

Lorenz Ludwig Hotz

Dr. med.

Zelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Abhängigkeit des Sauerstoff-Partialdrucks

Geboren am 17.08.1978 in Heidelberg

Staatsexamen am 19.10.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Sport- und Leistungsmedizin

Doktorvater: Prof. Dr. phil. H. Mairbäurl

Sauerstoffradikale, die früher als toxisches Abfallprodukt des zellulären Stoffwechsels angesehen wurden, sind tatsächlich wichtige physiologische Moleküle in der Signaltransduktion und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Wahrscheinlich übernehmen sie auch eine Rolle als zellulärer O₂-Sensor, oder zumindest eine Aufgabe in der zellulären Hypoxieantwort. Allerdings ist es nach wie vor unklar, ob die zelluläre ROS-Konzentration sich proportional mit dem PO₂ verändert oder nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher ROS in Abhängigkeit vom PO₂ mit verschiedenen Methoden, als DCF-Fluoreszenz, als Lucigenin-Chemilumineszenz und mittels ESR-Spektroskopie und spin trapping gemessen.

Dabei sollte außerdem untersucht werden, welche Stoffwechselwege für die ROS relevant sind und wie die ROS-Konzentration mit Scavengern beeinflusst werden kann.

Die Messungen wurden an unterschiedlichen Alveolarepithel-Zelllinien – humanen A549-Zellen und primären A2-Zellen von Ratten - durchgeführt, die für 15 Minuten hypoxischen (2 % O₂), normoxischen (21 % O₂) und hyperoxischen (35 % O₂) Bedingungen ausgesetzt wurden.

Mit der DCF-Fluoreszenz an A2-Zellen war in Hypoxie eine Zunahme der Fluoreszenz zu sehen, die bei Reoxygenierung tendenziell rückgängig war. DCF-Fluoreszenz konnte in A549-Zellen nicht gemessen werden.

Mit der Chemilumineszenz sah man eine proportionale Zunahme der ROS-Konzentration zum PO₂. In Hypoxie waren die geringsten ROS-Konzentrationen zusehen, in Hyperoxie die höchsten. Bei Rückkehr aus Hypoxie bzw. Hyperoxie in Normoxie zeigte sich nach Hypoxie

eine Zunahme der ROS-Konzentration, nach Hyperoxie sank sie ab. Bei Hemmung der Atmungskettenkomplexe I und III, bzw. I, II und III nahm die ROS-Konzentration zu. Die O₂-Abhängigkeit ging dabei verloren. Der Radikalscavenger NAC senkte die ROS-Konzentration in den Zellen.

Vorversuche mittels ESR-Spektroskopie zeigten mit Ascorbat als spin trap sowohl in Hypoxie als auch in Hyperoxie eine Zunahme der ROS-Konzentrationen. Kein Signal wurde mit POBN gemessen. Um diese Beobachtung statistisch zu verifizieren, müssten mit dieser Methode weitere Versuche durchgeführt werden.

Die Versuche zeigten eine Abhängigkeit der ROS-Bildung vom PO₂ in Alveolarepithelzellen. Allerdings brachten die verschiedenen Nachweisverfahren unterschiedliche Ergebnisse. Es ist denkbar, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auf der Tatsache beruhen, dass die drei eingesetzten ROS-Nachweisverfahren mehr oder weniger spezifisch unterschiedliche reaktive O₂-Spezies nachweisen. Die Bildung dieser Spezies müsste sich in Hypoxie nicht unbedingt gleichartig verhalten. Es wäre denkbar, dass die O₂^{•-}-Konzentration in Hypoxie sinkt, während die H₂O₂-Konzentration und andere daraus gebildete ROS ansteigen.

Die Hypothese, dass ROS als zelluläre O₂-Sensoren fungieren, scheint nach wie vor zu gelten, jedoch spielen möglicherweise ganz bestimmte Spezies in diesem Prozess eine Rolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher nahe, dass man die Untersuchungen der Bildung einzelner ROS in Hypoxie und Hyperoxie und auch die Suche nach dem zellulären O₂-Sensor spezifizieren muss.