

Sauerstoff in biologischen Systemen

K. H. Winterhalter *

Friedrich-Miescher-Institut, CIBA-GEIGY AG, Basel

Summary

The toxicity of oxygen through the generation of superoxide anions is discussed. Superoxide dismutase as a detoxifying principle in aerobic cells and organelles is described. Superoxide generation as a byproduct of methemoglobin autooxidation is characterized and its implication in normal and thalassemic erythrocytes is discussed.

«Sauerstoff ist giftig.» Mit diesem Satz beginnt I. Fridovich einen kürzlich erschienenen Artikel [1]. Obwohl diese Aussage auf den ersten Blick überrascht, da ja die meisten Lebewesen O_2 für ihren Metabolismus brauchen, lässt sich die Giftigkeit des Sauerstoffs leicht nachweisen, wie wir gleich sehen werden.

Die ersten heute noch nachweisbaren Zellen traten auf der Erde vor ungefähr $3,4 \times 10^9$ Jahren auf [2]. Zu diesem Zeitpunkt enthielt die Atmosphäre im wesentlichen CO_2 , H_2O , Ammoniak und Methan, aber keinen freien Sauerstoff, welcher seinem Entstehen nach eigentlich eher als ein Abfallprodukt denn als eine metabolische Notwendigkeit der lebenden Materie zu betrachten ist. Wasserstoff war in dieser Atmosphäre nur sehr wenig vertreten, da die Schwerkraft der Erde nicht ausreicht, ihn in ihrem Gravitationsfeld zu halten (Abb. 1). Hingegen stand dem Leben während der letzten 3,5 Milliarden Jahre immer Wasser in flüssiger Form zur Verfügung [2].

* PD Dr. K. H. Winterhalter, Friedrich-Miescher-Institut, Postfach 237, CH-4002 Basel

Die ersten photosynthetischen Algen, welche damit begannen, O_2 in die Atmosphäre abzugeben, traten vor etwa 2×10^9 Jahren auf, und vor rund 600×10^6 Jahren hat die Atmosphäre einen O_2 -Gehalt erreicht, welcher die Entwicklung der heutigen aeroben Organismen nötig machte. Für die bisherigen, anaeroben Organismen,

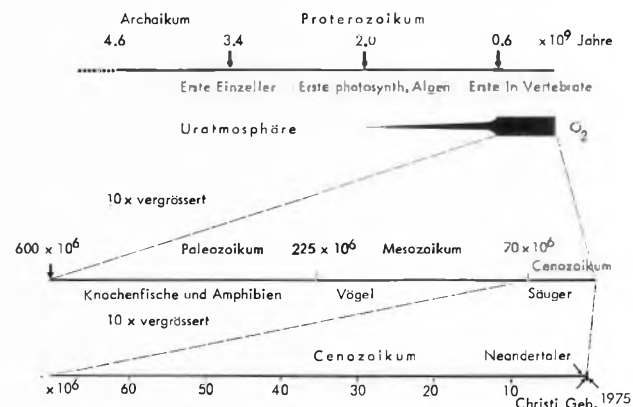


Abb. 1: Entwicklung der O_2 -haltigen Atmosphäre und Entstehung höherer Organismen

welche während rund $2,8 \times 10^9$ Jahren die Erde bevölkert hatten, bedeutete das Auftreten von O_2 eine Vergiftung der Atmosphäre, also, um ein Modewort zu gebrauchen, Luftverschmutzung. Es musste somit ein besonderer Mechanismus herangezogen werden, um mit dieser neuen Situation fertigzuwerden. Andererseits hat das Auftreten des molekularen Sauerstoffes in

der Atmosphäre natürlich der belebten Materie auch völlig neue Möglichkeiten der Entwicklung eröffnet. Allen bisher untersuchten aeroben Organismen, vom Bakterium bis zum Menschen, ist denn auch ein Merkmal gemeinsam, das allen auch heute noch vorkommenden Anaerobiern fehlt, das Vorhandensein der Superoxiddismutase [3]. Es handelt sich hierbei um ein Enzym, welches das überall aus atmosphärischem Sauerstoff entstehende Superoxidanion entgiften kann. Das Fehlen dieses Enzyms hat die Anaerobier in ganz besondere ökologische Nischen verbannt. Was ist nun dieses ubiquitär auftretende Superoxidanion? Die in Abb. 2 dargestellte Reaktion ist nur ein Beispiel für

Autooxidation

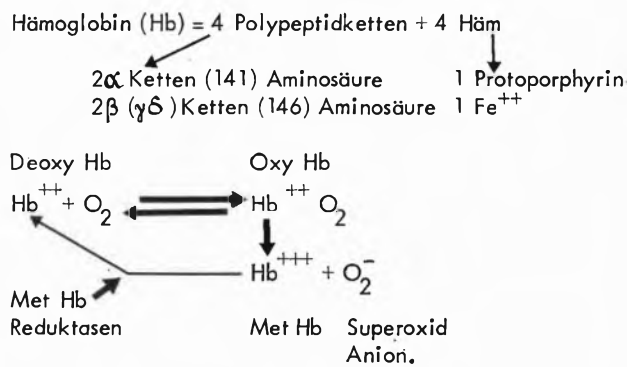


Abb. 2: Die Entstehung von Superoxid aus Oxyhämoglobin

eine – im Erythrozyten allerdings bedeutsame – Reaktion, welche zu seiner Bildung führt. Ich möchte jedoch betonen, dass zahlreiche enzymatische und nicht enzymatische Vorgänge Superoxidanionen freisetzen, so dass in jeder aeroben Zelle, ja in jedem Zellkompartiment wirksame Entgiftungsmechanismen vorhanden sein müssen, falls die Zelle überleben soll. In unserem Beispiel entsteht aus Oxyhämoglobin Methämoglobin und Superoxid. Das Methämoglobin ist nicht mehr zum O₂-Transport fähig. Jede rote Blutzelle enthält zu jedem Zeitpunkt geringe Methämoglobin-Mengen. Die Zelle verfügt jedoch über geeignete Systeme, welche das dreiwertige Eisen rückreduzieren. Das weitere Schicksal des entstandenen Superoxidanions ist in Abb. 3 illustriert. Die angegebene Bildung von H₂O₂ aus dem Superoxid läuft natürlich auch spontan ab, jedoch sehr viel langsamer, so dass messbare Mengen von O₂⁻ sich in der Zelle anhäufen. Nimmt aus irgendeinem Grund die intrazelluläre O₂⁻-Konzentration zu (siehe unten) und überschreitet die Kapazität des Entgiftungssystems, ergeben sich zahlreiche Nebenreaktionen, wie z. B. Reduktion von Cytochrom c, die Oxidation von Epinephrin zu Adrenochrom, ein Vorgang, der zur Messung des Superoxids ausgenutzt werden kann [4], und wie wir noch sehen werden, Peroxidation von Lipiden der Zellmembran.

Das Protein, welches diese Nebenreaktionen verhindert, liegt in verschiedenen Formen vor. Im Cytoplasma eukaryoter – also höherer Zellen – findet sich

Die Dismutase-Reaktion

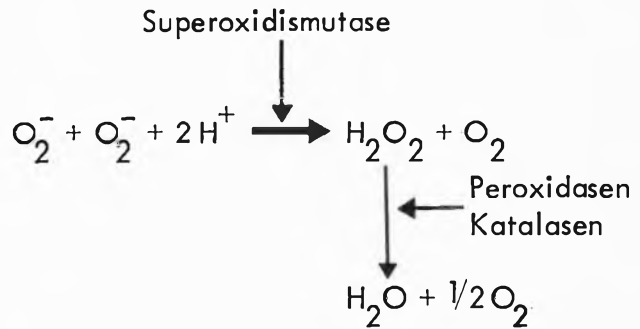


Abb. 3: Die Dismutase-Reaktion

ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 32500, und zwar enthalten menschliche Erythrozyten etwa 160 mg% [5]. Enzym dieses Typs findet sich in allen bisher untersuchten eukaryoten Zellen, wenn auch von Spezies zu Spezies Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu beobachten sind. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, die untereinander mit einer Disulfidbrücke verbunden sind. Das dimere Protein enthält 2 Cu⁺⁺-Atome, welche für die katalytische Aktivität erforderlich sind, und 2 Zn⁺⁺ [6, 7, 8]. Es hat eine blaugrüne Farbe, welche bei Entfernung des Kupfers verschwindet.

In prokaryoten Zellen (z. B. Bakterien) – und interessanterweise auch in Mitochondrien – findet sich eine andere Dismutase, die eine weinrote Farbe aufweist, ein Molekulargewicht von 40000 hat und deren Untereinheiten ausschliesslich durch nicht kovalente Bindungen verbunden sind [9]. Es findet sich hier weder Cu⁺⁺ noch Zn⁺⁺, sondern zwei äquivalente Mangan, deren Wertigkeit im nativen Enzym bislang unbekannt ist. Die katalytischen Eigenschaften der beiden Enzymtypen sind sehr ähnlich, jedoch wird das Bakterienenzym im Gegensatz zum Säugerprotein durch Cyanid nicht gehemmt. Im weiteren kommt bei Bakterien noch eine Dismutase vor, welche Eisen enthält. Von entwicklungsgeschichtlichem Interesse ist auch, dass die N-terminale Aminosäuresequenz des Bakterien- und des mitochondrialen Enzyms sehr ähnlich ist.

Für den Moment wollen wir jedoch beim Modellfall des Erythrozyten bleiben und uns mit der Bildung des Superoxids durch die Autoxidation des Hämoglobins befassen. Eine Lösung von reinem Hämoglobin zeigt bei physiologischem pH einen zweiphasigen Verlauf der Autoxidationskurve (Abb. 4). Die Oxidationsraten sind stark pH-abhängig [10]. Es hat sich nun gezeigt, dass bei physiologischem pH die α-Kette sehr viel rascher oxidiert wird als die β-Kette; der Unterschied beträgt fast den Faktor 10. Dieser Befund lässt sich auch bei durch ein bestimmtes chemisches Verfahren isolierten Hb-Ketten bestätigen. Die Autoxidationsraten isolierter Ketten sind jedoch um ein Vielfaches höher als diejenigen des tetrameren Hämoglobins. Dass dies in gewissen Fällen sehr bedeutsam ist,

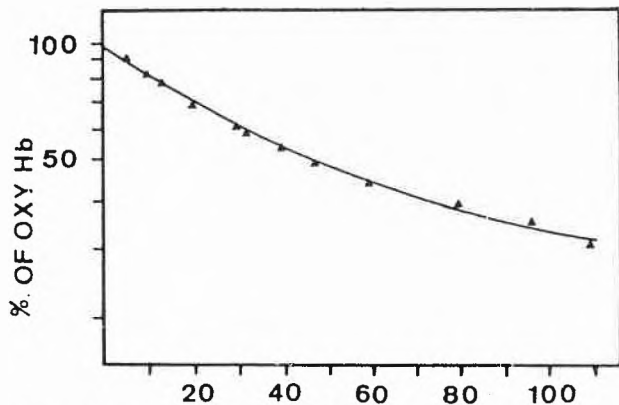


Abb.4: Autoxidation von humanem Hb A (Abszisse: Stunden)

werden wir noch sehen. Interessanterweise ist die Autoxidationsrate auch von zahlreichen anderen intrazellulären Variablen abhängig, wie z. B. von der O₂-Sättigung (Abb. 5) [10]. Es ist daher anzunehmen, dass die intrazelluläre Superoxidbildung, insbesondere im venösen Blut, rasch erfolgt.

Im Verlaufe der Bindung von Liganden, wie etwa O₂ oder CO, führt ein Hämoglobinmolekül eine relativ drastische Konformationsänderung durch. Befindet es sich in ligandenfreiem Zustand in der sogenannten T-Struktur, welche für O₂ eine niedere Affinität aufweist, nimmt es bei voller O₂-Sättigung die R-Struktur ein [11]. Diese R-Struktur hat eine sehr viel höhere Affinität für den Sauerstoff. Dieser Mechanismus erlaubt es dem Erythrozyten, sich in der Lunge beinahe vollständig mit O₂ aufzuladen und trotzdem im Gewebe den Sauerstoff abzugeben. Hierbei wechseln nun gewisse Hb-Moleküle ihre Konformation und klappen in die niederaffine T-Struktur, wobei neuerdings O₂ frei wird (Abb. 6). Im Erythrozyten der Säuger findet sich ausserdem ein Metabolit der Glucose, das sogenannte 2,3-Diphosphoglycerat, abgekürzt 2,3-DPG, welches

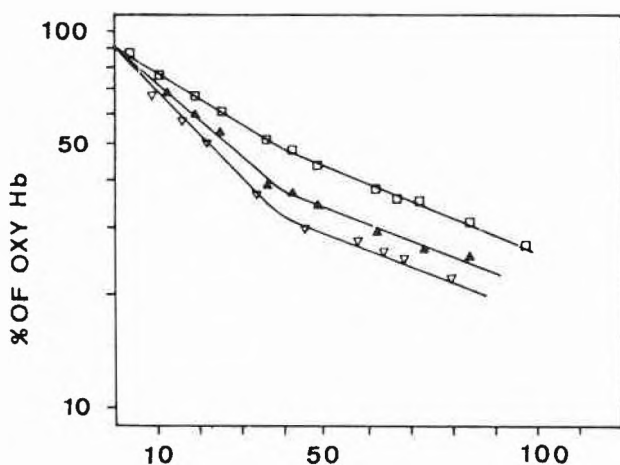


Abb.5: Abhängigkeit der Autoxidation vom Sauerstoffpartialdruck (Abszisse: Stunden)

Bedingungen: 0,1 M Phosphat, pH 7,2

□ pO₂ = 147 mm Hg

▲ pO₂ = 57 mm Hg

▽ pO₂ = 40 mm Hg

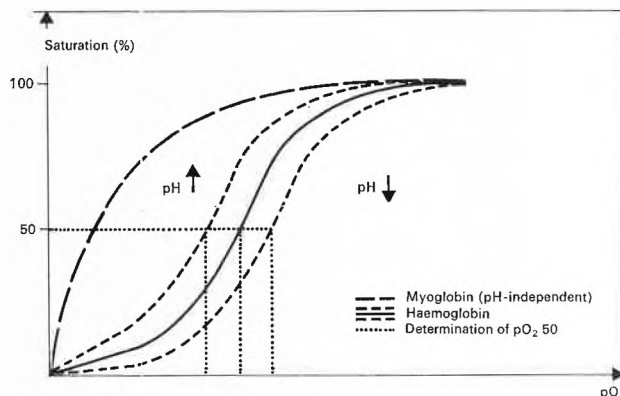


Abb.6: Beziehungen von T-(Deoxy-) und R-(Oxy-) Struktur des Hämoglobins

als allosterischer Effektor wirkt. Bei Vögeln und kaltblütigen Tieren kommen analog wirkende organische Phosphatverbindungen vor, bei Vögeln das Inositolhexaphosphat und bei Fischen ATP. Diese organischen Phosphatverbindungen können sich in einer Spalte zwischen den beiden β-Ketten binden. Dies ist jedoch nur in der T-Form möglich, da hier die Topologie der Ladungen genau richtig ist (Abb. 7) [11]. Dadurch wird die niederaffine T-Struktur stabilisiert und die O₂-Affinität des Gesamtblutes gesenkt. Diesen zusätzlichen Adaptationsmechanismus benützt der Organismus bei Hypoxie der Gewebe, etwa einem Anstieg in grosse Höhen oder bei Blutarmut (Abb. 8).

Obwohl dieser Mechanismus zur Verbesserung der O₂-Versorgung der Gewebe von grossem Nutzen ist, hat er natürlich auch Nachteile, beschleunigt er doch beträchtlich die Autoxidation des Hämoglobins (Abb. 9) [12].

Damit kommen wir zur Darstellung, warum in gewissen Fällen der Sauerstoff gerade für den Erythrozyten besonders schädlich ist. Während seiner gesamten normalen Lebensdauer von 120 Tagen produziert das Hb des menschlichen Erythrozyten Superoxid, welches durch die intrazelluläre Dismutase weitgehend unschädlich gemacht wird. Steigt nun die Superoxid-

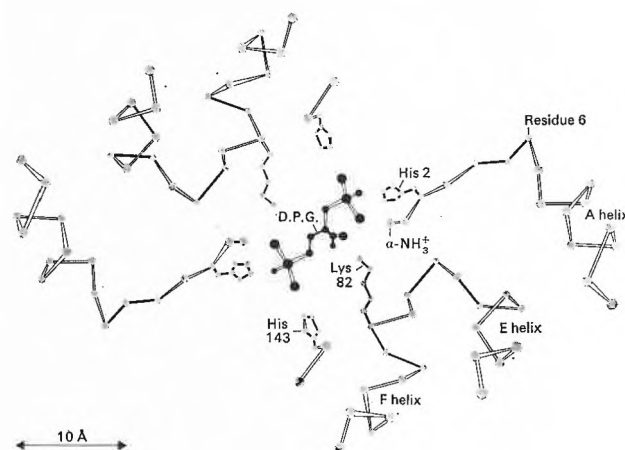


Abb.7: Die Bindung von 2,3-Diphosphoglycerat in der Spalte zwischen den beiden β-Ketten der T-Struktur

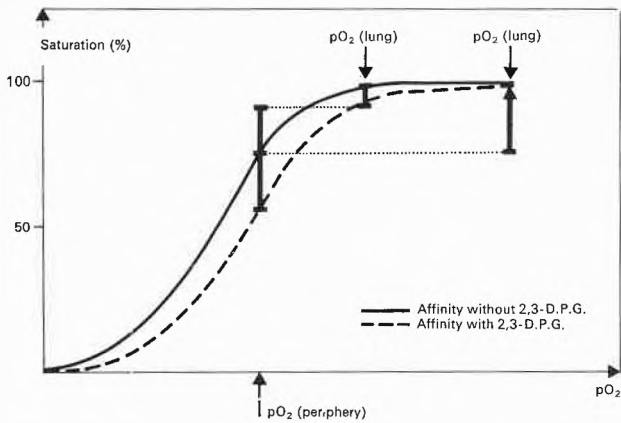


Abb. 8: Sauerstoffdissoziationskurve ohne und mit 2,3-Diphosphoglycerat als Beispiel einer Adaptation an grosse Höhe

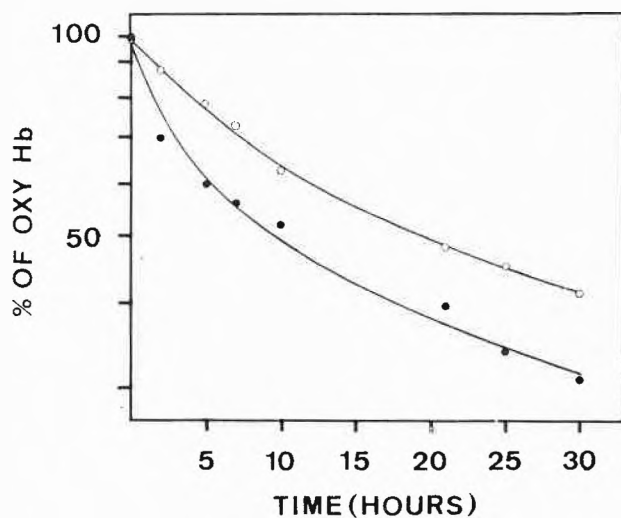


Abb. 9: Einfluss von 2,3-Diphosphoglycerat auf die Autoxidation und damit auf die Superoxidbildung

○ ohne 2,3-DPG
● mit 2,3-DPG

produktion an, wird die Kapazität des Dismutase-systems überschritten, und es resultieren Schäden an der Erythrozytenmembran zufolge Peroxidation von Membranlipiden und -SH-Gruppen erythrozytärer Proteine. Ein Paradebeispiel für einen solchen Fall sind die Thalassämien. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, finden sich ja bei diesen Krankheitsbildern ausser normalem Hb auch freie α - bzw. β -Ketten in den Erythrozyten. Dass freie Ketten rascher autoxidieren und deshalb auch rascher Superoxid bilden, haben wir oben bereits erwähnt [10]. Schon die mikroskopische Morphologie der Zellen zeigt deutlich, dass ihre Membranen abnorm sind. Dazu kommt, dass schwer anämische Patienten oft den 2,3-DPG-Gehalt erhöhen und dadurch auch die Autoxidation des normalen Hb beschleunigen. Die Folge dieser Superoxidproduktion sind derart massive Membranschäden, dass die Erythrozyten, die normal 120 Tage leben, oft nur 6 bis 20 Tage in Zirkulation bleiben. Obwohl das Knochenmark durch bis zu 10mal beschleunigter Bildung von Erythrozyten diesen Vorgang zu kompensieren sucht,

Abb. 10: Die Thalassämien

(von griechisch Thalassa = das Meer)

Es handelt sich um Erbkrankheiten

α -Typ = α -Thalassämie. Am häufigsten in Südostasien

geschätzt etwa 10×10^6 Menschen

β -Typ = β -Thalassämie. Am häufigsten im Mittelmeerraum

geschätzt etwa 10×10^6 Menschen

Abb. 11: Die α -Thalassämie

Pathogenese:

ungenügende Bildung von α -Ketten

Daraus resultiert:

Überschuss an β - (und γ - und δ -) Ketten, die ziemlich rasch autoxidieren \rightarrow Superoxid

Als Folge: langsame Beschädigung der Erythrozytenmembran

Leichte bis mittelschwere hämolytische Anämie

Abb. 12: Die β -Thalassämie

Pathogenese:

ungenügende Bildung von β -Ketten

Daraus resultiert:

Überschuss an α -Ketten, die sehr rasch autoxidieren \rightarrow Superoxid

Als Folge: sehr frühe Beschädigung der Erythrozytenmembran, teilweise bereits vor der Ausreifung im Knochenmark

Mittlere bis schwere hämolytische Anämie

resultiert meist eine schwere Anämie. Patienten mit β - und oft auch mit α -Thalassämien brauchen deshalb monatlich eine bis zwei Bluttransfusionen und sterben meist als Folge dieser Transfusionen an Eisenüberladung sämtlicher Organe ungefähr beim Erreichen des Erwachsenenalters.

Die oben angeführten grundlegenden biochemischen Erkenntnisse über die Nebenwirkungen des lebensnotwendigen Sauerstoffes haben bei dieser doch sehr häufigen Krankheit zur Analyse der Faktoren, welche die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzen, geführt. Es ist zu hoffen, dass dadurch der Weg zu einer möglichen Behandlung gewiesen wird. Die Frage, ob oxidative Veränderungen auch in normalen Erythrozyten den Alterungsprozess bedingen und ob dieser Mechanismus vielleicht allgemein für die Zellalterung eine wichtige Rolle spielt, ist zur Zeit Gegenstand intensiver experimenteller Forschung.

Literatur

- 1 I. Fridovich: in: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation (ed. Osamu Hayaishi), Academic Press, S.453 (1975).
- 2 R. Siever: Scientific American 233, 82 (1975).
- 3 J. M. McCord, B. B. Keele Jr. und I. Fridovich: Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1024 (1971).
- 4 J. M. McCord und I. Fridovich: J. Biol. Chem. 244, 6049 (1969).
- 5 G. S. Shields, H. Markovitz, W. H. Klassen, G. E. Cartwright und M. M. Wintrobe: J. Clin. Invest. 40, 2007 (1961).
- 6 R. J. Carrico und H. F. Deutsch: J. Biol. Chem. 245, 723 (1970).
- 7 B. B. Keele Jr., J. M. McCord und I. Fridovich: J. Biol. Chem. 246, 2875 (1971).
- 8 J. Bannister, W. Bannister und E. Wood: Europ. J. Biochem. 18, 178 (1971).
- 9 B. B. Keele Jr., J. M. McCord und I. Fridovich: J. Biol. Chem. 245, 6176 (1970).
- 10 A. Mansouri und K. H. Winterhalter: Biochemistry 12, 4946 (1973).
- 11 M. F. Perutz: Nature 228, 726 (1970).
- 12 A. Mansouri und K. H. Winterhalter: Biochemistry 13, 3311 (1974).