

Ozon in arteriosklerotischen Plaques: die Suche nach dem „rauchenden Colt“...

Helmut Sies*

Stichwörter:

Arteriosklerose · Metabolismus · Oxidativer Stress · Ozon · Ozonolyse

Das Beschaffen von Indizien für die Existenz von „biologischen Waffen“ kann ein schwieriges Unterfangen sein. Hier ist ein solcher Fall: Seit mehr als zwanzig Jahren findet sich in der Literatur die Vorstellung, dass Oxidationsprozesse für die Entstehung von Arteriosklerose ausschlaggebend sind. Steinbrecher et al.^[1] beschrieben die Peroxidation von Lipiden durch Endothelzellen als eine entscheidende Modifizierung von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL). Bisher konnten jedoch weder die Natur des Oxidans noch seine Entstehungsweise bestimmt werden. Zahlreiche Oxidantien wurden untersucht: vom Hydroxylradikal, das durch Katalyse durch Übergangsmetallionen entsteht, über Peroxynitrit und Lipidhydroperoxide bis hin zu enzymatisch – beispielsweise durch Lipoxxygenasen oder Myeloperoxidase – erzeugten Oxidantien. Obgleich für jede dieser Spezies ihre Beteiligung an Lipidperoxidationsprozessen klar gezeigt wurde, ist ihr tatsächlicher Beitrag zur Entstehung von Arteriosklerose in vivo noch unklar. Nun kommt ein weiterer, unerwarteter Neuling hinzu: Ozon.

Wentworth et al.^[2] berichteten über die Bildung von Ozon in arteriosklerotisch verengten Arterien. Dies ist überraschend, da Ozon im Hinblick auf seine biologische Reaktivität bisher nur mit Umweltverschmutzung und inhalatori-

scher Toxizität für die Lunge verbunden wurde. Die körpereigene Bildung und Nutzung von Ozon wäre, sollten sich die Hinweise erhärten, eine neue Wendung in der Erforschung des Oxidativen Stresses.

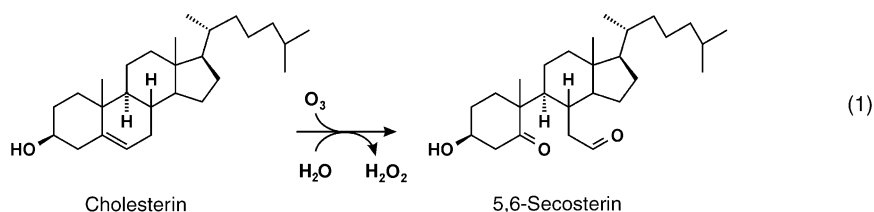
Von Wentworth et al. selbst stammt die Vorstellung,^[3] dass die Bildung von Trisauerstoff-Spezies während einer – durch Antikörper katalysierten – chemischen Modifizierung von Antigenen erfolgt. Kürzlich fanden Zhu et al.^[4a] bei ihren Untersuchungen zu diesem Prozess Hinweise auf Modifizierungen zweier spezifischer Aminosäurereste in antigenbindenden Fragmenten (Fab) von Mausantikörpern durch reaktive Spezies, die auch bei der Antikörperkatalysierten Wasseroxidation auftreten. Kristallstrukturanalysen von mit UV-Licht bestrahlten murinen Fab-Kristallen zeigten komplexe oxidative Modifikationen von Tryptophan 163 in der leichten Kette des Antikörperfragmentes. Diese wurden auch nach Behandlung der Kristalle mit Wasserstoffperoxid oder Hydroxylierung des γ -C-Atoms des Glutamins 6 in der schweren Kette gefunden. Zhu et al.^[4a] folgerten daraus, dass das „aktive Zentrum“ der Wasseroxidation im Bereich der Grenzfläche zwischen konstanter und variabler Domäne der untersuchten Antikörper liege. Alles in allem erfährt diese äußerst ungewöhnliche Sauerstoffchemie nunmehr eine

größere Aufmerksamkeit. Kürzlich wurde gezeigt, dass HOOOH bei der thermochemischen Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Ozon gebildet wird.^[4b]

Was folgt daraus? Zunächst ist es bemerkenswert, dass die Natur anscheinend das komplette Arsenal von Sauerstoffmetaboliten, sei es in gelöster Form oder gasförmig, für den Bedarf des Organismus in der chemischen Kriegsführung gegen Eindringlinge wie Bakterien oder Viruspartikel nutzt. Dabei setzt sie die reaktivsten bekannten Sauerstoffspezies ein, darunter das Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid und weitere davon abgeleitete Produkte sowie nach den neuesten Erkenntnissen wohl auch Ozon. Zwar ist die Ozonierung ein wohlbekannter Prozess in der Wasseraufbereitung, aber dass Ozon im Organismus selbst erzeugt werden soll, ist doch sehr verblüffend. Generell treten alle diese reaktiven Sauerstoffmetabolite nur in sehr geringen Konzentrationen in Erscheinung, und ihre Existenz kann zumeist nur aus Indizien abgeleitet werden. Auch die Hinweise auf eine Beteiligung von Ozon wurden nicht direkt, sondern vielmehr über die Identifizierung von charakteristischen Reaktionsprodukten des Ozons erhalten.

Wo also ist nun der „rauchende Colt“, der auf die Täterschaft des Ozons verweist? Wentworth et al.^[2] identi-

[*] Prof. Dr. H. Sies
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Postfach 101007
40001 Düsseldorf (Deutschland)
Fax: (+49) 211-811-3029
E-mail: sies@uni-duesseldorf.de



zierten das Produkt der Ozonolyse von Cholesterin, 5,6-Secosterin [Gl. (1)], in arteriosklerotisch verengtem Gewebe. Sie verifizierten zudem die Oxidation von Indigokarmin zu Isatinsulfonat (eine Indikatorreaktion für Ozon) in Material aus menschlichen arteriosklerotischen Plaques nach Stimulation mit Phorbolmyristatacetat (PMA). Diese Beobachtungen erscheinen plausibel, allerdings mit einer Einschränkung, die dieser Art von Untersuchung innewohnt: die Spezifität des eingesetzten Indikators. Ohne Zweifel führt die Ozonolyse von Cholesterin zur Bildung von 5,6-Secosterin in vitro, jedoch muss die Bildung dieses Produktes in einer biologischen Matrix nicht zwangsläufig nur durch Ozonolyse erfolgen. Um des Teufels Advokat zu spielen: Gibt es nicht auch die Möglichkeit, dass andere Wege gleichermaßen zur Bildung von 5,6-Secosterin führen? Eine systematische Untersuchung unterschiedlicher Oxidantien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das gleiche Produkt hervorzubringen, ist hier angezeigt, um die Eignung des Nachweises von 5,6-Secosterin als charakteristisches Merkmal für die Bildung von Ozon in biologischem Material zu untermauern. Die Frage ist also durchaus noch offen.

Hinsichtlich der Bildung von Isatinsulfonat aus Indigokarmin betonen Kettle et al., dass diese Reaktion auch durch ein Superoxid-Anionradikal, das enzymatisch mit Xanthinoxidase und Acetaldehyd oder von stimulierten neutrophilen Granulocyten erzeugt worden ist, in einer durch Superoxiddismutase hemmbaren Weise hervorgerufen werden kann.^[5] Die Autoren folgern daraus, dass das Ausbleichen von Indigokarmin nicht als Beweis für die Bildung von Ozon durch neutrophile Granulocyten herangezogen werden kann. Es liegt auf der Hand, dass diese interessanten Themen nunmehr mit verfeinerten chemischen und biochemischen Methoden angegangen werden müssen. Eine alte Laborweisheit sei in diesem Zusammenhang erwähnt: Spezifische Reaktionen sind nur solange spezifisch, bis der Nachweis des Gegenteils erfolgt. Dennoch: Die Hypothese von Ozon als einer reaktiven Sauerstoffspezies im Metabolismus eröffnet interessante neue Möglichkeiten.

Was weiß man über die Biologie des Ozons auf molekularer Ebene? Es existiert eine reichhaltige Literatur zu Lipid-Ozoniden, die durch Belastung mit Ozon entstehen, wie aus Untersuchungen von Pryor et al.^[6] und Smith et al.^[7] hervorgeht. Die endogene Bildung von Ozon ist jedoch Teil eines neuen Konzeptes. Das Konzept der Entstehung von Entzündungsmediatoren mit Signalfunktion durch Ozonolyse und/oder Peroxidation von Lipiden im Gewebe ist hingegen seit geraumer Zeit bekannt. Es bezieht sich nicht nur auf Cholesterin, sondern auch auf verschiedene Lipidklassen mit C=C-Bindungen, beispielsweise die Phosphatidylcholine (Lecithine), aus denen Aldehyde, 1-Hydroxy-1-hydroperoxide sowie in geringer Ausbeute so genannte Criegee-Ozonide entstehen.^[8] Jorge et al.^[9] untersuchten die molekularen Fingerabdrücke des Ozons im Mutationsspektrum menschlicher Zellen und beobachteten die folgenden molekularen Kennzeichen: Wie zahllose oxidierende Agentien induziert Ozon Mutationen vornehmlich an GC-Basenpaaren. Im Gegensatz zu anderen Oxidantien werden die drei Arten von Basensubstitutionen jedoch in etwa gleichem Maße hervorgerufen, ähnlich dem Mutationsspektrum für p53 in nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom bei Nichtrauchern. Noch ein „rauchender Colt“ für Ozon also, selbst bei Nichtrauchern?

Was sind die medizinischen Konsequenzen? Ausgehend von der Arteriosklerose (Abbildung 1) und der allgemein anerkannten Ansicht, dass es sich hierbei um eine langfristige Erkrankung mit inflammatorischer Komponente handelt, begaben sich Wentworth und Kollegen weiter auf medizinisches Terrain: Zhang et al.^[10] beobachteten kürzlich, dass Produkte der Ozonolyse von Cholesterin sowohl Fehlfaltungen in β -Amyloid und in α -Synuclein induzieren als auch in klinischen Hirnproben nachzuweisen sind. Weitergehend korrelieren die Autoren Ozonierung mit Proteinoxidation und -akkumulation sowie Plaquebildung. Diese und weitere Im-

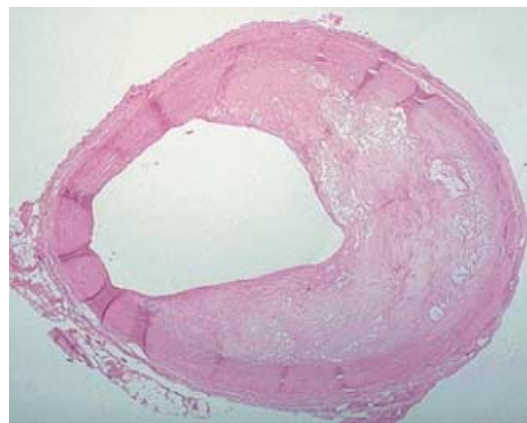


Abbildung 1. Arteriosklerotisch verengte Koronararterie: Querschnitt eines Herzkranzgefäßes mit exzentrischer arteriosklerotischer Plaque, die etwa ein Drittel des Umfangs bedeckt. Die restliche Intima ist nur unwesentlich verdickt.

pplikationen werden mit dem Nachweis der tatsächlichen Beteiligung von Ozon stehen und fallen. Bislang bleiben viele Fragen hinsichtlich der endogenen Produktion von Ozon im Gefäßsystem offen.^[11] Die Biochemie des Oxidativen Stresses^[12] tritt in eine weitere interessante Phase ein. Hier wird sich ein genauerer Blick auf das Konzept von als „Biomarkern“ genutzten charakteristischen Reaktionsprodukten lohnen. Der Begriff der „Biomarker des Oxidativen Stresses“ ist der molekularen Epidemiologie entlehnt und beschreibt Veränderungen in einem biologischen Molekül, die auf den Angriff reaktiver Sauerstoff-, Stickstoff- oder Halogenspezies zurückgehen. Eine umfassende Darstellung des gegenwärtigen Wissens über oxidierte Biomarker, beispielsweise Lipidperoxydationsprodukte wie Malondialdehyd, Lipidhydroperoxide oder F_2 -Isoprostane, betont die grundlegenden Schwierigkeiten in der Nutzung von Biomarkern in der biologischen Forschung.^[13] Künftige Anstrengungen werden den angemessenen Platz für endogen erzeugtes Ozon identifizieren: Wenn der Rauch sich verzogen hat...

[1] U. P. Steinbrecher, S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum, D. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3883–3887.

[2] P. Wentworth, J. Nieva, C. Takeuchi, R. Galve, A. D. Wentworth, R. B. Dilley, G. A. DeLaria, A. Saven, B. M. Babior,

- K. D. Janda, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, *Science* **2003**, 302, 1053–1056.
- [3] P. Wentworth, A. D. Wentworth, X. Zhu, I. A. Wilson, K. D. Janda, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1490–1493.
- [4] a) X. Zhu, P. Wentworth, A. D. Wentworth, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, I. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 2247–2252; b) P. T. Nyffeler, L. Eltepu, N. A. Boyle, C.-H. Wong, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, P. Wentworth, *Angew. Chem.* **2004**, im Druck.
- [5] A. J. Kettle, B. M. Clark, C. C. Winterbourn, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 18521–18525.
- [6] W. A. Pryor, B. Das, D. F. Church, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 341–348.
- [7] L. L. Smith, E. L. Ezell, K. Jaworski, *Steroids* **1996**, 61, 401–406.
- [8] „Singlet Oxygen, UV-A and Ozone“: G. L. Squadrito, M. G. Salgo, F. R. Fronczek, W. A. Pryor, *Methods Enzymol.* **2000**, 319, 570–582.
- [9] S. A. Jorge, C. F. Menck, H. Sies, M. R. Osborne, D. H. Phillips, A. Sarasin, A. Sary, *DNA Repair* **2002**, 1, 369–378.
- [10] Q. Zhang, E. T. Powerts, J. Nieva, M. E. Huff, M. A. Dendle, J. Bieschke, C. G. Glabe, A. Eschenmoser, P. Wentworth, R. A. Lerner, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 4572–4575.
- [11] J. Loscalzo, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 834–835.
- [12] H. Sies, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 1061–1075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1058–1071.
- [13] H. R. Griffiths, L. Moller, G. Bartosz, A. Bast, C. Bertoni-Freddari, A. Collins, M. Cooke, S. Coolen, G. Haenen, A.-M. Hoberg, S. Loft, J. Lunec, R. Olinski, J. Parry, A. Pompella, H. Poulsen, H. Verhagen, S. B. Astley, *Mol. Aspects Med.* **2002**, 23, 101–208.

Why Wait to Make Great Discoveries

When you can make them in an instant with
Wiley InterScience® Pay-Per-View and ArticleSelect™

Now you can have instant, full-text access to an extensive collection of journal articles or book chapters available on Wiley InterScience. With Pay-Per-View and ArticleSelect™, there's no limit to what you can discover...

ArticleSelect™ is a token-based service, providing access to full-text content from non-subscribed journals to existing institutional customers (EAL and BAL)

Pay-Per-View is available to any user, regardless of whether they hold a subscription with Wiley InterScience.

Benefits:

- Access online full-text content from journals and books that are outside your current library holdings
- Use it at home, on the road, from anywhere at any time
- Build an archive of articles and chapters targeted for your unique research needs
- Take advantage of our free profiled alerting service, the perfect companion to help you find specific articles in your field as soon as they're published
- Get what you need instantly, no waiting for document delivery
- Fast, easy, and secure online credit-card processing for Pay-Per-View downloads
- Special, cost-savings for EAL customers: whenever a customer spends tokens on a title equaling 115% of its subscription price, the customer is auto-subscribed for the year
- Access is instant and available for 24 hours

www.interscience.wiley.com

 **WILEY**
InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT