

3 Ergebnisse

3.1 Intramembranäres Tyrosin und Tryptophan wirken als cytoprotektive Strukturen

3.1.1 Tyrosin- und tryptophanhaltige Peptide aus den Transmembranbereichen integraler Membranproteine schützen Zellen vor oxidativem Streß

Zur experimentellen Untersuchung einer eventuellen Redoxaktivität intramembranärer Tyrosin- und Tryptophanreste wurden Peptide synthetisiert, welche in ihren biochemischen Eigenschaften die Transmembranbereiche integraler Membranproteine widerspiegeln sollten. Diese Peptide mußten folgende Eigenschaften erfüllen: Sie sollten relativ kurz sein, damit sie in zellkulturkompatiblen Lösungsmitteln oder Vesikelpräparationen hinreichend löslich wären, und damit die Möglichkeit bestünde, daß sie sich eventuell spontan in zelluläre Membranen einlagern würden. Um dennoch eine hinreichende Lipophilie sicherzustellen, sollten die Peptide ladungsfrei sein, sollten somit also keine geladenen Aminosäuren enthalten, und sie sollten N- und C-terminal entsprechend durch Acetylierung und Amidierung modifiziert sein. Ac-WTAWL-NH₂ (ps-i) wurde gewählt als Bis-Tryptophanyl-Peptid aus einem mehrfach die Membran durchspannenden Protein (Presenilin I), Ac-SLWIPVVA-NH₂ (ingr) ist ein einfaches Tryptophanylpeptid aus der einzigen Transmembrandomäne des Interferon- γ -Receptors, Ac-LSVLPY-NH₂ (cftr) ist ein einfaches Tyrosinylpeptid mit seinem Tyrosinrest im C-terminalen Bereich des Peptids, abgeleitet aus dem *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, und bei Ac-LYLGVVL-NH₂ (na/k) handelt es sich um ein Peptid mit einem einfachen Tyrosinrest im N-terminalen Bereich. Es leitet sich aus der α_1 -Kette der Na⁺/K⁺-transportierenden ATPase ab. Dieses Peptid wurde auch in einer veränderten Form mit Phenylalanin anstelle von Tyrosin (Ac-LFLGVVL-NH₂) als Kontrolle eingesetzt. Es wurden keine weiteren Sequenzmerkmale bei der Auswahl der Peptide herangezogen.

Diese Peptide wurden auf klonalen neuronalen Zelllinien auf antioxidative Eigenschaften untersucht, und Abbildung 3 zeigt Phasenkontrastaufnahmen der entsprechenden unter oxidativen Glutamatstreß gesetzten Zellen.

Sämtliche der genannten tyrosin- und tryptophanhaltigen Peptide waren in der Lage, entweder nach direkter Applikation oder in Form einer Vesikelpräparation mit Lecithin als Träger die hippocampalen HT22-Zellen vor der oxidativen Apoptose, induziert durch niedrige millimolare Konzentrationen an Glutamat, zu schützen. Die Kontrollsequenz zum na/k-Peptid (mit Phenylalanin anstelle von Tyrosin) zeigte keinen Effekt.

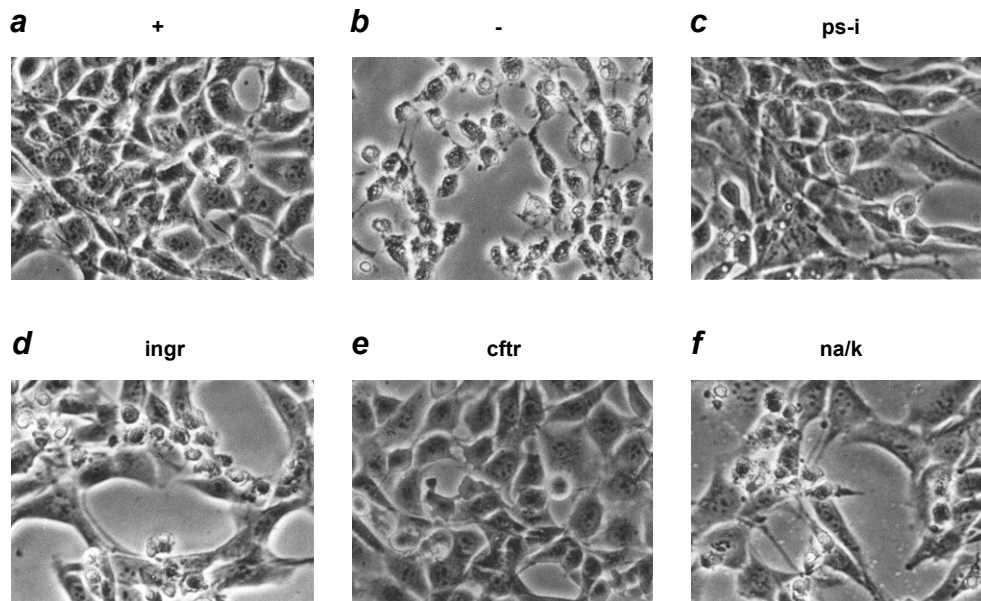


Abbildung 3. Mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen von peptidbehandelten HT22-Zellen unter oxidativem Glutamatstreß.

Unbehandelte Kontrollzellen sind in **a** gezeigt, die Zellen in **b-f** wurden für 16 h mit 2 mM Glutamat behandelt. Die Zellen in **c-f** wurden zusätzlich während dieser Zeit mit 100 μ M der Transmembranpeptide ps-i (**c**), ingr (**d**), cftr (**e**), und na/k (**f**) inkubiert.

Die Bilder zeigen Ausschnitte von 200 x 300 μ m.

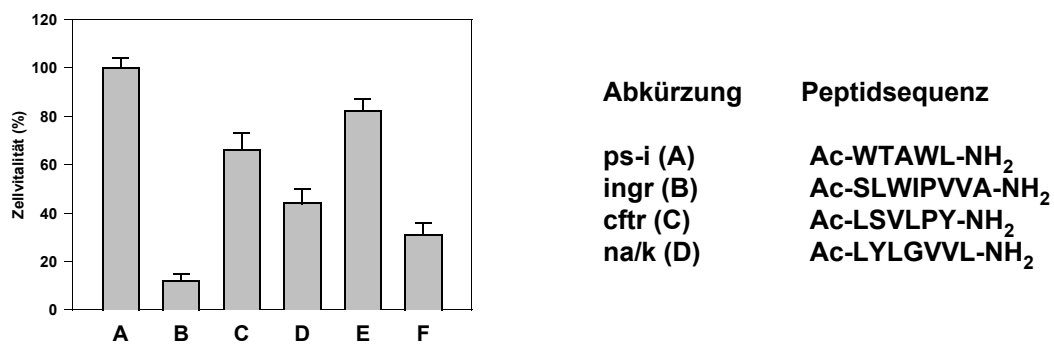


Abbildung 4. Metabolische Zellvitalitäten von peptidbehandelten HT22-Zellen unter oxidativem Glutamatstreß gemäß MTT-Test.

(A) entspricht der unbehandelten Kontrolle, (B) toxinbehandelten Zellen, und (C-F) entsprechen den MTT-Reduktionsraten der Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit 100 μ M der Peptide ps-i (C), ingr (D), cftr (E), und na/k (F). Die Tests wurden beginnend 16 h nach der Zugabe von 2 mM Glutamat durchgeführt. Die Peptidsequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

Abbildung 4 zeigt die Quantifizierung der Überlebensrate der Zellen mittels eines metabolischen MTT-Tests 16 h nach der Behandlung mit 2 mM Glutamat. Die oxidative Glutamatoxizität in HT22-Zellen ist vermutlich eine der molekular am besten charakterisierten exemplarischen experimentellen Kaskaden zum neuronalen Zelltod, und sie wird als wesentlicher Faktor der durch Glutamat verursachten Exzitotoxizität im adulten Gehirn, insbesondere unter pathologischen Bedingungen angesehen (Schubert und Piasecki, 2001). Nach der initialen Hemmung eines Cystin/Glutamat-Antiporters durch extrazelluläres Glutamat sinkt die intrazelluläre Glutathion-Konzentration bei der oxidativen Glutamatoxizität in HT22-Zellen innerhalb von wenigen Stunden auf unter 20 % des Normalwertes. Bleibt dieser Wert für mehrere Stunden unterschritten, unterlaufen die Zellen ein apoptotisches Programm, das Proteinsynthese, Caspaseaktivierung, und die Aktivierung der 12-Lipoxygenase als essentielle biochemische Ereignisse umfaßt (Maher und Schubert, 2000). Die Lipoxygenase-Aktivität führt zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP, welches über einen cGMP-sensitiven Calciumkanal zu einem massiven Calcium-Einstrom führt, welcher der zeitlich letzte identifizierbare Teilprozeß ist, dessen experimentelle Hemmung den initiierten Zelltod noch verhindern kann. Die Lipoxygenase-Aktivität führt parallel auch zu einem massiven, sekundären Anstieg an intrazellulären Oxidantien, welcher nachfolgend zu einem vollständigen Absinken des verbliebenen Restglutathions führt. Die protektive Wirkung von Antioxidantien wird jedoch auf die Verhinderung des initialen Absinkens des Glutathionspiegels zurückgeführt.

3.1.2 Langkettig acylierte, lipophile Tyrosin- und Tryptophanderivate sind cytoprotektive Antioxidantien, nicht jedoch Derivate anderer Aminosäuren

Da sich bei dem Design von Peptiden nach obigen Kriterien für die einzelnen Peptide sehr unterschiedliche Löslichkeiten und vermutlich auch Zellpenetrationsraten ergaben, und da viele der zur Etablierung einer stringenten Struktur-Aktivitäts-Beziehung notwendigen Peptide nach den üblichen Methoden der Festphasensynthese nicht zugänglich waren, vermutlich auf Grund von Löslichkeitsproblemen, wurde zur quantitativen und mechanistischen Analyse des beobachteten cytoprotektiven Effekts ein Ansatz gewählt, der nicht auf kompletten Transmembran-Peptiden und entsprechend veränderten Kontrollpeptiden beruhte, sondern auf Lipiden, die mit einer einzelnen Aminosäure als Kopfgruppe ausgestattet waren (Aminoacyllipide). Es wurden eine Reihe von Aminosäurederivaten insbesondere des Tyrosins und des Tryptophans synthetisiert, die mit einer langkettigen Fettsäure kovalent verknüpft waren, wie beispielsweise N-Dodecanoyl-tyrosinethylester (NDo-Y-OEt), N-

Dodecanoyl-tryptophanethylester (NDo-W-OEt), und N-Dodecanoyl-phenylalaninethylester, NDo-F-OEt. Die chemischen Strukturen einiger der synthetisierten Verbindungen sind in Abbildung 5 dargestellt; ihre Synthese wird im Methodenteil beschrieben.

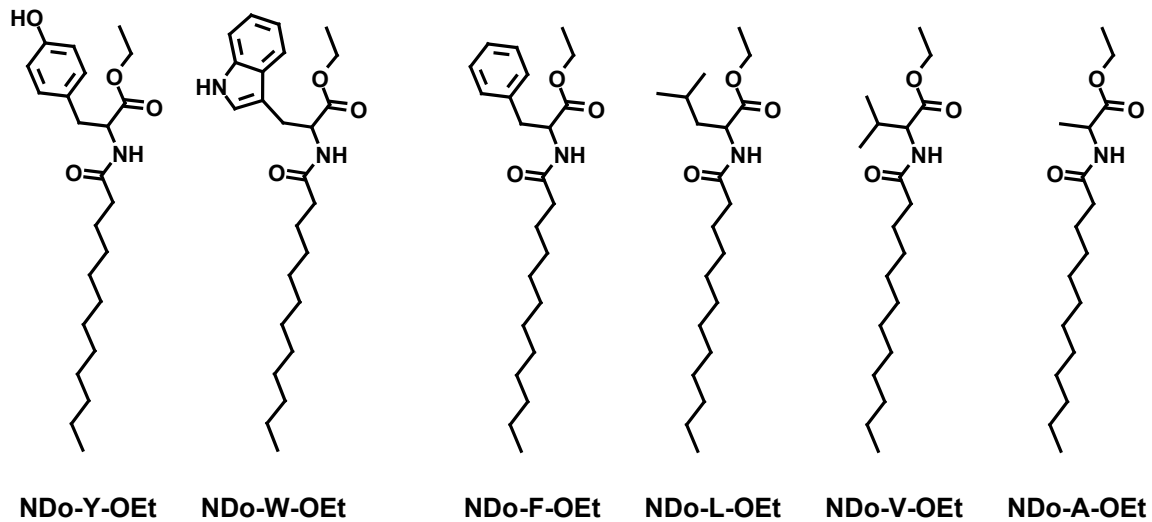


Abbildung 5. Die Strukturen einiger Aminoacyllipide.

NDo-Y-OEt ist N-Dodecanoyl-tyrosinethylester, NDo-W-OEt ist N-Dodecanoyl-tryptophanethylester, NDo-F-OEt ist N-Dodecanoyl-phenylalaninethylester, NDo-L-OEt ist N-Dodecanoyl-leucinethylester, NDo-V-OEt ist N-Dodecanoyl-valinethylester, und NDo-A-OEt ist N-Dodecanoyl-alaninethylester.

Die synthetisierten Substanzen wurden wie die Peptide auf HT22-Zellen auf ihren neuroprotektiven Effekt hin untersucht, und es ergab sich, daß genau und ausschließlich diejenigen Verbindungen eine protektive Wirkung zeigten, die eine Tyrosin- oder Tryptophankopfgruppe verknüpft mit einem langkettigen Fettsäureschwanz enthielten, Lipidderivate des Phenylalanins sowie anderer in Transmembrandonänen häufiger Aminosäuren zeigten jedoch keinen Effekt. In Abbildung 6 sind Photographien verschiedener Zellkultursysteme neuronalen Ursprungs wiedergegeben, die mit den Tryptophan-, Tyrosin- und Phanylalaninlipiden NDo-W-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-F-OEt sowie unterschiedlichen oxidativen Stressoren behandelt wurden. Die linke Spalte in Abbildung 6 zeigt klonale hippocampale HT22-Zellen, die mit Glutamat behandelt wurden. Die Zugabe von 10 μ M NDo-W-OEt bewirkt ein weitgehendes Überleben der Zellen (Abbildung 6g) trotz der gleichzeitigen Zugabe von 2 mM Glutamat, welches in ansonsten unbehandelten Kulturen zum fast vollständigen Verlust an morphologisch intakten (Abbildung 6d) und metabolisch aktiven (Abbildung 7) Zellen führt. Eine ebenfalls ausgeprägte protektive Aktivität zeigte in gleicher Konzentration die Tyrosinverbindung N-Dodecanoyl-tyrosinethylester NDo-Y-OEt

(Abbildung 6j), wohingegen N-Dodecanoyl-phenylalaninethylester NDo-F-OEt keinen Effekt zeigte (Abbildung 6m, Abbildung 7).

Auch bei der Verwendung von primären cerebellären Neuronen zeigte sich ein weitgehend identisches Protektionsmuster der Aminoacyllipide gegen das Neurotoxin S-Butylhomocysteinsulfoximin (BSO) (Abbildung 6, mittlere Spalte). Tryptophan- und Tyrosinlipide schützen vor oxidativem Zelltod, Phenylalaninlipide hingegen nicht. BSO führt über die Hemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase zu einem graduellen Absinken des intrazellulären Glutathionspiegels, wodurch verschiedene enzymatische antioxidative Systeme wie die Glutathionperoxidasen oder Glutathiontransferasen ihre Wirkung verlieren und sich dadurch ein erhöhter Gleichgewichtszustand an intrazellulären und insbesondere membranären Hydroperoxiden aufbaut, welcher zum Kollaps zuerst der dendritischen Strukturen, später auch der Zellkörper primärer Neurone führt (Abbildung 6e versus 6b). Ein solches Absinken des intrazellulären Glutathions wird bereits in den Frühphasen der Parkinsonschen Erkrankung und der Neuropathie mit Lewy-Körpern beobachtet, weswegen ihm eine kausale Rolle in deren Neuropathologie zugeschrieben wird (Gu *et al.*, 1998). Die intraventrikuläre Injektion von BSO gilt auch als Tiermodell für diese Erkrankungen.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse von metabolischen Zellüberlebenstests (MTT-Tests) für sowohl die HT22-Zellen wie die cerebellären Primärneurone gezeigt, die die morphologischen Resultate sowie die Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die Aminoacyllipide auch quantitativ bestätigten. Eine weitere qualitative Bestätigung waren ebenfalls die organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (Abbildung 6, rechte Spalte), welche durch Zugabe von Wasserstoffperoxid über mehrere Tage hinweg unter eine Form des subakuten, jedoch direkten oxidativen Stresses gesetzt wurden. In Abbildung 6f ist gezeigt, daß das verwendete Protokoll in den hippocampalen Schnitten nach drei Tagen unter Peroxidstreß zu einem deutlichen Zelltod im Bereich der neuronalen Zellkörper sowohl in der Region des *cornu ammonis* sowie des *gyrus dentatus* führt. Gezeigt ist eine Färbung mit Propidiumiodid, einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der intakte Zellmembranen nicht penetrieren kann und der durch seine Fluoreszenz dadurch partiell oder vollständig lysierte Zellen anzeigt. In Abbildung 6i (10 μ M NDo-W-OEt) und Abbildung 6l (10 μ M NDo-Y-OEt) ist trotz Peroxidzugabe nur eine relativ geringe Zellyse zu sehen, was für einen antioxidativen Effekt dieser Substanzen spricht, der auch Protektion gegen direkt oxidative Toxine vermittelt. Die zelluläre Akkumulation von Wasserstoffperoxid gilt insbesondere für die Alzheimersche Erkrankung und für die Trisomie 21 als gesichert und möglicherweise auch als neuropathologisch kausal (Behl *et al.*, 1994; Busciglio und Yankner, 1995).

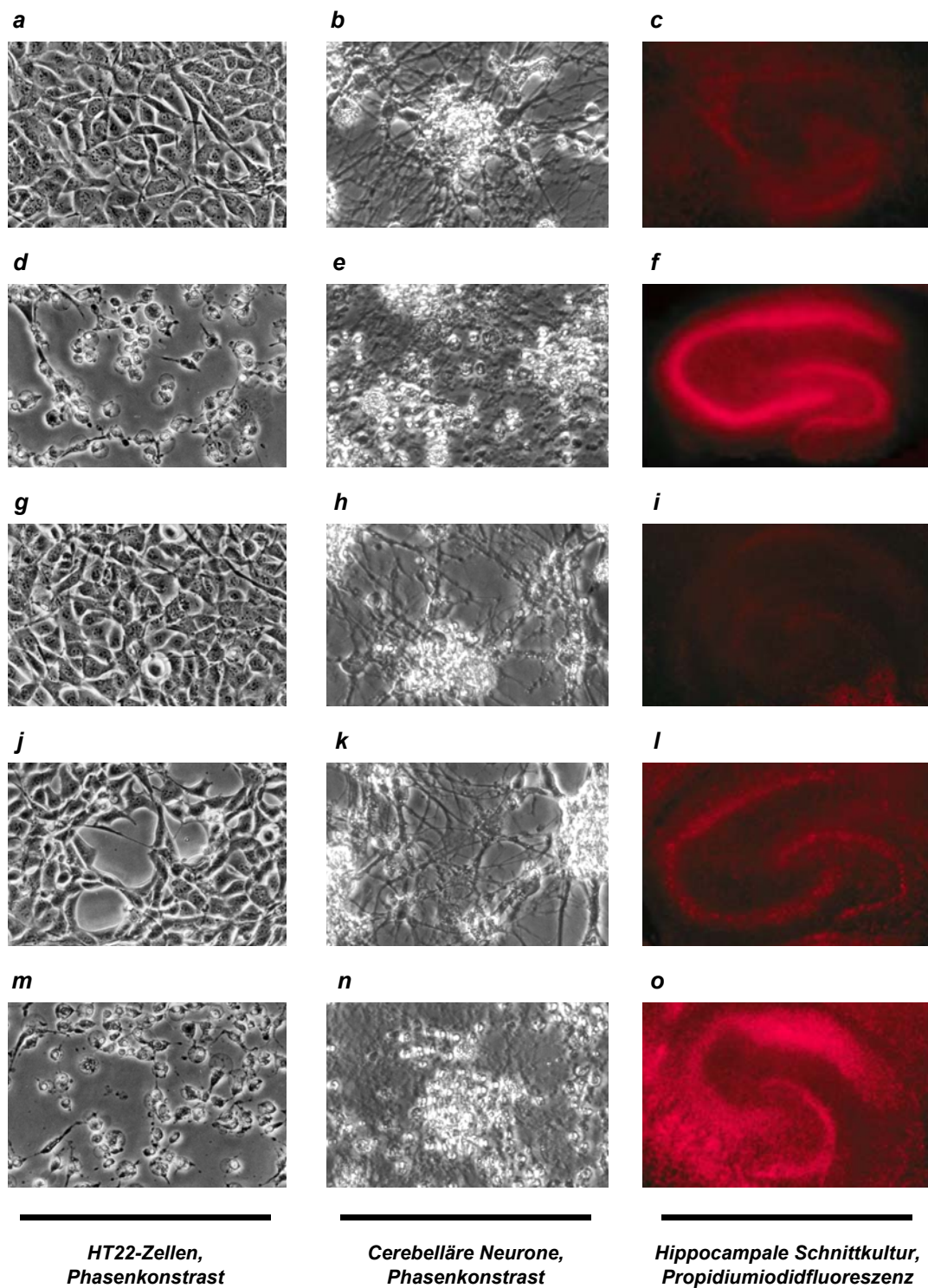


Abbildung 6. Cytoprotektion durch Aminoacyllipide in hippocampalen HT22-Zellen, primären cerebellären Neuronen, und in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen.

Die linke Spalte zeigt Phasenkontrastaufnahmen von HT22-Zellen, die für 16 h mit 2 mM Glutamat behandelt wurden, die mittlere Spalte zeigt Aufnahmen von primären cerebellären Neuronen unter BSO (48 h Inkubation

mit 800 μM BSO), die rechte Spalte sind fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Propidiumiodid-gefärbten hippocampalen Schnittkulturen nach 72 h Inkubation mit 500 μM Wasserstoffperoxid. *a* bis *c* sind unbehandelte Kontrollkulturen, *d* bis *f* sind ausschließlich mit dem jeweiligen Toxin behandelte Negativkontrollen. In allen Fällen sind deutliche neurotoxische Effekte erkennbar. In *g* bis *i* wurden die Zellen zeitgleich mit dem Toxin auch mit 10 μM NDo-W-OEt behandelt, in *j* bis *l* wurde 10 μM NDo-Y-OEt appliziert, und in *m* bis *o* wurden 10 μM NDo-F-OEt eingesetzt. NDo-W-OEt führt in allen Fällen zu einer fast vollständigen Verhinderung der Neurotoxizität, NDo-Y-OEt vermittelt ebenfalls eine weitgehende Protektion. NDo-F-OEt zeigt hingegen keine erkennbaren protektiven Effekte.

Die Photographien der dissoziierten Zellkulturen zeigen 200 x 300 μm , die Schnittkulturbilder zeigen Ausschnitte von 2 x 3 mm.

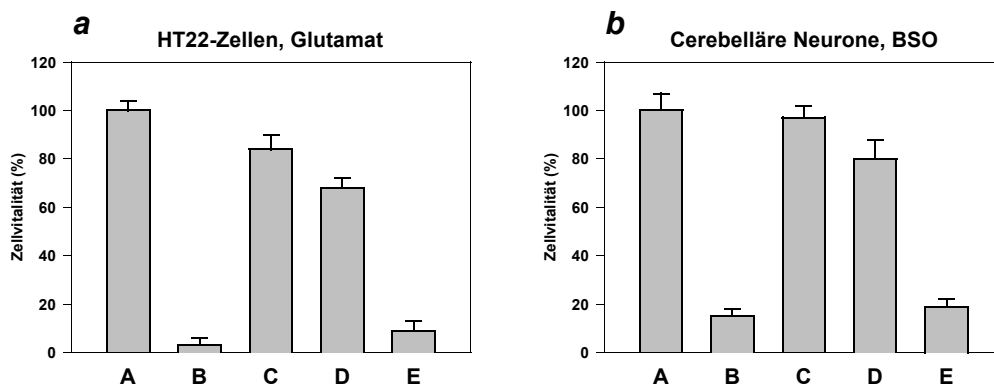


Abbildung 7. Quantifizierung des differenziellen cytoprotektiven Effektes von NDo-W-OEt, NDo-Y-OEt, und NDo-F-OEt in klonalen neuronalen Zellen und primären Neuronen.

Hippocampale HT22-Zellen und cerebelläre Neurone wurden nach Toxin- und Aminoacyllipid-Behandlung wie in Abbildung 6 beschrieben mittels MTT-Test auf metabolische Aktivität in den überlebenden Zellen untersucht. In *a* sind die Resultate für HT22-Zellen gezeigt, in *b* die Ergebnisse für primäre Neurone. In beiden Diagrammen ist (A) die unbehandelte Positivkontrolle, (B) die Negativkontrolle, (C) entspricht 10 μM NDo-W-OEt, (D) ist 10 μM NDo-Y-OEt, und (E) ist 10 μM NDo-F-OEt. Die metabolischen Tests bestätigen die fast vollständige Protektion neuronaler Zellen vor oxidativer Glutamatoxizität und pharmakologisch herbeigeführter Glutathiondepletion durch NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt sowie die Unwirksamkeit von NDo-F-OEt.

Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Vierfachbestimmungen.

In Tabelle 1 ist eine vollständige Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung der antioxidativ-neuroprotektiven Wirkung von Tyrosin und Tryptophan sowie zu den pharmakologisch halbmaximal wirksamen Konzentrationen (EC_{50} -Werten) gegeben. Mit weitgehender Übereinstimmung zwischen den beiden hier verwendeten neuronalen Zellkultursystemen, HT22-Zellen und primären cerebellären Neuronen zeigen Tryptophanlipide einen sehr potenten protektiven Effekt, wobei die genaue chemische

Struktur des Lipophilie verleihenden Ankers keine große Rolle zu spielen schien. Sowohl N-Dodecanoyl-tryptophanethylester (NDo-W-OEt), N-Palmitoyl-tryptophanethylester (NPa-W-OEt) als auch N-Oleoyl-tryptophanethylester (NOl-W-OEt) sind mit EC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich cytoprotektiv. Dasselbe gilt für den N-Dodecanoyl-tyrosinethylester NDo-Y-OEt. Bis zu einer getesteten Konzentration von 200 μ M ergaben sich für die Dodecanoyl-Derivate von Leucin, Valin und Alanin, deren Strukturen ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt sind, im Gegenzug jedoch keinerlei antioxidative oder zellschützende Effekte (Tabelle 1). Da von einem ähnlichen Zellpenetrations- und Verteilungsmuster dieser Substanzen ausgegangen werden kann, stellen die indolischen und phenolischen Kopfgruppen der Tryptophan- und Tyrosinlipide offenbar essentielle Strukturmerkmale für den cytoprotektiven Effekt dar. Die besondere Bedeutung der Lipophilie und mithin der intramembranären Topologie des Tyrosins und Tryptophans für ihren cytoprotektiven Effekt ergab sich deutlich aus der völligen Unwirksamkeit sämtlicher getesteter Derivate dieser Aminosäuren ohne einen langkettigen Fettsäureschwanz. Weder die Aminosäure selbst noch ihre Ethylester noch ihre N-Acyl-Derivate noch die N-Acyl-Derivate der Ester zeigten einen zellschützenden Effekt bis zu einer Konzentration von 1 mM.

| EC ₅₀ -Wert (µM) | HT22-Zellen, Glutamat | Primärneurone, BSO |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| NDo-W-OEt | 0,8 | 1,5 |
| NDo-Y-OEt | 3,5 | 7 |
| NDo-F-OEt | kein Effekt | kein Effekt |
| NDo-L-OEt | kein Effekt | kein Effekt |
| NDo-V-OEt | kein Effekt | kein Effekt |
| NDo-A-OEt | kein Effekt | kein Effekt |
| NPa-W-OEt | 15 | 3 |
| NOI-W-OEt | 8 | 2 |
| W | kein Effekt | - |
| Y | kein Effekt | - |
| F | kein Effekt | - |
| W-OEt | kein Effekt | - |
| Y-OEt | kein Effekt | - |
| F-OEt | kein Effekt | - |
| NAc-W | kein Effekt | - |
| NAc-Y | kein Effekt | - |
| NAc-F | kein Effekt | - |
| NAc-W-OEt | kein Effekt | - |
| NAc-Y-OEt | kein Effekt | - |
| NAc-F-OEt | kein Effekt | - |

Tabelle 1. Halbmaximal wirksame Konzentrationen (mikromolare EC₅₀-Werte) verschiedener Derivate von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin in Cytoprotektionsexperimenten.

Die gezeigten EC₅₀-Werte wurden durch Extrapolation von Zellvitalitätskurven bestimmt, die mittels des MTT-Tests erzeugt wurden. Für jeden Wert wurden mindestens acht Konzentrationen, jeweils als Dreifachbestimmung, ausgewertet. Die Toxinbehandlung war wie in Abbildung 6 beschrieben (HT22-Zellen unter 2 mM Glutamat für 16 h; primäre Neurone unter BSO für 48 h). Die Substanzen mit langkettiger Fettsäure (Dodecanoyl, Palmitoyl, Oleoyl) wurden bis zu einer Konzentration von 200 µM appliziert, alle anderen Verbindungen bis zu einer Konzentration von 1 mM. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; NAc steht für N-Acetyl, OEt steht für Ethylester. Ausschließlich langkettig acyliertes Tyrosin und Tryptophan zeigen protektive Effekte, die in klonalen und primären Zellen auch trotz der unterschiedlichen verwendeten Toxine von etwa gleicher Stärke sind.

3.1.3 Die cytoprotektiven Wirkungen lipophiler Tyrosin- und Tryptophanderivate lassen sich mit ihren direkten biochemischen Antioxidanseigenschaften erklären

Um die beobachteten cyto- und neuroprotektiven Effekte bezüglich ihres antioxidativen Anteils zu charakterisieren, wurden die Peptidstruktur cfr (Ac-LSVLPY-NH₂) und die beiden Aminoacyllipide NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt in einer Reihe quantitativer biochemischer Experimente näher untersucht. Ein Vergleich der gemessenen halbmaximal wirksamen Konzentrationen dieser Substanzen über verschiedene zellbiologische, biochemische und naßchemische Experimente hinweg ergab, daß die Substanzen eine sehr reproduzierbare antioxidative Aktivität aufwiesen, insbesondere auch in zellfreien Experimenten (Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, daß auch in den zellbiologischen Experimenten weitere zelleigene Systeme wie Enzyme, Rezeptoren oder Signalmoleküle nicht oder nur partiell für die bewirkte Cytoprotektion verantwortlich sind. Vielmehr scheint es sich bei der protektiven Aktivität um eine chemisch-strukturell begründete, physikalische Wirkung zu handeln, die als Folge die beobachteten biologischen Effekte nach sich zieht. In Abbildung 8 werden cfr, NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt in Wasserstoffperoxid-gestreßten NIH3T3-Fibroblasten (Abbildung 8a) und Glutamat-gestreßten HT22-Zellen (Abbildung 8b) verglichen. Die pharmakologischen Dosis-Wirkungskurven bezüglich des Zellüberlebens sind in beiden Fällen weitgehend identisch. Vergleichbare Kurven ergaben sich jedoch auch, wenn man nicht das Zellüberleben als Meßparameter heranzog, sondern zu einem früheren Zeitpunkt vor der Lyse der Zellen den zellulären Peroxidgehalt (Abbildung 8c). Der zur Peroxidmessung verwendete Fluoreszenzfarbstoff Dichlorfluoresceindiacetat (DCFA) wird zwar in der Literatur oft als Marker für den gesamten intrazellulären Peroxidgehalt bezeichnet, aufgrund seiner lipophilen Struktur und dem Bild unter dem Fluoreszenzmikroskop, das besonders auch die Membranen gefärbt zeigt (nicht abgebildet), muß davon ausgegangen werden, daß er in bevorzugtem Maße mit Lipidhydroperoxiden reagiert und somit weitgehend diese Spezies quantifiziert. Ebenfalls sehr ähnliche Wirksamkeiten wie in den Neuroprotektionsversuchen zeigen die getesteten Verbindungen bei der Verhinderung der Lipidperoxidation in einer kortikalen Lipidpräparation (Abbildung 8d). Selbst wenn das experimentelle System noch weiter reduziert wird, in Abbildung 8e zu einer chemisch definierten, mit Linolsäure beladenen Vesikelpräparation, die durch Kupfersulfat in sauerstoffhaltiger wäßriger Lösung autooxidiert wird, so zeigen sich immer noch klare Effekte der untersuchten Tryptophan- und Tyrosinverbindungen. Dasselbe galt auch für die direkte Oxidation von Linolsäure durch *tert*-Butylhydroperoxid (Abbildung 8f). Die qualitativ vorhandene sowie quantitativ vergleichbare Effektgröße der Substanzen über alle diese Systeme, die sich abgestuft vom komplexen

zellbiologischen System bis zum chemisch definierten Oxidationssystem erstreckten, führt zu der Schlußfolgerung, daß die den antioxidativen Wirkungen zugrundeliegenden Mechanismen in allen Experimenten identisch oder einander sehr ähnlich sind.

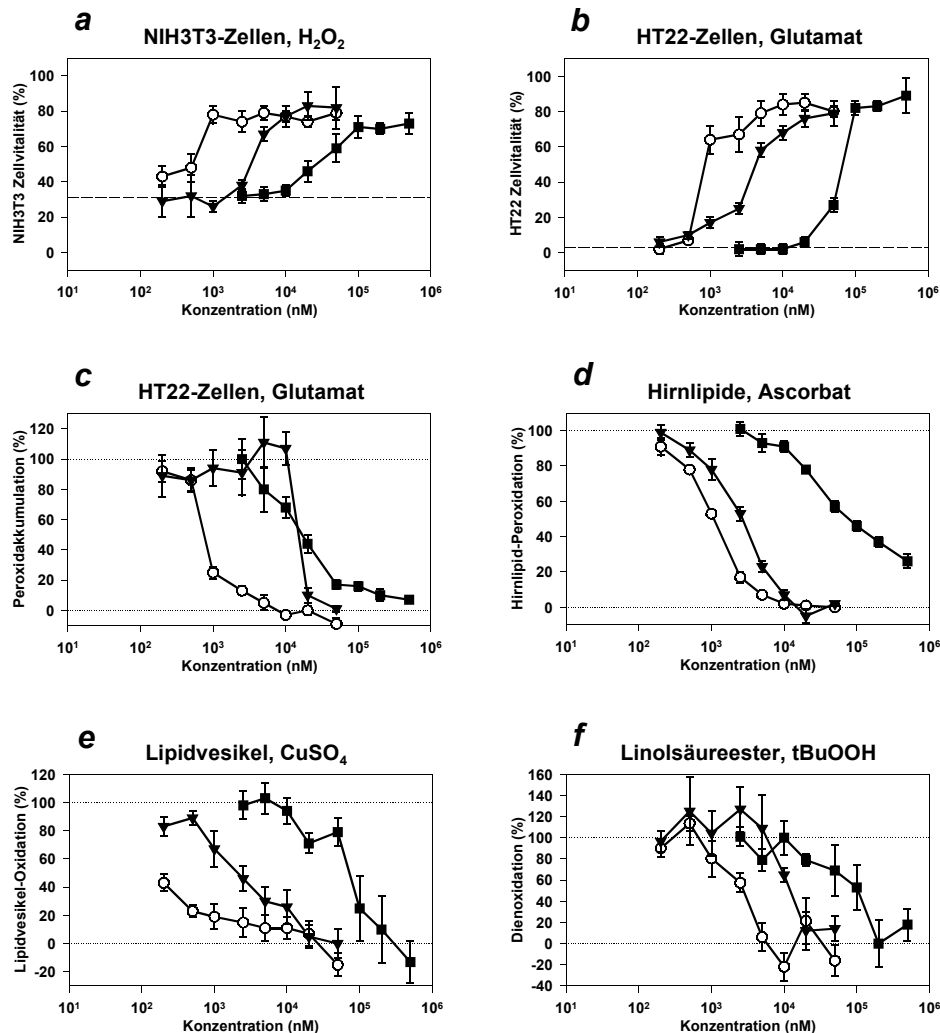


Abbildung 8. Dosis-Wirkungs-Analyse von NDo-W-OEt, NDo-Y-OEt, und cfr in verschiedenen zellbiologischen und biochemischen Oxidationsexperimenten.

a, Cytoprotektion vermittelt durch cfr (■), NDo-Y-OEt (&), und NDo-W-OEt (○) in NIH3T3-Fibroblasten, die mit 220 µM Wasserstoffperoxid für 16 h unter oxidativen Streß gesetzt wurden. Die gestrichelte Linie zeigt die Überlebensrate der nur mit dem Toxin behandelten Kontrollzellen an. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. **b,** Cytoprotektionskurven von Glutamat-behandelten HT22-Zellen gemäß Vierfachbestimmung durch MTT-Tests nach 16 h Inkubation mit dem Toxin. Aus diesen und entsprechenden Kurven für weitere Substanzen wurden die halbmaximal wirksamen Konzentrationen in Tabelle 1 ermittelt. **c,** intrazelluläre Peroxidakkumulation in HT22-Zellen nach Glutamatbehandlung (1,6 mM) für 10 h. Die gepunkteten Linien

dienen zur Verdeutlichung der 0 % und 100 % -Niveaux. Es sind die Ergebnisse von Vierfachbestimmungen gezeigt. *d*, Lipidperoxidation in einer Membranpräparation aus adultem Rattenhirn. Zur Induktion einer oxidativen Kettenreaktion wurden die Membranen für 6 h bei 37°C mit 50 µM Ascorbat inkubiert, welches kooperativ mit membrangebundenen, endogenen Metallionen einen Teil der endogenen Lipidhydroperoxide zersetzt. Die daraus resultierenden freien Radikale halten die Lipidperoxidationsreaktion aufrecht. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. *e*, Oxidation von mit Linolsäureethylester dotierten Lipidvesikeln aus Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholin 6 h nach der Zugabe von 10 µM CuSO₄. Es sind Doppelbestimmungen gezeigt. *f*, Oxidation von Linolsäureethylester durch 10 mM *tert*-Butylhydroperoxid nach 4 h Inkubation bei 50°C. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Die direkte antioxidative Wirkung der Aminoacyllipide im Sinne des Abfangens reaktiver freier Radikale konnte auch durch Elektronenspinresonanz-Experimente gezeigt werden. Wie in Abbildung 9 dargestellt ist, verringern NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt, nicht jedoch NDo-F-OEt den Flux an freien Radikalen aus dem thermischen Zerfall von *tert*-Butylhydroperoxid, einer häufig verwendeten Modellschubstanz für das Verhalten von membranären Lipidhydroperoxiden. Als Indikator für den Radikalfluß wurde die Oxidation der Spintrap-Verbindung N-*tert*-butyl- α -phenylnitron (PBN) herangezogen, die durch reaktive und deswegen kurzlebige und nur sehr schwer meßbare radikalische Oxidantien zu einem sehr stabilen Nitroxylradikal oxidiert wird, dessen Spin im Resonanzexperiment nachweisbar ist. Der direkte Nachweis des vermutet intermediär auftretenden Tyrosinyl- oder Tryptophanylradikals mittels ESR gelang nicht, möglicherweise wegen der zu geringen Lebensdauer dieser Spezies unter den gewählten Bedingungen. Auch in der Literatur sind nur sehr wenige direkte Messungen frei diffusibler Tyrosinradikale zu finden, und die Signalintensitäten überragen das Hintergrundrauschen oft nur um das Zweifache (Pietraforte und Minetti, 1997a,b).

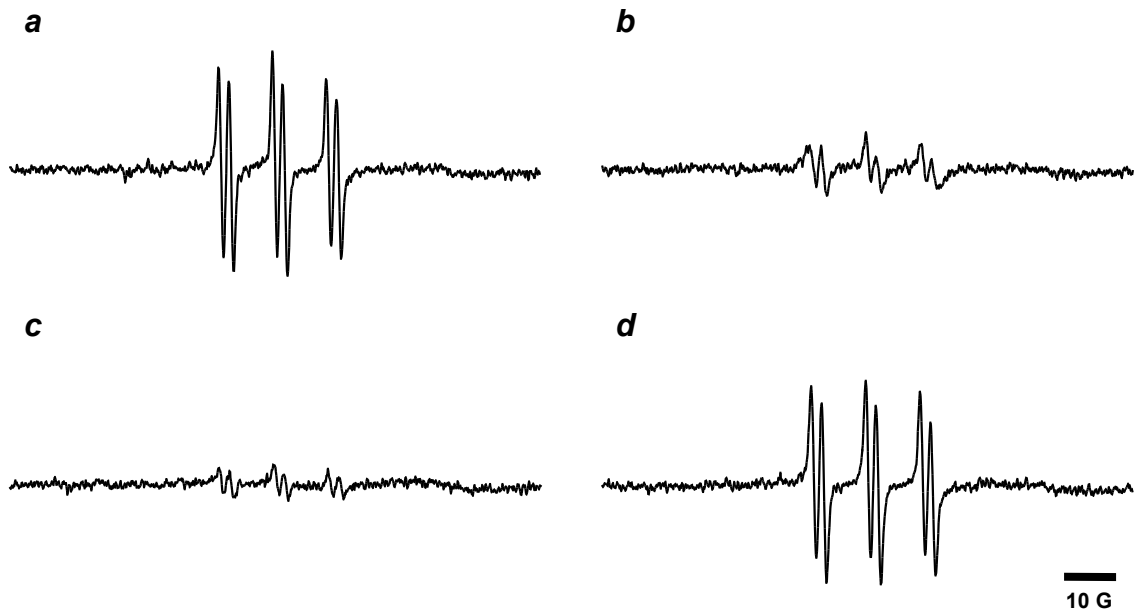


Abbildung 9. Direkter ESR-spektroskopischer Nachweis der Spinquencher-Eigenschaften von NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt im Vergleich zu NDo-F-OEt.

Die Oxidation der Spintrap-Verbindung PBN (50 mM) durch *tert*-Butylhydroperoxid in reinem Ethanol führt nach 8 h bei 75°C zu einem deutlichen paramagnetischen Nitroxyl-Signal (**a**). In **b** wurde eine stöchiometrische Menge des Tryptophanyl lipids NDo-W-OEt (50 mM) in einem identischen Ansatz coinkubiert; in **c** war dies das Tyrosinyl lipid NDo-Y-OEt, und in **d** das Phenylalaninyl lipid NDo-F-OEt. Die ESR-Experimente bestätigen somit das in den zellbiologischen und biochemischen Versuchen beobachtete Aktivitätsmuster der drei Aminoacyllipide NDo-W-OEt, NDo-Y-OEt und NDo-F-OEt als Antioxidantien.

Die pharmakologische, cytoprotektive Potenz der synthetisierten Aminoacyllipide mit Tyrosin- und insbesondere Tryptophankopfgruppe ist, verglichen mit physiologischen oder anderen chemisch-synthetischen Antioxidantien, hoch. In Tabelle 2 sind die in zwei unabhängigen Zellkulturrexperimenten zur antioxidativen Neuroprotektion ermittelten halbmaximal wirksamen Konzentrationen von NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt mit denen von einigen anderen Monophenolen (Tocopherol, Tetrahydrocannabinol, Estradiol), Polyphenolen (Resveratrol, Quercetin, Genistein), Thiolen (N-Acetylcystein, Glutathion), und synthetischen Substanzen (PBN, Trolox C, U74389G) verglichen. NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt erreichen von den untersuchten Substanzen zusammen mit Tetrahydrocannabinol und Tocopherol die höchsten Wirksamkeiten bei der Verhinderung des oxidativen neuronalen Zelltods.

| EC ₅₀ -Wert (μM) | HT22-Zellen, Glutamat | SK-N-MC-Zellen, Wasserstoffperoxid |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Genistein | kein Effekt | kein Effekt |
| Epigallocatechingallat | kein Effekt | kein Effekt |
| Urat | kein Effekt | kein Effekt |
| Bilirubin | kein Effekt | kein Effekt |
| β-Carotin | kein Effekt | kein Effekt |
| N-t-Butylphenylnitron | kein Effekt | kein Effekt |
| U74389G | kein Effekt | kein Effekt |
| Ergothionein | kein Effekt | 900 μM |
| Catechin | 400 μM | 100 μM |
| Glutathion | 70 μM | 700 μM |
| N-Acetylcystein | 70 μM | 600 μM |
| Trolox C | 40 μM | 20 μM |
| 17β-Estradiol | 13 μM | 10 μM |
| Resveratrol | 10 μM | 5 μM |
| 2,4,6-Trimethylphenol | 8 μM | 3 μM |
| Quercetin | 6 μM | 4 μM |
| NDo-Y-OEt | 3,5 μM | 2,5 μM |
| 4-Dodecylphenol | 1,5 μM | 2,5 μM |
| Tetrahydrocannabinol | 1,2 μM | 1,0 μM |
| NDo-W-OEt | 0,8 μM | 0,7 μM |
| α-Tocopherol | 0,2 μM | 0,2 μM |

Tabelle 2. Halbmaximal wirksame Konzentrationen (mikromolare EC₅₀-Werte) verschiedener endogener, exogener und pharmakologisch-synthetischer Antioxidantien im Vergleich mit NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt in zwei experimentellen Systemen zum neuronalen Zelltod.

Die gezeigten EC₅₀-Werte wurden in analoger Weise ermittelt wie diejenigen in Tabelle 1. Als Zellsysteme wurden klonale hippocampale Neurone aus der Maus (HT22) und humane Neuroblastomzellen (SK-N-MC) verwendet. Die HT22-Zellen wurden für 16 h mit 2 mM Glutamat behandelt, bei den SK-N-MC-Zellen wurde Wasserstoffperoxid (150 μM für 24 h) als Toxin eingesetzt. Im Falle der Angabe „kein Effekt“ wurde bis zu einer getesteten Konzentration von 1 mM keine cytoprotektive Wirkung beobachtet, oder die jeweilig untersuchte Substanz war bereits bei einer geringeren Dosis selbst cytotoxisch. Die Verbindungen NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt stellen sich demnach als relativ potente Antioxidantien dar.

3.2 Sekretorische Peptidhormone sind biochemische Antioxidantien

3.2.1 LHRH, Enkephalin, Angiotensin und Oxytocin verhindern die Oxidation von globulären Proteinen, LDL und neuronalen Membranen

Die Beobachtung, daß endogen vorkommende, aus den Transmembrandomänen verschiedener Membranproteine abgeleitete Peptidsequenzen eine profunde cytoprotektive Aktivität nach einem antioxidativen Mechanismus entfalten können, eröffnete die Möglichkeit, daß auch andere endogene Peptide, die in vivo direkt als solche vorliegen, antioxidative Wirkungen entwickeln könnten. Unter Ausnutzung der Erkenntnis, daß Tyrosin und Tryptophan im membranären Kompartiment die Träger antioxidativer Eigenschaften sind, wurden einige wichtige humane, tyrosin- und tryptophanhaltige Peptidhormone auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Die Sequenzen dieser Peptidhormone sind in Tabelle 3 gezeigt.

| Peptidhormon | Struktur |
|----------------|---------------------------------|
| LHRH (Mensch) | PyrHWSYGLRPG-amid |
| FSHRF | PyrHWSHDWKPG-amid |
| Leu-Enkephalin | YGGFL |
| Met-Enkephalin | YGGFM |
| Oxytocin | CYIQNCPLG-amid (oxidierte Form) |
| Vasopressin | CYFQNCPRG-amid (oxidierte Form) |
| Angiotensin I | DRVYIHPFHL |
| Angiotensin II | DRVYIHPF |

Tabelle 3. Die Peptidsequenzen einiger tyrosin- und tryptophanhaltiger menschlicher Peptidhormone, die auf antioxidative Eigenschaften hin untersucht wurden. Die Sequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; die Tyrosin- und Tryptophanreste sind durch Fettdruck hervorgehoben. Pyr steht für Pyroglutamat.

Da die Peptidhormone ihrer Aminosäurestruktur nach zu urteilen wesentlich hydrophiler waren als die synthetisierten Transmembranpeptide, wurden drei verschiedene Oxidationsexperimente zu ihrer Charakterisierung benutzt, welche unterschiedliche Anforderungen an die Lipophilie und Diffusion potentiell antioxidativer Moleküle stellen. Die Oxidation des globulären Proteins B-Phycoerythrin durch Peroxylradikale ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung der generellen Reaktivität wasserlöslicher Substanzen

gegenüber freien Radikalen, die Verhinderung der Oxidation des Low-Density-Lipoproteins (LDL) erfordert sowohl antioxidative Eigenschaften eines Moleküls sowie amphiphile Löslichkeit im wässrigen Kompartiment als auch im lipidischen LDL-Partikel selbst. Die Peroxidation vesikulärer Hirnmembranlipide schließlich wird sehr stark durch die Lipophilie eines Antioxidans beeinflusst. Die differentiell antioxidativen Eigenschaften der vier Peptidhormone Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH), Enkephalin, Angiotensin und Oxytocin in diesen Systemen sind in Abbildung 10 dargestellt.

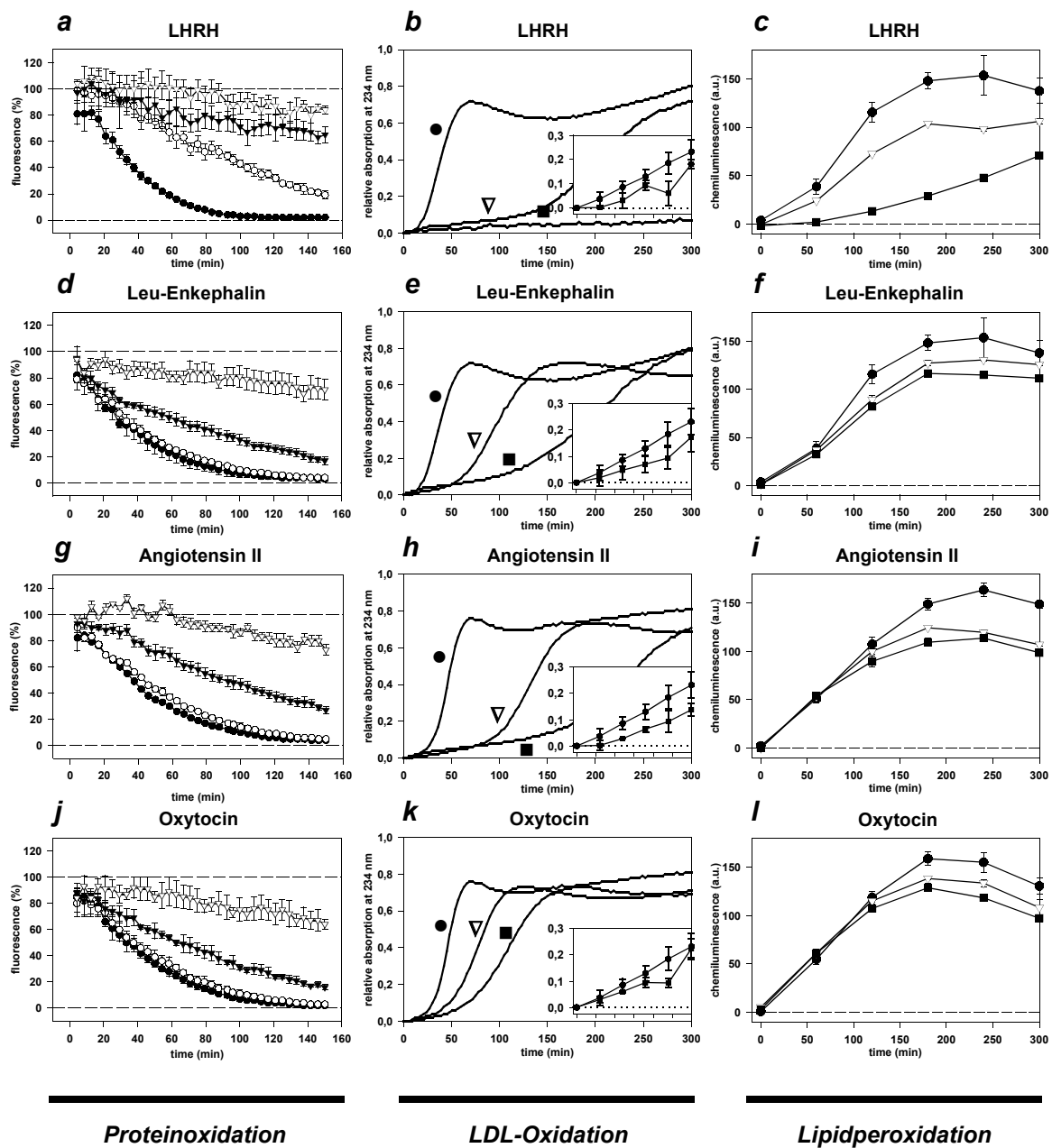


Abbildung 10. Antioxidative Eigenschaften sekretorischer Peptidhormone.

Linke Spalte: Peptidhormone schützen globuläre Proteine vor der oxidativen Zerstörung durch Peroxylradikale. Das Symbol (#) steht für die nur mit dem Radikalinitiator behandelte Kontrolle, (○) steht für 200 nM, (&) steht für 2 μM, und (∇) steht für 20 μM der Peptidhormone LHRH (**a**), Leu-Enkephalin (**d**), Angiotensin II (**g**), und Oxytocin (**j**). Im Falle von LHRH (**a**) ist die Konzentration von 200 nM bereits höher als seine halbmaximal antioxidativ wirksame Konzentration in diesem Experiment. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Mittlere Spalte: Humanes Blutplasma-LDL wird von sekretorischen Peptiden vor der Autooxidation durch Kupfersulfat geschützt. (#) ist die Kontrolle, (∇) steht für 20 μM, und (!) steht für 100 μM der Peptide LHRH (**b**), Leu-Enkephalin (**e**), Angiotensin II (**h**), und Oxytocin (**k**). Die jeweils eingefügten Kurven zeigen die Ergebnisse analoger Versuche der LDL-Oxidation mit dem Radikalinitiator AIBN anstelle von Kupfersulfat. Auch hier zeigen alle Peptide einen signifikanten Effekt (Peptidkonzentration 100 μM). Die Ergebnisse von Doppelbestimmungen sind gezeigt.

Rechte Spalte: Sekretorische Peptidhormone verhindern partiell die Oxidation neuronaler Lipidmembranen. Die Symbole sind verwendet wie oben angegeben. (**c**) ist LHRH, (**f**) ist Leu-Enkephalin, (**i**) ist Angiotensin II, und (**l**) steht für Oxytocin. Das relativ hydrophobe Peptid LHRH ist ein effektives Membrantantioxidans, die anderen Peptide zeigen eine teilweise Verhinderung der Lipidperoxidation. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

Die linke Spalte in Abbildung 10 verdeutlicht die antioxidative Potenz aller vier Peptidhormone als direkte Fänger freier, durch die Zersetzung der Azo-Verbindung 2,2'-Azo-bis-(2-methylpropionamidin) (AIBN) in situ erzeugter Radikale in wässrigem Milieu. Enkephalin, Angiotensin und Oxytocin schützten das fluoreszierende Protein Phycoerythrin mit halbmaximal wirksamen Konzentrationen von etwa 2 μM vor oxidativer Zerstörung, während LHRH bei 200 nM Konzentration bereits mehr als halbmaximal wirksam war. Ein vergleichbares Ergebnis in diesem Experiment wurde auch für die anderen, in Tabelle 3 angegebenen Peptidhormone, die mit den getesteten eng verwandt sind, erhalten. In der mittleren Spalte von Abbildung 2 wird die antioxidative Kapazität der sekretorischen Peptidhormone gegen die Metallionen-katalysierte Oxidation von humanem LDL illustriert. Alle vier gestesteten Peptide inhibierten bei 20 μM Konzentration signifikant die Bildung konjugierter Diene in den LDL-Partikeln. Da die Wirksamkeit der Peptide nicht vom molaren Verhältnis von Kupfer zu Peptide abhing, und da sich die Absorptionsspektren der Peptide nicht durch Kupferzugabe veränderten (nicht gezeigt), war eine potentielle Komplexbildung der Kupferionen mit den Peptiden vermutlich nicht ursächlich für den beobachteten Effekt. In Übereinstimmung hierzu zeigten alle Peptide auch einen signifikanten präventiven Effekt gegen die direkte, Metallionen-unabhängige Oxidation von LDL durch AIBN (mittlere Spalte Abbildung 8, Einfügungen). Auch bezüglich der Verhinderung der Hirnlipid-Peroxidation durch Ascorbat zeigte LHRH die höchste Wirksamkeit, während die anderen gestesteten

Peptide nur relativ geringe Wirkungen zeigten. Eine strukturelle Ursache hierfür könnte die gegenüber den anderen, terminal ladungstragenden Peptidhormonen höhere Lipophilie des LHRHs sein, welches nur eine ladungstragende Seitenkette enthält (Tabelle 3).

3.2.2 Die antioxidativen Eigenschaften der Peptidhormone beruhen auf ihrem Gehalt an Tyrosin und Tryptophan

Die essentiellen strukturellen Komponenten des antioxidativen Effekts sekretorischer Peptidhormone sollten durch die Untersuchung trunkierter und derivatisierter Versionen der beiden Peptide LHRH und Leu-Enkephalin weiter eingegrenzt werden. In Abbildung 11 ist gezeigt, daß die antioxidative Aktivität von LHRH gegen Peroxylradikale von seinen Aminosäuren Tryptophan(3) und Tyrosin(5) abhängig ist. Während LHRH(3-10) noch die gleiche Aktivität wie LHRH(2-10) und LHRH besitzt (Abbildung 11b, 11a und 10a), verringert sich die Aktivität in LHRH(4-10), welches keinen Tryptophanrest mehr besitzt, deutlich (Abbildung 11c). Die Entfernung des verbliebenen Tyrosinrestes, wie in LHRH(7-10), führt zu einem völlig unwirksamen Peptid (Abbildung 11d). Analog hierzu beruht die antioxidative Aktivität von Leu-Enkephalin ausschließlich auf der phenolischen Gruppe seines Tyrosin(1)-Restes. Des-Tyr-Leu-Enkephalin ist gleichermaßen unwirksam wie am Tyrosin Hydroxylgruppen-sulfatiertes Leu-Enkephalin (Abbildung 11e und 11f). Tyrosin und Tryptophan sind demnach unabhängige Träger antioxidativer Aktivität in Peptidhormonen, wobei die besonders hohe Aktivität von LHRH auch auf eine mögliche intramolekulare Kooperativität hindeuten könnte. Der intramolekulare Radikalaustausch zwischen sterisch benachbartem Tyrosin und Tryptophan in Proteinen ist häufig ein essentieller Bestandteil intra-proteinischer Redoxketten, wie beispielsweise in der Ribonukleotidreduktase R1/R2 (Jordan und Reichard, 1998) oder in der DNA-Photolyase (Aubert *et al.*, 2000). Ab initio-Berechnungen haben gezeigt, daß in Peptiden dieser Transfer vermutlich mit Deprotonierungs- und Protonierungsprozessen einhergeht (Li und Liu, 2001). Ob ein solcher Austausch auch bei den gemessenen antioxidativen Effekten eine Rolle spielt, ist jedoch nicht sicher. Ein Beispiel für ein ausschließlich Tryptophan-, doch nicht Tyrosin-tragendes Peptidhormon mit potenten antioxidativen Eigenschaften ist der Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Factor (FSHRF) (Tabelle 3).

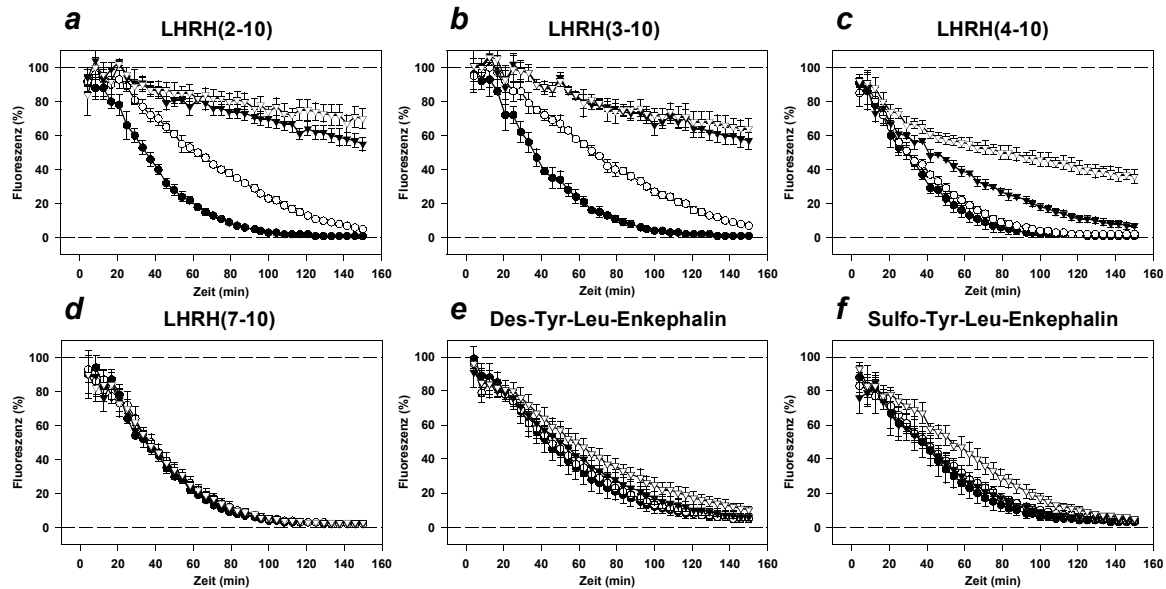


Abbildung 11. Struktur-Wirkungs-Beziehung der antioxidativen Eigenschaften von Peptidhormonen.

Es sind die Peroxylradikalfänger-Eigenschaften von (a) LHRH(2-10), (b) LHRH(3-10), (c) LHRH(4-10), (d) LHRH(7-10), (e) Des-Tyr-Leu-Enkephalin, und (f) Sulfo-Tyr-Leu-Enkephalin dargestellt. (#), Kontrolle; (○), 200 nM; (&), 2 µM; (∇), 20 µM. Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichungen aus Vierfachbestimmungen. Die antioxidativen Eigenschaften der Peptide beruhen auf ihren Tyrosin- und Tryptophananteilen.

3.2.3 Peptidhormone wirken als Spinquencher und reagieren direkt mit freien Radikalen

Zur näheren Charakterisierung des antioxidativen Effektes der Peptidhormone wurden ESR-Experimente durchgeführt, die von parallel dazu konzipierten massenspektroskopischen Untersuchungen begleitet wurden. Die Resultate dieser Experimente für das Modellhormon Leu-Enkephalin sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Koinkubation des lipophilen, spontanen Radikalinitiators 1,1'-Azo-bis-(1-cyanocyclohexan) (ACCH) mit der Spintrap-Verbindung PBN führt zu einem deutlichen paramagnetischen Signal des entstehenden Nitroxyls im ESR-Experiment; das Massenspektrum derselben Inkubation zeigt keine nennenswerten Peaks mit einer Größe über 400 atomaren Masseneinheiten an (Abbildung 12b und 12a). Die Zugabe einer geringen Menge an Leu-Enkephalin zu einem solchen Versuchsansatz (5 mM des Peptids, 50 mM PBN, 100 mM ACCH) führt bereits zu einer deutlichen Schwächung des paramagnetischen Signals im Spinresonanzexperiment, und das parallel dazu angefertigte Massenspektrum zeigt, daß das zugegebene Peptid beinahe vollständig oxidiert wird (Abbildung 12d und 12c), was sich mit dem hohen Überschuß an Radikalinitiator in diesem Experiment erklären läßt. Der Peak für das native Peptid (556,4 amu) macht nur einen kleinen

Teil der detektierbaren Ionen aus, und es überwiegen oxidierte Spezies wie einfach (582,0 amu) und zweifach (556,4 amu) cyanyliertes Enkephalin, welche vermutlich aus der Reaktion des Peptids mit dem Initiatorradikal Cyanocyclohexyl entstehen. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf 50 mM führt zu einer weiteren Verringerung der paramagnetischen Aktivität und zieht gleichzeitig eine relativ gesehen geringere Oxidation des Peptid selbst nach sich (Abbildung 12f und 12e). Überdies verändert sich auch das Muster der entstehenden Oxidationsprodukte, insbesondere treten deutliche Mengen an Peptiddimeren auf. Die wichtigsten Peaks sind in der Legende zu Abbildung 12 strukturell zugeordnet. Es ist auffällig, daß in diesem Experiment zwar kein Dimer des nativen Peptids gebildet wird (1111,5 amu), jedoch alle Dimere detektierbar sind, die zumindest ein bereits oxidiertes Monomer inkorporieren (1137,5; 1153,8; und 1199,5 amu). Offenbar entstehen die gemessenen Dimere durch die Reaktion eines bereits durch eine primäre Oxidation aktivierten, möglicherweise radikalisierten Monomers mit einem zweiten Peptid-Monomer. Da im Leu-Enkephalin-Molekül nur die Tyrosinposition als Ort der kovalenten Dimerisierung in Frage kommt, findet infolgedessen auch die vorhergehende Aktivierung beziehungsweise Radikalisierung höchstwahrscheinlich an dieser Position statt. Die Aktivierung des Peptids durch Cyanylierung findet demgemäß also an den ortho-Positionen des phenolischen Tyrosins statt, und die Dimerbildung stellt eine sekundäre Relaxationsreaktion dar. Diese Schlußfolgerung wird auch durch die Detektion zweifach cyanylierter Monomere (608,2 amu) und die Unwirksamkeit von Des-Tyr-Leu-Enkephalin (nicht gezeigt) untermauert. Die Dimerisierung ist ein für verschiedene phenolische Antioxidantien wie beispielsweise Flavonoide beobachteter Relaxationsprozeß auf oxidative Modifikationen hin, von dem vermutet wird, daß er für die antioxidative Wirkung dieser Substanzen von Bedeutung ist (Valcic *et al.*, 2000).

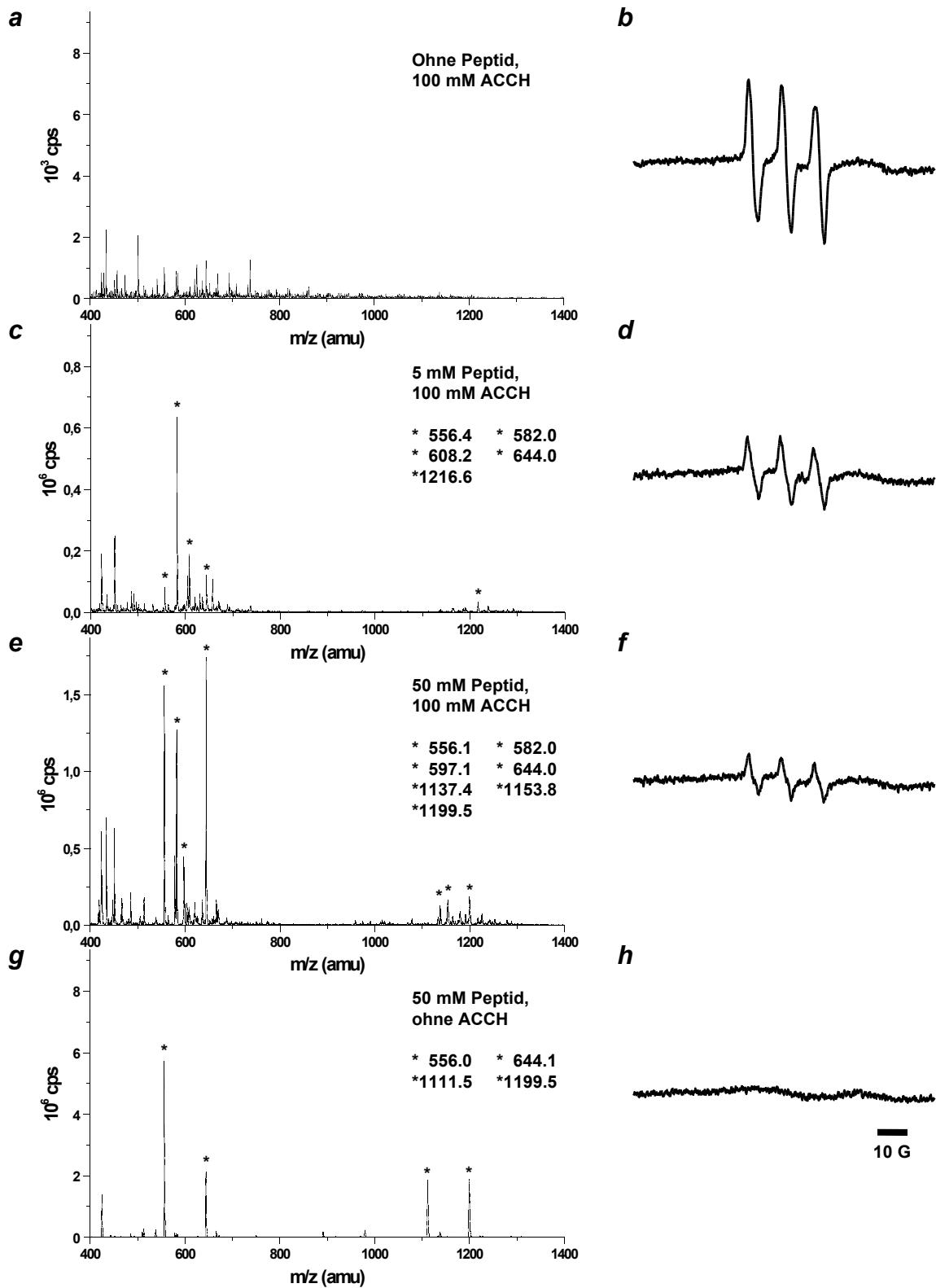


Abbildung 12. Sekretorische Peptidhormone sind direkte Spinquencher und werden durch freie Radikale zu spezifischen Reaktionsprodukten oxidiert.

Links sind Elektronenspray-Ionisations-Massenspektren verschiedener Inkubationen der Spintrap PBN mit dem Radikalinitiator ACCH mit oder ohne verschiedene Konzentrationen des exemplarisch untersuchten Peptids

Leu-Enkephalin abgebildet; rechts gegenübergestellt sind diesen Massenspektren die dazugehörigen ESR-Spektren aus jeweils identischer Inkubation. Bei den Massenspektren wurden verschiedene Ordinateneinheiten verwendet.

Die Inkubation der Verbindung PBN mit dem Radikalinitiator allein zeigt keine signifikanten Peaks mit einer Masse oberhalb von 400 amu (**a**); PBN wird jedoch deutlich oxidiert (**b**). 5 mM Leu-Enkephalin unterdrücken teilweise die Bildung von PBN-Spinaddukten (**d**); das Peptid (556.4 amu) wird beinahe vollständig von Cyanidradikalen oxidiert (582.0 und 608.2 amu, **c**). Eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf 50 mM führt zu einer weiteren Verringerung der Spinresonanz (**f**), während nurmehr ein Teil dieser größeren Peptidmenge oxidiert wird (**e**). Verschiedene dimere Peptidreaktionsprodukte treten auf. Ohne Radikalinitiator treten keine freien Radikale auf (**h**), während Leu-Enkephalin teilweise mit PBN reagiert (644.1 amu) und dimerisiert (1111.5 amu, **g**).

Die markierten MS-Peaks können als die folgenden Strukturen interpretiert werden (,Peptid' = Leu-Enkephalin, ,Dimer' = Bis(Leu-Enkephalin)): 556, Peptid; 582, Peptid-CN; 597, Peptid-C(CH₃)NH; 608, Peptid(-CN)₂; 644, Peptid-N(OH)C(CH₃)₃; 1111, Dimer; 1137, Dimer-CN; 1153, Dimer-C(CH₃)NH; 1199, Dimer-N(OH)C(CH₃)₃; 1216, Dimer(-CN)₄. Der Balken in **h** zeigt 10 Gauß an.

Mittels ihrer Tyrosin- und Tryptophanreste sind sekretorische Peptidhormone auch in der Lage, mit reaktiven Stickstoffspezies wie Peroxynitrit zu reagieren. Abbildung 13a zeigt, daß LHRH, Enkephalin, Angiotensin und Oxytocin mit etwa vergleichbarer Effizienz reaktive Stickstoffspezies abfangen, die sich aus Stickstoffmonoxid, freigesetzt aus Sperminnonoat, in wäßriger Lösung unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck bilden. Als Maß für die Aktivität dieser reaktiven Spezies in Lösung wurde die induzierte Lumineszenz von 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (Luminol) herangezogen. Eine in der verwendeten Konzentration von 100 µM weitgehend vollständige Verhinderung der oxidativen Modifikation von Phycoerythrin durch in situ aus 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) graduell erzeugtes Peroxynitrit belegt Abbildung 13b. Auch bei Verwendung von exogenem, in einem Zuge hinzugefügtem Peroxynitrit in hoher Dosis (100 µM) ergaben sich bei vergleichbarem Versuchsansatz signifikante, wenn auch nicht ganz so ausgeprägte protektive Effekte wie bei langsam in situ aus Stickstoffmonoxid und Superoxid erzeugtem Peroxynitrit (Abbildung 13c). Eine mögliche physiologische Bedeutung der Potenz dieser Effekte wird durch einen in Abbildung 13d gezeigten Wettbewerbsversuch mit humanem Hämoglobin nahegelegt. Hämoglobin gilt als einer der wichtigsten physiologischen Senken für reaktive Stickstoffspezies, und bei Verwendung von SIN-1 als Quelle dieser Spezies zeigt LHRH sich in der Lage, partiell mit Hämoglobin zu konkurrieren und dieses Protein vor einer sich im UV/VIS-Spektrum widerspiegelnden strukturellen Veränderung an den Hämgruppen zu schützen.

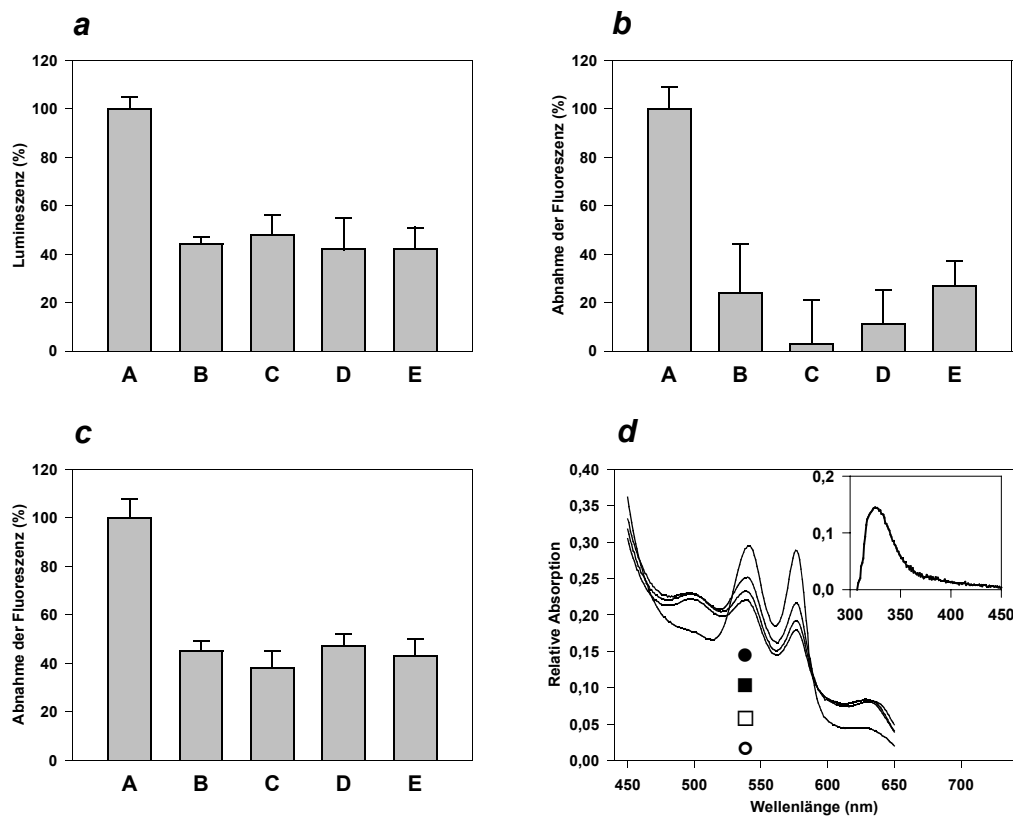


Abbildung 13. Peptidhormone interagieren mit reaktiven Stickstoffspezies.

a, Stimulation der Lumineszenz von Luminol durch den Stickstoffmonoxid-Donor Sperminnonoat. Es ist **(A)** die Kontrolle, **(B)** ist LHRH, **(C)** ist Leu-Enkephalin, **(D)** ist Angiotensin II, und **(E)** ist Oxytocin. Die Peptidkonzentration betrug 100 μ M. Die vier getesteten Peptide zeigen alle eine vergleichbare, signifikante Aktivität bei der Unterdrückung der Reaktivität reaktiver Stickstoffspezies. **b**, Verlust der Phycoerythrin-Fluoreszenz als Marker für strukturelle Veränderungen in diesem Protein als Folge der Inkubation mit SIN-1, einem kombinierten Donor von Stickstoffmonoxid und Superoxid, der dadurch auch eine Quelle von Peroxynitrit darstellt. Die Konzentrationen und die Substanzzuordnungen entsprechen denjenigen in **a**. **c**, Protektion von Phycoerythrin vor exogen zugegebenem Peroxynitrit durch 100 μ M der Peptidhormone. Die Peptide unterdrücken strukturelle Veränderungen in diesem Protein bewirkt durch sowohl latentes als auch akutes Peroxynitrit. **d**, UV/VIS-Spektrum von humanem Blutplasmahämoglobin (Hb); (#), Kontrolle; (o), mit SIN-1 behandeltes Hb; (') , mit SIN-1 und 200 μ M LHRH behandeltes Hb; (!), mit SIN-1 und 5 mM LHRH behandeltes Hb. Bei 200 μ M LHRH liegen das Peptid (200 μ M \approx 200 mg/l) und Hämoglobin (5 μ M \approx 320 mg/l) etwa in identischen w/v-Konzentrationen vor. Die Einfügung in **d** zeigt das Differenzspektrum von SIN-1-behandeltem LHRH (100 μ M) versus durch Vorinkubation bereits zerfallenem SIN-1 plus LHRH, was die Nicht-Interferenz des LHRH mit dem photometrischen Meßprinzip anzeigt sowie indiziert, daß die aromatischen Reste von LHRH mit Peroxynitrit reagiert haben.

Um das rein strukturelle Potential von Peptiden als Antioxidantien abzuschätzen, wurden weitere Versuche zur antioxidativen Unterdrückung des fluoreszenzlöschenden Effekts von Peroxylradikalen auf Phycoerythrin durchgeführt, wobei die Peptide mit klassischen, doch strukturell sehr unterschiedlichen Antioxidantien verglichen werden sollten. Als Vergleichsantioxidantien wurden Melatonin, Serumalbumin, α -Tocopherol und 17β -Estradiol gewählt. Melatonin und Estradiol sind gut charakterisierte antioxidative Hormone (Reiter, 1995; Behl *et al.*, 2000), bei denen eine Dichotomie von endokrinologischer Wirkung und antioxidativ-regulatorischer Wirkung angenommen werden kann. Melatonin ist überdies strukturell mit Tryptophan verwandt, weswegen ein Vergleich mit den Peptidhormonen aufschlußreich erscheint. Serumalbumin ist das Hauptplasmaprotein des Blutes, und ihm werden verschiedene Redox-regulatorische Funktionen im vaskulären Gewebe zugeschrieben (Halliwell, 1998). Tocopherol wurde als das vermutlich wichtigste niedermolekulare Membranantioxidans gewählt (Ricciarelli *et al.*, 2001). Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abbildung 14 dargestellt. Im Vergleich mit Melatonin zeigte LHRH eine signifikant höhere Wirkung beim Abfangen von Peroxylradikalen (Abbildung 14b versus 14a). Auch gegenüber Serumalbumin war das Decapeptid LHRH leicht überlegen, dies trotz der Tatsache, daß Albumin bei einer Molekülmasse von 66 kDa zwei Tryptophan- und 20 Tyrosinreste besitzt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß in wasserlöslichen, globulären Proteinen im nativen Zustand Tyrosin und Tryptophan meist im hydrophoben Kernbereich verborgen sind und nicht in der Regel in direktem Solvenskontakt stehen. Auch die höhere Diffusionskonstante von LHRH und die freie Beweglichkeit seiner aromatischen Seitengruppen könnte eine Rolle spielen. Auch im Vergleich mit den beiden lipophilen Antioxidantien α -Tocopherol und 17β -Estradiol zeigt LHRH eine deutlich beziehungsweise leicht höhere Wirksamkeit (Abbildung 14 e und 14f versus 14d). In rein struktureller Hinsicht scheinen kurze Peptide somit ungewöhnlich hohe Effektivitäten entfalten zu können.

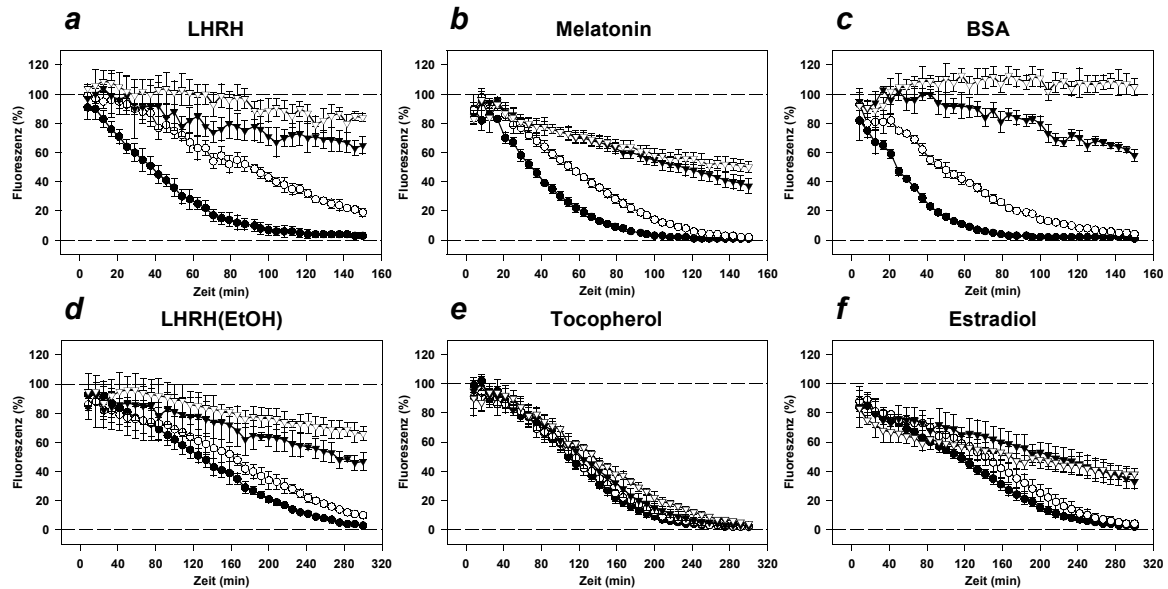


Abbildung 14. LHRH als Antioxidans im Vergleich mit Melatonin, Albumin, Tocopherol und Estradiol.

Abbildung *a* zeigt die protektiven Effekte von LHRH gegen Peroxylradikale wie in Abbildung 10 dargestellt. In *b* wurde Melatonin (5-Methoxytryptamin), in *c* Serumalbumin in identischer molarer Konzentration untersucht. LHRH hat gemäß des Fluoreszenzverlustes bei 200 nM Protetktor die höchste antioxidative Potenz dieser Verbindungen. In *d-f* wird LHRH mit den beiden lipophilen Antioxidantien α -Tocopherol und 17β -Estradiol verglichen, was wegen eines finalen Ethanolgehaltes von 0,5 % im Ansatz zu veränderten Kontrollkurven führte. LHRH ist in diesen Experimenten auch deutlich effektiver als die beiden Monophenole Tocopherol und Estradiol. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus Vierfachbestimmungen.