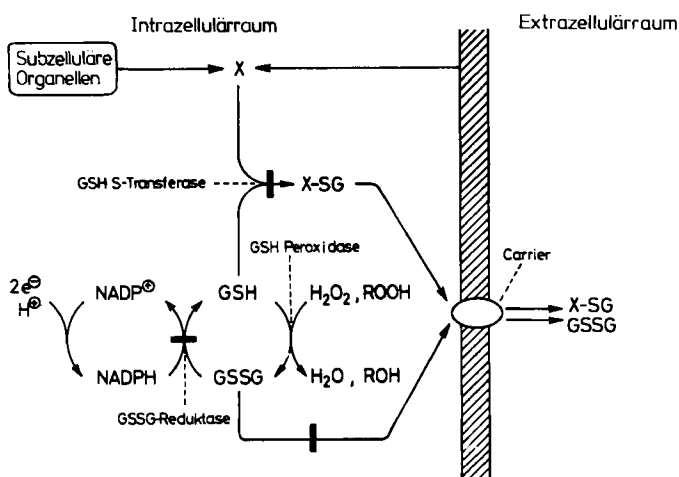


Abb. 17. Beziehungen zwischen GSH-Peroxidase- und GSH-Transferase-Reaktionen. Glutathiondisulfid (GSSG) und Glutathionthioether (X-SG) werden aus den Zellen exportiert; dabei konkurrieren sie um den Transport. X-SGs hemmen die GSSG-Reduktase (nach [120]).

könnte erklären, warum bei Selenmangel klinische Symptome wie die als Keshan-Krankheit bekannte Kardiomyopathie auftreten^[125]. Diese Erkrankung, die bei etwa einem Prozent der Knaben im Schulalter in der chinesischen Provinz Keshan zu Kardiomyopathie und Tod führte, kann durch orale Gabe von 1 mg Natriumselenit pro Woche vollständig verhindert werden^[125].

7.3. DNA-Reparatur

Die möglicherweise biologisch bedeutendste Verteidigungslinie des Organismus besteht darin, nach der oxidativen Schädigung die Identität des genetischen Materials durch Reparatur aufrechtzuerhalten (vgl. Abb. 6)^[36]. Außerdem ist für Mikroorganismen die enzymatisch gesteuerte Mutagenese ein ebenso wichtiger Prozeß, um sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen.

Das Reparatursystem scheint gegenüber ionisierenden Strahlen weniger empfindlich als DNA zu sein. In Hefezellen ist die Reparatur von Einzelstrangbrüchen unabhängig von der Strahlendosis (bis zu hohen Dosen von 2400 Gy)^[126]. Die Reparatorenzyme sind somit für die Zelle als ein zentraler Bestandteil der Antioxidansenzyme im weiteren Sinne zu betrachten.

7.4. Kontrolle der Antioxidanzkapazität

Der Spiegel der Antioxidanssysteme wird reguliert. Zum Beispiel wurde eine Induktion von Katalase und Superoxid-Dismutase (SOD) in Mikroorganismen (*E. coli* oder *S. typhimurium*) während Übergängen von Anaerobiosis zur Aerobiosis^[127] oder durch Behandlung mit H₂O₂^[128] beobachtet; es gibt auch Adaptationsphänomene^[129–131]. Eine Doppelmutante von *E. coli* ohne die beiden SOD-Aktivitäten kann aerob auf Minimum-Glucose-Medium nicht wachsen^[132]. Während der Adaptation an H₂O₂ werden 30 Proteine induziert; neun davon stehen unter der positiven Kontrolle eines Regulons für die Verteidigung gegen oxidativen Stress, das OxyR genannt wurde^[133]. Das OxyR-Regulon kontrolliert eine globale Antwort auf eine DNA-Schädigung ähnlich wie die drei anderen globalen Antworten: SOS-Response, Adaptation an alkylierende Reagentien, Hitzeschock. In Zellen mit deletiertem OxyR-Regulon war die Spontanmutagenese drastisch erhöht; bei Überexpression des OxyR-Gens lag die Mutagenese unter den Kontrollwerten^[134] (Tabelle 8). In ähnlicher Weise zeigen SOD-defiziente *E.-coli*-Mutanten eine sauerstoffabhängige Mutagenese^[135].

Tabelle 8. Spontanmutagenese in Abhängigkeit vom OxyR-Regulon in Teststämmen von *S. typhimurium*. Stämme mit His G428 und dem Plasmid pKM101 mit dem OxyR-Regulon (oxyR⁺) oder mit überexprimiertem (oxyR1) oder deletiertem (oxyΔ2) OxyR-Regulon wurden im His-Reversions-test (Ames-Test) hinsichtlich der Spontanmutagenese untersucht. Zur Beschreibung des Phänotyps werden die Durchmesser der auf Agarplatten mit H₂O₂ erzeugten Hemmzonen aufgeführt [134].

Stamm	Beschreibung	Kolonien pro Platte	Hemmzone (mm)
TA 4117	oxyR ⁺	33 ± 6	18.0
TA 4118	oxyR1	12 ± 4	12.5
TA 4119	oxyΔ2	1408 ± 160	33.5

Derartige Adaptationsphänomene scheinen auch für Eukaryonten von Bedeutung zu sein; die Kontrolle der Muster der Antioxidansenzyme sowie auch die Kontrolle der niedermolekularen Antioxidantien wie Vitamin E in Säugtierzellen sind allerdings noch nicht gut charakterisiert. In dieser Hinsicht sind die Veränderungen der Enzymmuster in Leberknötchen als Adaptation aufzufassen. Diese

Knötchen (Noduli) enthalten Klone von Hepatocyten, die einen neuen Differenzierungsgrad der Leberzelle erreicht haben; dies wird als eine physiologische Antwort auf veränderte Umweltbedingungen betrachtet^[136], ähnlich etwa wie der OxyR-Response. Die in den Knötchen beobachteten Veränderungen betreffen einige der zusätzlichen Antioxidansenzyme in Tabelle 7. Es handelt sich um den Anstieg der zellulären Aktivitäten einiger Isoenzyme der Glucuronyl-Transferasen, der Glutathion-Transferasen sowie der γ -Glutamyl-Transferase, Epoxid-Hydrolase und NADPH:Chinon-Oxidoreduktase. Diese Enzyme gehören zu der Phase-II-Gruppe von Enzymen im Bereich der xenobiotischen Transformation. Die Enzyme der Phase I, also Cytochrom P-450 und b_5 , haben dagegen in den Knötchen erniedrigte zelluläre Aktivitäten. Diese Veränderungen der Genexpression stehen in Beziehung zum Methylierungsgrad der DNA (vgl. ^[137, 138]). In Experimenten zur Verminderung der DNA-Methylierung an Cytosinresten durch Vorbehandlung von Tieren mit dem Analogon 5-Azacytidin wurde gefunden, daß der Gehalt an Cytochrom P-450 und b_5 abfiel^[139], während der Gehalt an mehreren Isoenzymen der Glutathion-Transferasen sowie an NADPH:Chinon-Oxidoreduktase^[140] in der Leber von Mäusen angestiegen war (Abb. 18). Kürzlich wurde die NADPH:Chinon-Reduktase kloniert; in persistierenden Leberknötchen ist sie hypomethyliert^[141].

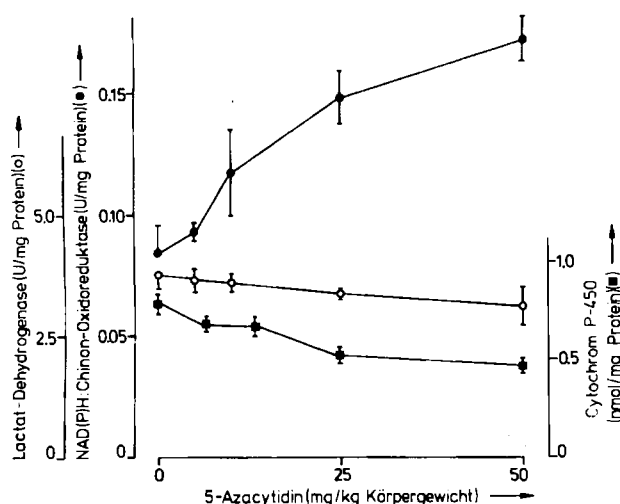


Abb. 18. Anstieg der Konzentration von NADPH:Chinon-Reduktase (DT-Diaphorase) und Abfall der Konzentration von Cytochrom P-450 sowie von Lactat-Dehydrogenase in Mäuseleber nach Injektion von Azacytidin zur Hemmung der DNA(Cytosin-5)-Methyltransferase (nach [140]).

Es bestehen also Beziehungen zwischen dem Status der DNA-Methylierung und dem Expressionsmuster für einige Enzyme, die in der Verteidigung gegen oxidative Belastung eine Rolle spielen (siehe auch ^[142]).

7.5. Synthetische Antioxidantien

Eine Vielzahl von Verbindungen, die als Antioxidantien wirken, wurde synthetisiert und in biologischen Modellen getestet. Diese Gruppe umspannt phenolische Antioxidantien, die z. B. Nahrungsmitteln zugesetzt werden, bis hin zu Medikamenten, die auch klinisch eingesetzt werden (Abb. 19). Dieses große Gebiet wird hier nicht im Detail bespro-

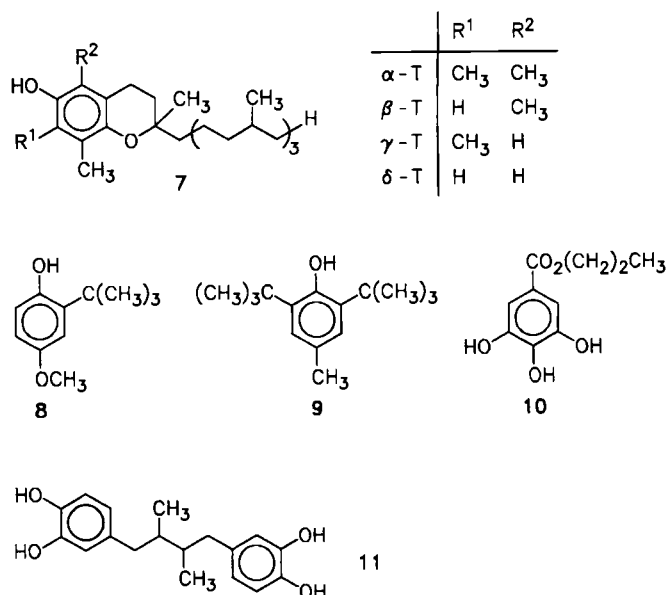
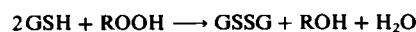


Abb. 19. Einige synthetische Antioxidantien als Inhibitoren von Peroxidationsreaktionen. 7: α - bis δ -Tocopherol; 8: BHA = 2-*tert*-Butyl-4-methoxyphenol; 9: BHT = 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol; 10: Propylgallat; 11: NDGA = Nordihydroguaiarsäure.

chen. Zwei ausgewählte Aspekte, die wir kürzlich untersucht haben, mögen kurz erwähnt werden.

7.6. Ebselen, eine neue Organoselenverbindung

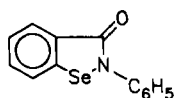
Das synthetische 2-Phenyl-1,2-benzoselenazol-3(2H)-on (Ebselen) hat Antioxidansaktivität^[143]. In einem üblichen Lipidperoxidationstest mit Rattenlebermikrosomen wurde die Wartezeit („lag phase“) vor Beginn der Lipidperoxidation nach Auslösung mit Ascorbat/ADP-Eisen durch Zusatz von Ebselen verlängert, während das Schwefel-Analogon inaktiv war (Abb. 20); dieses betrifft nicht nur die ultraschwache Chemilumineszenz, sondern auch andere Parameter der Lipidperoxidation wie die Freisetzung von Ethan und *n*-Pentan oder die Produktion von Thiobarbitursäure-reaktivem Material. Zusätzlich zu dieser Antioxidansaktivität katalysiert Ebselen die GSH-Peroxidase-Reaktion^[143, 144]:



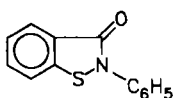
Auf diese Aktivität soll auch der Schutz von intakten isolierten Hepatocyten gegen oxidative Schädigung zurückzuführen sein. Ebselen schützt Kontrollzellen gegen ADP-Eisen-induzierte Schädigung, während es keinen Schutz in Zellen bewirkt, in denen Glutathion vorher auf sehr niedrige Werte (<2%) gesenkt worden war^[145a]. Die Cytotoxizität von Chinonen bei Ehrlich-Ascites-Zellen wird durch Ebselen signifikant herabgesetzt^[145b].

Kürzlich wurde beobachtet, daß Ebselen im Lipoxigenaseweg eine Hemmwirkung entfaltet^[146]. Ob sie durch die Beseitigung eines aktivierenden Hydroperoxids durch die GSH-Peroxidase-Reaktion erklärt werden kann (vgl. Abb. 9) oder durch eine weitere Wirkung von Ebselen, ist noch nicht klar.

Selen zeigt viele biologische Effekte (siehe ^[147]). So spielt es als Selenocystein eine bedeutende Rolle im akti-



Ebselen



Schwefel - Analogon

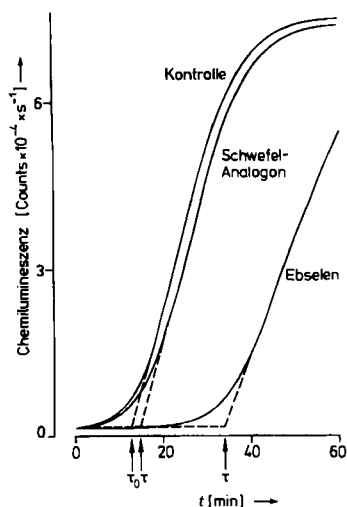


Abb. 20. Ebselen und sein Schwefel-Analogon. Die Organoselenverbindung hat Antioxidansaktivität, wie die verlängerte Wartezeit („lag phase“) in der mikrosomalen Lipidperoxidation zeigt (nach [143]).

ven Zentrum der GSH-Peroxidase^[148-150]. Es dürfte interessant sein, den Katalysemechanismus der GSH-Peroxidase-Reaktion im Enzym mit dem von Ebselen zu vergleichen. Über Selen als Antioxidans^[151] und als Anticarcinogen sowie über sein Potential als Carcinogen und als cytotoxische Verbindung wurde kürzlich ausführlich berichtet^[152a].

7.7. Das Selenoenzym GSH-Peroxidase

Dieses Enzym ist kürzlich sequenziert^[152b] und röntgenkristallographisch^[152c] untersucht worden. Das Gen der Maus wurde kloniert; erstaunlicherweise wird dabei das Selenocystein im aktiven Zentrum durch das Terminationcodon TGA codiert^[152d], ebenso das Selenocystein in der Formiat-Dehydrogenase von *E. coli*^[152e].

7.8. Superoxid-Dismutase als Medikament

Das Cu,Zn-Enzym Superoxid-Dismutase^[5] wird als Antioxidans eingesetzt. In der klinischen Medizin wurde das Enzym bislang im wesentlichen topisch verwendet, z. B. intraartikulär ins Kniegelenk (Synovialspalt)^[153], und hat sich als entzündungshemmend erwiesen. Das Enzym ist kloniert worden^[154]; die rekombinante Human-Superoxid-Dismutase wurde in Hefe exprimiert^[155]. Die gentechnische Gewinnung des Humanenzyms sollte die systematische Verwendung und die Behandlung von klinischen Zuständen ermöglichen, die mit oxidativem Stress verbunden sind. Beispielsweise sind Radikale an der Schädigung des Herzmuskels^[156] oder des Darms^[157] durch Ischämie und nachfolgende Reperfusion beteiligt. Kürzlich wurde gezeigt, daß $O_2^{\cdot-}$ zum Abbau des endothelialen vaskulären Relaxationsfaktors (EDRF) beiträgt^[158]. Um den therapeu-

tischen Nutzen von Sauerstoffradikalfängern und Antioxidantien abschätzen zu können, sind weitere exakte klinische Untersuchungen erforderlich.

8. Biologie des oxidativen Stress: Einige Aspekte

Die biologischen Implikationen des oxidativen Stress sind ausführlich dargestellt worden (neuere Zitate siehe z. B. [13-20, 159]). Anscheinend können fast alle komplexen biologischen Prozesse auf die eine oder andere Weise mit reaktiven Sauerstoffspezies und Radikalen in Verbindung gebracht werden. Für eine tiefere Beurteilung der Rolle von Prooxidanzuständen bei der *Tumorpromotion*^[160] oder bei der *spontanen Mutagenese*^[161] sei auf die Literatur verwiesen. Ähnlich erfordern der *Altersprozeß*^[162, 163] oder die komplexen Beziehungen bei *Entzündungszuständen*^[164] vom biochemischen Standpunkt aus eine kritische Diskussion. Zwischen den Organen existieren in physiologischen und pathophysiologischen Zuständen vielfältige Wechselbeziehungen; Abbildung 21 erläutert einige davon bezüglich des Glutathions.

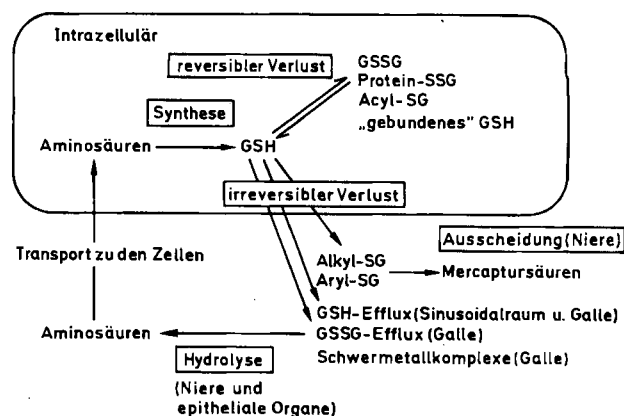


Abb. 21. Chemische Prozesse und Translokationsprozesse, die den intrahepatischen und extrahepatischen Glutathionstatus beeinflussen (nach [55]).

Die biochemischen Prozesse bei der *Strahleneinwirkung* laufen über Radikale (siehe Abschnitt 3.6). Kürzlich wurden nach Behandlung von Mäusen mit γ -Strahlen (5 Gy) in Gehirn, Milz und Leber durch in-vivo-„Spinabfang“-Techniken Radikale nachgewiesen^[165]. Selenit und Vitamin E hemmen in vitro die durch Strahlen oder chemisch induzierte Zelltransformation^[166]. Die Verringerung der Konzentration dieser Antioxidantien durch sechswöchige Mangelernährung brachte bei Mäusen in vivo jedoch keine Verstärkung der Strahlenschädigung mit sich^[167]. Strahlenschutzsubstanzen und Anticarcinogene sind zusammen zu betrachten, da ähnliche Radikalreaktionen zugrunde liegen^[168].

Die biochemisch-biologischen Studien zum oxidativen Stress haben derzeit einen Stand erreicht, der besondere Sorgfalt und Vorsicht beim Einsatz von Methoden und Konzepten verlangt. Es sei daher auf zwei kürzlich erschienene Bände mit Methoden hingewiesen^[169, 170], die sich für biologische und klinische Untersuchungen über Auswirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies eignen.

Zum Schluß soll erwähnt werden, daß der Terminus „oxidativer Stress“ nicht ausschließlich eine potentielle

Schädigung bezeichnet, gegen die der Organismus sich verteidigen muß. Zahlreiche physiologisch wichtige Reaktionen in den Zellen laufen über reaktive Sauerstoffspezies und Radikale ab^[171]. Diese Reaktionen umfassen solche vitalen Funktionen wie die der Makrophagen^[172] oder der neutrophilen Granulocyten^[173] sowie die katalytischen Mechanismen der Formiat-Pyruvat-Lyase^[174] und der Ribonucleotid-Reduktase, die für die Desoxyribonucleotid-Bereitstellung erforderlich ist^[175a], und natürlich auch den großen Bereich der selektiven Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren zur Produktion von Eicosanoiden (siehe ^[79]) mit weitreichenden pathophysiologischen Konsequenzen, beispielsweise bis hin zu klinischen Zuständen wie Ischämie und Schock^[175b].

Arbeiten aus dem Institut des Autors wurden in dankenswerter Weise unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schwerpunktprogramm „Mechanismen toxischer Wirkung von Fremdstoffen“), durch die National Foundation for Cancer Research, Washington, durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen sowie den Fonds der Chemischen Industrie. Dank gilt auch zahlreichen Kollegen für fruchtbare Diskussionen, darüber hinaus den Mitarbeitern und Kollegen, deren Beiträge im Text zitiert worden sind.

Eingegangen am 7. April,
ergänzte Fassung am 25. August 1986 [A 599]

- [1] O. Warburg: *Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz*, Springer, Berlin 1928.
- [2] F. Battelli, L. Stern, *Ergebn. Physiol.* 12 (1912) 96.
- [3] L. Michaelis in D. E. Green (Hrsg.): *Currents in Biochemical Research*, Interscience, New York 1946, S. 207.
- [4] F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. London Ser. A* 147 (1934) 332.
- [5] J. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049.
- [6] B. Chance, *Acta Chem. Scand.* 1 (1947) 236.
- [7] H. Kautsky, H. de Bruijn, *Naturwissenschaften* 19 (1931) 1043; H. Kautsky, H. de Bruijn, R. Neuwirth, W. Baumeister, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 66 (1933) 1588.
- [8] a) G. O. Schenck, *Angew. Chem.* 69 (1957) 579; b) K. Gollnick, *Adv. Photochem.* 8 (1968) 1.
- [9] C. S. Foote, S. Wexler, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 3879, 3880.
- [10] R. Gerschman, D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer, W. O. Fenn, *Science* 119 (1954) 623.
- [11] H. Sund, V. Ullrich (Hrsg.): *Biological Oxidations*, Springer, Berlin 1983.
- [12] H. Sies, *Angew. Chem.* 86 (1974) 789; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 706; H. D. Fahimi, H. Sies (Hrsg.): *Peroxisomes in Biology and Medicine*, Springer, Berlin 1987.
- [13] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527.
- [14] B. N. Ames, *Science* 221 (1983) 1256.
- [15] I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.* 247 (1986) 1.
- [16] M. A. Rodgers, E. L. Powers (Hrsg.): *Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, New York 1981.
- [17] W. Bors, M. Saran, D. Tait (Hrsg.): *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, de Gruyter, Berlin 1984.
- [18] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford 1985; *Arch. Biochem. Biophys.* 246 (1986) 501.
- [19] H. Sies (Hrsg.): *Oxidative Stress*, Academic Press, London 1985.
- [20] a) H. A. O. Hill, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* 311 (1986) 451; b) G. Rotilio (Hrsg.): *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam 1986.
- [21] C. von Sonntag, U. Hagen, A. Schon-Bopp, D. Schulte-Frohlinde, *Adv. Radiat. Biol.* 9 (1981) 109.
- [22] D. Schulte-Frohlinde, C. von Sonntag in [19], S. 11.
- [23] C. Decarroz, J. R. Wagner, J. E. Van Lier, C. Murali Krishna, P. Riesz, J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.* 50 (1986) 491.
- [24] L. H. Breimer, T. Lindahl, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5543.
- [25] J. S. Sussenbach, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* 76 (1963) 154; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1964) 263; M. V. George, V. Bhat, *Chem. Rev.* 79 (1979) 448; J. Cadet, C. Decarroz, S. Y. Wang, W. R. Midden, *Isr. J. Chem.* 23 (1983) 420.
- [26] S. A. Lesko, R. J. Lorentzen, P. O. T'so, *Biochemistry* 19 (1980) 3023.
- [27] S. Inouye, *FEBS Lett.* 172 (1984) 231.
- [28] A. C. Mello Filho, R. Meneghini, *Biochim. Biophys. Acta* 781 (1984) 56.
- [29] I. Emerit, P. Cerutti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1868.
- [30] I. Emerit, A. M. Michelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2537.
- [31] H. Joenje, F. Arwert, A. W. Eriksson, H. de Koning, A. B. Oostra, *Nature (London)* 290 (1981) 142.
- [32] I. Emerit, A. M. Michelson, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492 (1980) 59.
- [33] G. Obe, A. T. Natarajan, F. Palitti in A. T. Natarajan, G. Obe, H. Altmann (Hrsg.): *DNA Repair, Chromosome Alterations and Chromatin Structure*, Elsevier, Amsterdam 1982, S. 1.
- [34] T. Lindahl, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 22 (1979) 135.
- [35] S. M. Linn in S. M. Linn, R. J. Roberts (Hrsg.): *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1982, S. 59.
- [36] E. C. Friedberg: *DNA Repair*, Freeman, New York 1985.
- [37] R. Cathcart, E. Schwiers, R. L. Saul, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 5633.
- [38] M. C. Hollstein, P. Brooks, S. Linn, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4003.
- [39] B. Demple, S. Linn, *Nature (London)* 287 (1980) 203.
- [40] R. Dulbecco, *J. Bacteriol.* 59 (1950) 329; N. Iwatsuki, C. O. Joe, H. Werbin, *Biochemistry* 19 (1980) 1172.
- [41] W. R. Abrams, G. Weinbaum, L. Weissbach, H. Weissbach, N. Brot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7483; H. Carp, A. Janoff, W. Abrams, G. Weinbaum, R. T. Drew, H. Weissbach, N. Brot, *Am. Rev. Respir. Dis.* 127 (1983) 301; H. M. Morrison, D. Burnett, R. A. Stockley, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367 (1986) 371.
- [42] N. Brot, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.* 223 (1983) 271.
- [43] K. Beatty, J. Bieth, J. Travis, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3931.
- [44] S. Eriksson, *Acta Med. Scand.* 175 (1964) 197.
- [45] J. E. Gadek, R. G. Crystal, *Am. Rev. Resp. Dis.* 127 (1983) Suppl. 2, 45.
- [46] S. Rosenberg, P. J. Barr, R. C. Najarian, R. A. Hallewell, *Nature (London)* 312 (1984) 77.
- [47] W. A. Pryor, M. M. Dooley, D. F. Church, *Adv. Free Radicals Biol. Med.* 2 (1986) 161.
- [48] R. L. Levine, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11823.
- [49] L. Fucci, C. N. Oliver, M. J. Coon, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1521.
- [50] H. S. Ryang, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6683.
- [51] S. P. Wolff, A. Garner, R. T. Dean, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 27.
- [52] R. A. Greenwald, W. W. Moy, *Arthritis Rheum.* 22 (1979) 251; J. C. Monboisse, P. Braquet, A. Randoux, J. P. Borel, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 53.
- [53] E. M. Kosower, N. S. Kosower, *Int. Rev. Cytol.* 54 (1978) 109.
- [54] R. Brigelius in [19], S. 243.
- [55] E. Cadenas, R. Brigelius, T. P. M. Akerboom, H. Sies in [11], S. 288.
- [56] H. F. Gilbert, *Methods Enzymol.* 107 (1984) 330.
- [57] D. M. Ziegler, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 305; H. Sies, R. Brigelius, P. Graf, *Adv. Enzyme Regul.* 25 (1987), im Druck.
- [58] R. C. Fahey, J. S. Hunt, G. C. Windham, *J. Mol. Evol.* 10 (1977) 155.
- [59] L. M. Grimm, M. W. Collison, R. A. Fisher, J. A. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta* 844 (1985) 50; M. W. Collison, D. Beidler, L. M. Grimm, J. A. Thomas, *ibid.* 885 (1986) 58.
- [60] R. Brigelius, C. Muckel, T. P. M. Akerboom, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2529.
- [61] T. Higashi, M. Furukawa, K. Hikita, A. Naruse, N. Tateishi, Y. Sakamoto, *J. Biochem. (Tokyo)* 98 (1985) 1661.
- [62] P. L. Keeling, L. L. Smith, W. N. Aldridge, *Biochim. Biophys. Acta* 716 (1982) 249.
- [63] P. Askelof, K. Axelsson, S. Eriksson, B. Mannervik, *FEBS Lett.* 38 (1974) 263.
- [64] D. Crane, D. Häussinger, H. Sies, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 575.
- [65] H. Sies, K. M. Moss, *Eur. J. Biochem.* 84 (1978) 377.
- [66] H. Wefers, H. Sies, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 29.
- [67] H. Wefers, E. Riechmann, H. Sies, *J. Free Radicals Biol. Med.* 1 (1985) 311.
- [68] D. Ross, E. Albano, U. Nilsson, P. Moldeus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125 (1984) 109.
- [69] L. S. Harman, D. K. Carver, J. Schreiber, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1642.
- [70] a) L. D. Setiawan, H. Baumann, D. Gribbin, *STA Surf. Interface Anal.* 7 (1985) 88; b) M. Quintiliani, *Int. J. Radiat. Biol.* 50 (1986), im Druck.
- [71] R. L. Willson in [19], S. 41.
- [72] H. Schüssler, K. Schilling, *Int. J. Radiat. Biol.* 45 (1984) 267.

- [73] S. P. Wolff, R. T. Dean, *Biochem. J.* 234 (1986) 399.
- [74] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *FEBS Lett.* 128 (1981) 347.
- [75] J. M. McCord, *Science* 185 (1974) 529.
- [76] R. A. Greenwald in W. H. Bannister, J. V. Bannister (Hrsg.): *Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*, Elsevier, Amsterdam 1980, S. 160; S. F. Wong, B. Halliwell, R. Richmond, W. R. Skowronek, *J. Inorg. Biochem.* 14 (1981) 127; C. Kreis, E. Lengfelder in A. M. Michelson, J. V. Bannister (Hrsg.): *Oxidative Damage and Related Enzymes*, Life Chemistry Reports, Harwood Publ., London 1984, S. 81.
- [77] B. P. Wallner, R. J. Mattaliano, C. Hession, R. L. Cate, R. Tizard, L. K. Sinclair, C. Foeller, E. Pingchang Chow, J. L. Browning, K. L. Ramachandran, R. B. Pepinsky, *Nature (London)* 320 (1986) 77.
- [78] W. E. Lands, *J. Free Radicals Biol. Med.* 1 (1985) 97.
- [79] B. Samuelsson, *Angew. Chem.* 95 (1983) 854; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 805.
- [80] A. A. Barber, F. Bernheim, *Adv. Gerontol. Res.* 2 (1967) 355.
- [81] H. Esterbauer in D. C. H. McBrien, T. F. Slater (Hrsg.): *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, Academic Press, London 1982, S. 101.
- [82] H. Kappus in [19], S. 273.
- [83] N. L. Petrakis, L. D. Gruenke, J. C. Craig, *Cancer Res.* 41 (1981) 2563.
- [84] A. Sevanian, A. R. Peterson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4198.
- [85] M. A. Fogelman, I. Shechter, J. Seager, M. Hokom, J. S. Child, P. A. Edwards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2214.
- [86] G. Jürgens, J. Lang, H. Esterbauer, *Biochim. Biophys. Acta* 875 (1986) 103.
- [87] a) H. P. Hartung, R. G. Kladetzky, M. Hennerici, *FEBS Lett.* 186 (1985) 211; b) R. R. Montgomery, C. F. Nathan, Z. A. Cohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 6631.
- [88] H. H. Wasserman, W. A. Murray (Hrsg.): *Singlet Oxygen*, Academic Press, New York 1979.
- [89] W. Adam, G. Cilento (Hrsg.): *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York 1982; *Angew. Chem.* 95 (1983) 525; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 529.
- [90] B. H. J. Bielski, E. E. Cabelli, R. L. Arudi, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14 (1985) 1041.
- [91] a) H. Kappus, H. Sies, *Experientia* 37 (1981) 1233; b) H. de Groot, T. Noll, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119 (1984) 139; *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 15.
- [92] G. A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 3871.
- [93] J. A. Howard, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1058.
- [94] E. Cadenas, H. Sies, W. Nastainczyk, V. Ullrich, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364 (1983) 519.
- [95] B. Schnuriger, J. Bourdon, *Photochem. Photobiol.* 8 (1968) 361.
- [96] A. Boveris, E. Cadenas, R. Reiter, M. Filipkowski, Y. Nakase, B. Chance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1979) 347; E. Cadenas, H. Sies, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 221.
- [97] H. Wefers, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* 224 (1983) 568.
- [98] E. Cadenas, R. Brigelius, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 147.
- [99] P. L. Chesis, D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1696.
- [100] a) H. Wefers, D. Schulte-Frohlinde, H. Sies, *FEBS Lett.* (1986), im Druck; b) M. V. M. Lafleur, A. W. M. Nieuwint, J. M. Aubry, H. Kortbeek, F. Arwert, H. Joenje, *Free Radicals Res. Commun.* 2 (1987), im Druck.
- [101] A. U. Khan, M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3293.
- [102] E. Cadenas, H. Sies, H. Graf, V. Ullrich, *Eur. J. Biochem.* 130 (1983) 117.
- [103] J. R. Kanofsky, *J. Photochem.* 25 (1984) 105.
- [104] R. Porter, J. Whelan (Hrsg.): *Biology of Vitamin E*, Ciba Found. Symp. 101, Pitman, London 1983; L. J. Machlin in L. J. Machlin (Hrsg.): *Handbook of Vitamins*, Marcel Dekker, New York 1984, S. 100.
- [105] G. W. Burton, A. Joyce, K. U. Ingold, *Arch. Biochem. Biophys.* 221 (1983) 281.
- [106] A. T. Diplock, J. A. Lucy, *FEBS Lett.* 29 (1973) 205.
- [107] E. Cadenas, M. Ginsberg, U. Rabe, H. Sies, *Biochem. J.* 223 (1984) 755.
- [108] A. L. Tappel, *Geriatrics* 23 (1968) 97; J. E. Packer, T. F. Slater, R. L. Willson, *Nature (London)* 278 (1979) 737.
- [109] C. K. Chow, *Am. J. Clin. Nutr.* 32 (1979) 1066.
- [110] W. Wirth: *Nährwertabelle*, Umschau Verlag, Frankfurt am Main 1984.
- [111] T. Ishikawa, T. P. M. Akerboom, H. Sies in G. M. Cohen (Hrsg.): *Target Organ Toxicity*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1986, S. 129.
- [112] F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, C. Gregolin, *Biochim. Biophys. Acta* 710 (1982) 197; F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin, *ibid.* 839 (1985) 62.
- [113] P. B. McCay, D. D. Gibson, K.-L. Fong, K. R. Hornbrook, *Biochim. Biophys. Acta* 431 (1976) 459; R. F. Burk, M. J. Trumble, R. A. Lawrence, *ibid.* 618 (1980) 35.
- [114] D. D. Gibson, J. Hawrylko, P. B. McCay, *Lipids* 20 (1985) 704; b) L. H. Lash, T. M. Hagen, D. P. Jones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4641.
- [115] a) C. Lind, P. Hochstein, L. Ernster, *Arch. Biochem. Biophys.* 215 (1982) 178; b) H. Thor, M. T. Smith, P. Hartzell, G. Bellomo, S. A. Jewell, S. Orrenius, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12419.
- [116] M. Bilzer, R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, T. P. M. Akerboom, H. Sies, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 373.
- [117] H. Sies in Y. Sakamoto, T. Higashi, N. Tateishi (Hrsg.): *Glutathione: Storage, Transport and Turnover in Mammals*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1983, S. 63; N. Kaplowitz, T. Yee Aw, M. Ookhtens, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25 (1985) 715; S. Bannai, N. Tateishi, *J. Membr. Biol.* 89 (1986) 1.
- [118] T. P. M. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies, *FEBS Lett.* 140 (1982) 73; *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5838.
- [119] P. Nicotera, M. Moore, G. Bellomo, F. Mirabelli, S. Orrenius, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 1999.
- [120] T. Ishikawa, H. Sies, *FEBS Lett.* 169 (1984) 156; *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3838.
- [121] T. Ishikawa, M. Zimmer, H. Sies, *FEBS Lett.* 200 (1986) 128.
- [122] B. Mannervik, *Adv. Enzymol.* 57 (1985) 357; H. Jönsson, C. Guthenberg, P. Alin, B. Mannervik, *FEBS Lett.* 203 (1986) 207.
- [123] T. Ishikawa, H. Esterbauer, H. Sies, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1576.
- [124] R. A. Lawrence, R. F. Burk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (1976) 952; J. R. Prohaska, H. E. Ganther, *ibid.* 76 (1977) 437.
- [125] X. Chen, G. Yang, J. Chen, X. Chen, Z. Wen, K. Ge, *Biol. Trace Elem. Res.* 2 (1980) 91.
- [126] B. Ogorek, P. E. Bryant, *Mutat. Res.* 146 (1985) 63.
- [127] H. M. Hassan, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7667.
- [128] G. J. Finn, S. Condon, *J. Bacteriol.* 123 (1975) 570.
- [129] B. Demple, J. Halbrook, *Nature (London)* 304 (1983) 466.
- [130] L. Winquist, U. Rannug, A. Rannug, C. Ramel, *Mutat. Res.* 141 (1984) 145.
- [131] R. M. Tyrrell, *Mutat. Res.* 145 (1985) 129.
- [132] A. Carliz, D. Touati, *EMBO J.* 5 (1986) 623.
- [133] M. F. Christman, R. W. Morgan, F. S. Jacobson, B. N. Ames, *Cell* 41 (1985) 753.
- [134] H. Sies, M. F. Christman, G. Storz, B. N. Ames, unveröffentlicht (1986).
- [135] S. B. Farr, R. D'Ari, D. Touati, persönliche Mitteilung (1986).
- [136] E. Farber, *Biochim. Biophys. Acta* 738 (1984) 171.
- [137] W. Dörfner, *Angew. Chem.* 96 (1984) 917; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 919; *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 93.
- [138] P. A. Jones, *Cancer Res.* 46 (1986) 461.
- [139] N. J. Gooderbaum, G. J. Mannering, *Cancer Res.* 45 (1985) 1569.
- [140] G. Wagner, H. Sies, unveröffentlicht (1986).
- [141] J. B. Williams, A. Y. H. Lu, R. G. Cameron, C. B. Pickett, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 5524.
- [142] H. J. Prohaska, M. J. De Long, P. Talalay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 8232.
- [143] A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 3235.
- [144] A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi, G. Tiegs, R. Otter, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 3241.
- [145] a) A. Müller, H. Gabriel, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 1185; b) J. H. Doroshov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4514.
- [146] H. Safayhi, G. Tiegs, A. Wendel, *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 2691.
- [147] J. E. Spallholz, J. L. Martin, H. E. Ganther (Hrsg.): *Selenium in Biology and Medicine*, Avi Publ., Westport 1981.
- [148] J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Science* 179 (1973) 588; L. Flohé, W. A. Günzler, H. H. Schöck, *FEBS Lett.* 32 (1973) 132.
- [149] J. W. Forstrom, J. J. Zakowsky, A. L. Tappel, *Biochemistry* 17 (1978) 2639.
- [150] A. Wendel, B. Kerner, K. Graue, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 1035.
- [151] L. Flohé, *Curr. Top. Cell. Res.* 27 (1985) 473.
- [152] a) L. N. Vernie, *Biochim. Biophys. Acta* 738 (1984) 203; b) W. A. Günzler, G. J. Steffens, A. Grossmann, S.-M. A. King, F. Otting, A. Wendel, L. Flohé, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365 (1984) 195; c) D. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel, *Eur. J. Biochem.* 133 (1983) 51; d) I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, *EMBO J.* 5 (1986) 1221; e) F. Zinoni, A. Birkmann, T. C. Stadtman, A. Böck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4650.
- [153] E. C. Huskisson, J. Scott, *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* 4 (1981) 212.
- [154] L. Sherman, N. Defni, J. Lieman-Hurwitz, Y. Groner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5465.

- [155] R. A. Hallewell, F. R. Masiarz, R. C. Najarian, J. P. Puma, M. R. Quiroga, A. Randolph, R. Sanchez-Pescador, C. J. Scandella, B. Smith, K. S. Steimer, G. T. Mullenbach, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 2017.
- [156] B. R. Lucchesi, K. M. Mullane, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 (1986) 201.
- [157] a) D. N. Granger, G. Rutili, J. M. McCord, *Gastroenterology* 81 (1981) 22; b) H. Sanfay, M. G. Sarr, G. B. Bulkley, J. L. Cameron, *Acta Physiol. Scand.* 126, Suppl. 548 (1986) 109.
- [158] R. J. Gryglewski, R. M. J. Palmer, S. Moncada, *Nature (London)* 320 (1986) 454.
- [159] A. P. Autor (Hrsg.): *Pathology of Oxygen*, Academic Press, New York 1982; J. D. Balentine, *Pathology of Oxygen Toxicity*, Academic Press, New York 1982.
- [160] P. A. Cerutti, *Science* 227 (1985) 375.
- [161] N. J. Sargentini, K. C. Smith, *Mutat. Res.* 154 (1985) 1.
- [162] R. J. Mehlhorn, G. Cole, *Adv. Free Radicals Biol. Med.* 1 (1985) 165.
- [163] R. S. Sohal, R. G. Allen, *Adv. Free Radicals Biol. Med.* 2 (1986) 117.
- [164] L. Flohé, R. Beckmann, H. Giertz, G. Loschen in [19], S. 403.
- [165] E. K. Lai, C. Crossley, R. Sridhar, H. P. Misra, E. G. Janzen, P. B. McCay, *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1986) 156.
- [166] C. Borek, A. Ong, H. Mason, L. Donahue, J. E. Biaglow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 1490.
- [167] G. Batist, A. Reynaud, A. G. Katki, E. L. Travis, M. C. Shoemaker, R. F. Greene, C. E. Myers, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 601.
- [168] O. F. Nygaard, M. Simic (Hrsg.): *Radioprotectors and Anticarcinogens*, Academic Press, New York 1983.
- [169] L. Packer (Hrsg.): *Oxygen Radicals in Biological Systems, Methods Enzymol.* 105, Academic Press, New York 1984.
- [170] R. A. Greenwald (Hrsg.): *Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1985.
- [171] R. J. P. Williams in [20a], S. 593.
- [172] D. Evered, J. Nugent, M. O'Connor (Hrsg.): *Biochemistry of Macrophages*, Pitman, London 1986.
- [173] M. N. Hamers, D. Roos in [19], S. 351; S. J. Weiss, G. J. Peppin, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 3189.
- [174] J. Knappe, F. A. Neugebauer, H. P. Blaschkowski, M. Gänzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1332.
- [175] a) P. Reichard, A. Ehrenberg, *Science* 221 (1983) 514; R. Eliasson, H. Jörnvall, P. Reichard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 2373; b) A. M. Lefer, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 123; H. A. Ball, J. A. Cook, W. C. Wise, P. V. Halushka, *Intensive Care Med.* 12 (1986) 116.
- [176] a) A. M. Michelson, J. M. McCord, I. Fridovich (Hrsg.): *Superoxide and Superoxide Dismutases*, Academic Press, London 1977; b) L. Flohé, G. Loschen, *Eur. J. Rheum. Inflammation* 4 (1981) 183.
- [177] H. P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 188.
- [178] A. M. Michelson in [176a], S. 87.
- [179] H. P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 6960.
- [180] G. Rotilio, E. Fioretti, G. Falcioni, F. Brunori in [176a], S. 239.
- [181] R. Zimmermann, L. Flohé, U. Weser, H.-J. Hartmann, *FEBS Lett.* 29 (1973) 117.
- [182] H. P. Misra, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 2151.
- [183] W. Bors, C. Michel, M. Saran, E. Lengfelder, *Biochim. Biophys. Acta* 540 (1978) 162.
- [184] J. Weiss, *Naturwissenschaften* 23 (1935) 64.
- [185] A. M. Michelson in [176a], S. 77.
- [186] J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5753.
- [187] P. F. Knowles, J. F. Gibson, F. M. Pick, R. C. Bray, *Biochem. J.* 111 (1969) 53.
- [188] E. F. Elstner, A. Heupel, S. Vaklinova, *Z. Pflanzenphysiol.* 62 (1970) 184.
- [189] G. Loschen, A. Azzi, C. Richter, L. Flohé, *FEBS Lett.* 42 (1974) 68.
- [190] C. Richter, A. Azzi, U. Weser, A. Wendel in [176a], S. 375.
- [191] B. M. Babior, R. S. Kipnes, J. T. Curnutte, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 741.
- [192] R. B. Johnston, B. B. Keele, H. P. Misra, J. E. Lehmeyer, L. S. Webb, R. L. Baehner, K. V. Rajagopalan, *J. Clin. Invest.* 55 (1975) 1357.
- [193] S. J. Klebanoff, H. Rosen, *Ciba Found. Symp.* 65 (New Ser.), (1979) 263.
- [194] W. S. Thayer, *Chem. Biol. Interact.* 19 (1977) 265.
- [195] N. R. Bachur, S. L. Gordon, M. V. Gee, *Cancer Res.* 38 (1978) 1745.
- [196] J. C. Gage, *Biochem. J.* 109 (1968) 757.
- [197] L. L. Smith, M. S. Rose, I. Wyatt, *Ciba Found. Symp.* 65 (New Ser.) (1979) 321.