

Rüdiger Hardeland

## **Vermeidung der zellulären Bildung freier Radikale – wichtiger als Radikalfangen?**

Vortrag in der Klasse Naturwissenschaften am 20. Mai 2010

### **Einleitung**

Freie Radikale entstehen als Produkte des normalen zellulären Stoffwechsels, ferner als Komponenten des Abwehrsystems, durch ionisierende Strahlung, kurzwelliges UV-Licht oder Oxidotoxine. Auf Grund ihrer durch ein ungepaartes Elektron bedingten hohen Reaktivität vermögen sie Biomoleküle zu schädigen, mutagen und carcinogen zu wirken sowie Zelltod auszulösen. Das sie eliminierende antioxidative Protektionssystem umfasst Enzyme und niedermolekulare Radikalfänger [1]. Der enzymatische Schutz erstreckt sich auf das Entfernen der nur moderat reaktiven Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) durch Superoxiddismutasen ( $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ), die Entgiftung von  $H_2O_2$  – einer potentiellen Quelle höchstreaktiver Radikale – durch Hämoperoxidasen (einschließlich Catalase) und Glutathionperoxidasen, weitere Enzyme des Glutathion-Stoffwechsels ( $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthase, Glutathion-Reductase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) und Bildung radikalfangender Biline (Häm-Oxygenasen). Diverse Radikale können hingegen nicht enzymatisch entgiftet werden, wie Stickstoffmonoxid ( $\bullet NO$ ), Stickstoffdioxid ( $\bullet NO_2$ ), das Carbonatradikal ( $CO_3^{\bullet-}$ ) und das höchstreaktive Hydroxylradikal ( $\bullet OH$ ). Unter den niedermolekularen Radikalfängern sind zum einen intrazellulär gebildete Substanzen wie reduziertes Glutathion, Biline, NADH und NADPH zu nennen, ferner das v.a. im Blut bedeutende Urat, und Nahrungskomponenten wie Ascorbat, Tocopherole, Carotinoide und Polyphenole [1].

Das unter basalen Stoffwechselbedingungen fraglos hocheffiziente antioxidative Protektionssystem vermag jedoch prinzipiell freie Radikale niemals quantitativ zu eliminieren. Zwar reagiert es bei erhöhter Radikalgenerierung durch Aufregulieren protektiver Enzyme [1], dies jedoch in unterschiedlichem Ausmaß, oft auch konditional und gewebeabhängig. Eine übermäßige Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, die durch die protektiven Komponenten nicht mehr ausreichend bewältigt werden kann,

führt zu oxidativem bzw. nitrosativem Stress. Schäden durch freie Radikale treten akut vor allem bei Entzündungen, im Extrem hirnentzündlichen Erkrankungen und Sepsis, sowie neuronalen Überstimulationen auf. Chronische Radikalschäden sind Begleiterscheinungen des Alterns, der Neurodegeneration sowie weiterer altersassoziierter Krankheiten, oft wohl auch mitursächlich für deren Progression.

Vielfach ist die Idee verfolgt worden, metabolischem Stress durch Antioxidantien als Nahrungsergänzungstoffe zu begegnen. Die Verwendung insbesondere der Vitamine C, E und A sowie weiterer Carotinoide hat jedoch epidemiologisch wenig an zählbarem Erfolg gezeitigt, vor allem was Altern und altersassozierte Erkrankungen betrifft [2-4]. Ein Übermaß nutritiver Antioxidantien kann sich sogar schädlich auswirken, z.B. durch Mobilisierung proteingebundenen Eisens und das Antreiben der Hydroxylradikal-Bildung der Fenton-Reaktion im Sinne eines sog. Redox Cycling [1].

Auf dem Hintergrund der limitierten Effizienz antioxidativer Vitamine erscheint es sinnvoll, nach weiteren Möglichkeiten zur Verringerung radikalischer Schäden zu suchen. Das neue Konzept der Radikalvermeidung [4,5] setzt bei den Prozessen der Radikalgenerierung an und intendiert eine Drosselung der metabolischen Vorgänge, die zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies führen.

### **Die Quellen freier Radikale**

Die folgende Betrachtung soll nicht die Vielzahl verschiedener Radikalspezies zum Gegenstand haben, sondern sich auf biologisch oder pathophysiologisch besonders relevante Radikale konzentrieren. Das mit höchster Rate gebildete freie Radikal ist das Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ). Es entsteht in mehreren Stoffwechselprozessen unterschiedlicher quantitativer Bedeutung. Abgesehen von seiner Freisetzung durch aktivierte Makrophagen und Neutrophile sind vor allem zwei Quellen dieser Radikale von Bedeutung, zum einen die NAD(P)H-Oxidasen (Nox) und zum anderen die Mitochondrien. Es existieren mehrere Nox-Subformen unterschiedlicher Lokalisation und z.T. noch unklar abgegrenzten Rollen. Aufregulierungen von Nox-Isoenzymen wurden mehrfach beschrieben, insbesondere bei Formen von Stress, einschließlich neuronaler Schädigungen, oxidativem und sogar sozialem Stress, sowie im Verlauf des Alterns [4]. Von besonderem Interesse für das Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen mit atypisch-entzündlichen Aspekten mag die Beobachtung sein, dass die Aufregulierung mancher Nox-Isoformen wie z.B. Nox1 die mikrogliale  $\bullet$ NO-Synthese stimuliert [6]. Zwar ist ein moderat er-

höher  $\bullet\text{NO}$ -Spiegel *per se* keineswegs als schädlich einzustufen, doch kann die Kombination vermehrter  $\text{O}_2^{\bullet-}$ - und  $\bullet\text{NO}$ -Bildung zu kritischen Konzentrationen von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ; Abb. 1) führen. Dieses vermag nach Protonierung in ein Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) und  $\bullet\text{NO}_2$  zu zerfallen, aber auch mit  $\text{CO}_2$  ein Addukt zu bilden, welches in ein Carbonatradikal ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) und  $\bullet\text{NO}_2$  zerfällt. Durch Kombinieren von  $\bullet\text{NO}$  mit  $\bullet\text{NO}_2$  entsteht das stark nitrosierende Agens  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Folgen dieser Prozesse sind Nitrosierungen, Nitrierungen und Oxidationen von Biomolekülen.

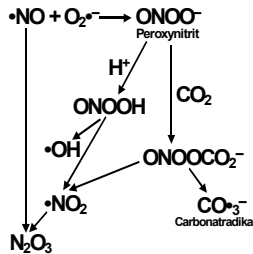


Abb. 1: Reaktive Folgeprodukte des Stickstoffmonoxid-Radikals.

Dieser Kontext von erhöhter  $\text{O}_2^{\bullet-}$ - und  $\bullet\text{NO}$ -Generierung wird im Folgenden für die Diskussion mitochondrialer Schädigungen besondere Bedeutung erlangen. Interessanter Weise ist für die Isoform Nox4 kürzlich eine mitochondriale Lokalisation gezeigt worden. Die präsentierten Daten deuten auf eine Identität von Nox4 mit einer Untereinheit von Komplex IV der Atmungskette hin [7]. Damit würde den Mitochondrien als weiterer Hauptquelle von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ein zusätzlicher Entstehungsort dieser Radikalspezies zugewiesen.

Die besser bekannten Orte der mitochondrialen  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Entstehung sind die Komplexe I und III der Atmungskette. Die Generierung dieser Radikale erfolgt durch Elektronendissipation (engl. auch *electron leakage*). In die Atmungskette eingespeiste Elektronen werden aus derselben abgezweigt und auf  $\text{O}_2$  übertragen. In Komplex I erfolgt dies seitens des Eisen-Schwefel-Clusters N2 [8,9], welches in der so genannten Amphipathischen Rampe lokalisiert ist, einer Region, die in die Matrix hinein ragt, so dass das hier gebildete  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in die Matrix abgegeben wird. Aufgrund dieser Lokalisation, zugleich des Vorhandenseins leicht oxidierbarer Cysteine, ist die Amphipathische Rampe besonders vulnerabel gegenüber Angriffen durch höher reaktive, sekundär gebildete freie Radikale [10,11]. Die Nähe von N2 zu zwei Bindungsstellen für Semichinone des Coenzym Q führte zur Diskussion, ob die Elektronenübertragung von diesem Redoxpartner vermittelt wird, doch

scheint sich dies nicht bestätigt zu haben. Elektronendissipation an Komplex III beruht auf anderen Ursachen [4,11]. In diesem Respirasom kann der Elektronenfluss durch eine intramonomere strukturelle Entkopplung zweier  $b_L$ -Häme unterbrochen sein, mit der Folge, dass Elektronen von der so genannten Qo-Bindungsstelle abgegeben werden. Bei Komplex III dissipieren Elektronen auf beide Seiten der inneren Membran, so dass  $O_2^{\bullet-}$  sowohl in die Matrix als auch in den Intermembranraum gelangt.

Die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  stellt einen normalen Begleitvorgang des Elektronentransports durch die Atmungskette dar. Wahrscheinlich ist dies unvermeidlich, weil die Redoxpartner dieses Systems, d.h. die Komplexe I - IV sowie die zwischen ihnen vermittelnden Überträger Coenzym Q und Cytochrom c prinzipiell nicht in stetigem Kontakt miteinander stehen. Folglich kann es zu transientem Elektronenstau und ggf. auch -rückfluss kommen. Die Dynamik des Elektronenflusses mit der Möglichkeit eines „Stop-and-Go“-Verkehrs sollte nicht unterschätzt werden. Die diskontinuierliche Freisetzung von  $O_2^{\bullet-}$ , die sich in Form von „*superoxide flashes*“ äußert, belegt dies eindrucksvoll [12,13]. Diese Schübe von  $O_2^{\bullet-}$  reflektieren momentane Öffnungen der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) [13,14]. Anders als früher angenommen sind solche kurzzeitigen Öffnungen nicht mit einem Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) verbunden und führen daher nicht automatisch zur Apoptose [13,14].

Von pathophysiologischem Interesse sind vor allem diejenigen Vorgänge, die zu erhöhter Elektronendissipation führen. Oxidativer Stress, auch bei Reoxygenierung nach Anoxie, führt zu wiederholter mPTP-Öffnung, ohne dass es notwendiger Weise zu starken Änderungen von  $\Delta\Psi_m$  kommen muss [13,14]. Die bekannte Erhöhung der Radikalbildung bei Ischämie/Reperfusion wird auch in diesen transienten Öffnungen deutlich und manifestiert sich, z.B. bei Cardiomyocyten, in einer unkontrollierten Serie von *superoxide flashes* [13]. Zelltod tritt erst beim Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$  ein.

### **Akute und chronische Erhöhungen der Radikalgenerierung**

Als Folge übermäßiger  $\bullet NO$ -Synthese kann die  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung dramatisch ansteigen. Starke Erhöhungen der  $\bullet NO$ -Spiegel sind insbesondere charakteristisch für Entzündungen, im Extrem Sepsis, sowie für neuronale Überexzitation [4,11]. Da die Affinität von  $O_2^{\bullet-}$  zu  $\bullet NO$  in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie zu den Superoxiddismutasen, ist bei hohen  $\bullet NO$ -Konzentrationen die Bildung von Peroxynitrit unvermeidlich. Folglich entstehen  $\bullet OH$ - und  $\bullet NO_2$ -Radikale und, angesichts der hohen mitochondrialen

CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit, aus dessen Addukt auch CO<sub>3</sub>•<sup>-</sup>, ferner aus •NO und •NO<sub>2</sub> das nitrosierende N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Abb. 1). Aus der Erhöhung von •NO, der Entstehung von N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und den über Peroxynitrit gebildeten sekundären Radikalen resultieren mehrere die mitochondriale Atmungskette blockierende Effekte [4, 11, 15, 16]. •NO vermag an Eisen von Eisen-Schwefel-Clustern und Hämen zu binden, Sulfhydrylgruppen von respirasomalen Proteinen werden oxidiert oder nitrosiert, teils sogar indirekt durch Transnitrosierung seitens S-Nitrosoglutathion, Proteine werden an weiteren Gruppen oxidiert oder durch aufeinander folgende Reaktionen von •OH oder CO<sub>3</sub>•<sup>-</sup> und •NO<sub>2</sub> nitriert, Lipide der inneren Mitochondrienmembran werden peroxidiert. Dies betrifft in besonderen Maße die Peroxidation von Cardiolipin, welches für die Ausbildung einer korrekten Struktur der Komplexe III und IV erforderlich ist [17-19]. Bereits partielle Blockaden des Elektronenflusses erhöhen die Elektronendissipation (Abb. 2). Die vom •NO ausgehende Bildung von •OH, CO<sub>3</sub>•<sup>-</sup>, •NO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> führt somit zur vermehrten O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>-Generierung und der Folge eines Circulus vitiosus, wobei die Zunahme des O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> die Entstehung höher reaktiver Radikale weiter steigert. Es sei an dieser Stelle betont, dass der hier beschriebene, sich selbst verstärkende Prozess von einem anderen, in gerontologischem Kontext diskutierten Circulus vitiosus fundamental verschieden ist, jenem der mitochondrialen Hypothese des Alterns [20], die der radikalischen Schädigung der mitochondrialen DNA eine Schlüsselrolle zuwies. Letzteres wird durch neuere Untersuchungen jedoch nicht gestützt, da mitochondriale Mutator-Mäuse zwar vermehrt Mutationen in der mtDNA aufweisen, nicht jedoch entsprechende mitochondriale Dysfunktion oder erhöhte Radikalbildung [16,21].

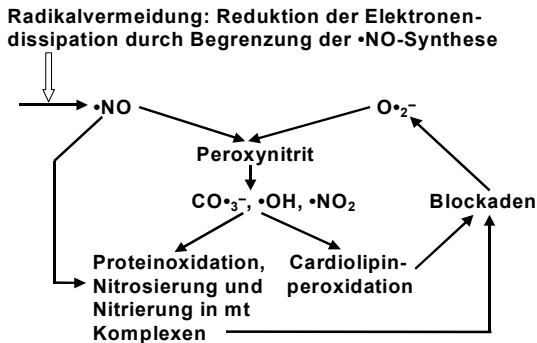


Abb. 2: Erhöhte Bildung von O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> durch übermäßige •NO-Synthese und Radikalvermeidung durch deren Begrenzung.

Während basale und moderat erhöhte  $\bullet\text{NO}$ -Spiegel keine negativen, sondern ggf. sogar günstige Auswirkungen auf den Elektronenfluss haben, können starke akute Steigerungen von  $\bullet\text{NO}$  und seinen Folgeprodukten dramatische Auswirkungen nach sich ziehen. Im Extremfall eines septischen Schocks kann die Atmung großenteils regional zum Erliegen kommen [11,15], mit Absinken des ATP-Spiegels, ggf. bis zum nekrotischen Zelltod oder, infolge eines Zusammenbruchs von  $\Delta\Psi_m$ , zur Apoptose.

Ähnliche, sich selbst verstärkende Mechanismen der erhöhten Radikalbildung aufgrund mitochondrialer Dysfunktion werden auch bei chronischen Prozessen vermutet, vor allem bei altersassoziierten, mitochondrial bedingten Erkrankungen, wie sie mit dem Stichwort „*powerhouse of disease*“ apostrophiert worden sind [22], vielleicht aber sogar beim Alterungsprozess selber [16]. Bei Morbus Alzheimer spielen schleichende exzitotoxische und atypisch-inflammatorische Prozesse unzweifelhaft eine Rolle. In Verbindung mit mikroglialer Aktivierung [4, 23, 24] treten erhöhte Spiegel von  $\bullet\text{NO}$  sowie dem endogenen Exzito- und Oxidotoxin Chinolinsäure auf [25], die sich u.a. in Peroxynitrit-vermittelten Schäden [26,27] einschließlich Tyrosinnitrierung [28] manifestieren. Weitere atypisch-inflammatorische Befunde in Verbindung mit Exzitotoxizität und mitochondrialer Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen finden sich in Ref. [4]. In solchen Fällen ist sogar die intrazelluläre Verteilung der Mitochondrien und das Gleichgewicht zwischen Fusion und Fragmentierung betroffen. Fusionsfördernde Proteine wie DLP1, OPA1, Mfn1 and Mfn2 werden herabreguliert, fragmentierungsfördernde wie Fis1 aufreguliert. Mit der Verkürzung der Mitochondrien gehen ihre Verarmung in der Zellperipherie, eine Abnahme ihrer intrazellulären Masse, erhöhte Radikalbildung und reduzierte ATP-Synthese einher. Auch bei „normalen“, d.h. nicht durch spezifische Erkrankungen verstärkten Alterungsprozessen findet eine funktionelle Abnahme der mitochondrialen Effizienz sowie eine Zunahme der Radikalgenerierung statt. Organabhängig können Zellregionen in unterschiedlichem Ausmaß betroffen sein. Im Myocard zeigen subsarcolemmale Mitochondrien nur geringe funktionelle Einbußen, während die interfibrilläre Subpopulation verminderte Aktivitäten der Komplexe III und IV aufweist, mit der Folge vermehrter Elektronendissipation vor allem seitens der Qo-Stelle von Komplex III [11,15-18].

### **Mechanismen der Radikalvermeidung**

Da das Fangen bereits gebildeter freier Radikale nicht generell ausreicht, erscheint es sinnvoll Mechanismen einer Reduktion der Radikalgenerierung zu

identifizieren. Radikalvermeidung ist auf verschiedenen Ebenen möglich [5, 16, 29]. Ein bislang wenig beachteter, aber vermutlich relevanter Gesichtspunkt ist chronobiologischer Natur. Bei so unterschiedlichen Organismen wie *Drosophila* und Goldhamstern zeigten Mutanten mit verkürzten circadianen Spontanperioden im 24-Stunden-Tag erhöhte oxidative Proteinmodifikationen [30,31], dies obwohl nicht-homologe Gene des zellulären Oszillatorsystems betroffen waren, *per* bei *Drosophila*, *tau* beim Hamster. In der oxidativ besonders vulnerablen Harderschen Drüse der Hamster waren antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathion-Reductase und Catalase aufreguliert, doch wurden erhöhte radikalische Schäden nicht verhindert. Die Bedeutung dieser Befunde betrifft nicht nur die Synchronisation circadianer Rhythmen mit der Außenwelt, sondern auch die interne Koordination von Parallelrhythmen im Multioszillatorsystem eines Vielzellers. Im Einklang mit dieser Deutung ist die Lebensspanne heterozygoter *tau*-Hamster kürzer als die von homozygoten [32]. Störungen des circadianen Systems durch häufige Phasenverschiebungen dürften die Radikalbildung steigern, ein ernst zu nehmendes Problem bei Schichtarbeit. Zu weiteren Aspekten lebensverkürzender und die Gesundheit beeinträchtigender circadianer Dysregulation sowie betroffener Oszillatorgene siehe Ref. [16].

Die Verhinderung neuronaler Überexzitation führt ebenfalls zu geringerer Radikalbildung [4,5], insbesondere über die Begrenzung ionotroper und metabotroper glutamaterger Stimulation, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung der Zellen und  $\bullet\text{NO}$ -Generierung im tolerablen Rahmen gehalten werden. Die partielle Blockade präsynaptischer nicotinischer Acetylcholin-Rezeptoren des Typs  $\alpha 7\text{nAChR}$  trägt durch Erniedrigung der extrazellulären Glutamat-Konzentration hierzu bei.

Radikalvermeidung ist v.a. durch Modulation des mitochondrialen Elektronenflusses zu erreichen. Im Kern läuft dies auf Vermeidung von Elektronenstau und -rückfluss hinaus und somit der  $\text{O}_2\bullet^-$ -Bildung [4, 11, 15, 16]. Sämtliche Prozesse, die eine übermäßige  $\bullet\text{NO}$ -Synthese und damit auch Peroxynitrit-Bildung und Cardiolipin-Peroxidation unterbinden, begünstigen den Elektronenfluss. Da dissipierte Elektronen unter Überbrückung einzelner Respirasomen auf die Atmungskette zurück übertragen werden können, ist auch die Förderung solcher Elektronen-*shuttles* diskutiert worden [5,29], doch sind die experimentellen Evidenzen hierfür noch gering. Acetylierung von Cytochrom c stellt eine weitere Ursache von Blockaden im Elektronenfluss und Radikalgenerierung dar, ein Prozess, der durch die Deacetylase Sirt5 revertiert wird [33]. Da mitochondrial wirkende Signalmoleküle die re-

spirasomalen Aktivitäten submitochondrialer Partikel erhöhen können, mag auch die, teils direkt gezeigte, Neusynthese von Untereinheiten der Komplexe zur Förderung des Elektronenflusses beitragen [11, 34, 35].

Des Weiteren erweist sich die Erhöhung der mitochondrialen Gesamtmasse der Zelle als günstig. Sie führt zu einer effizienteren Substratnutzung für die ATP-Bildung und aufgrund einer geringeren Wahrscheinlichkeit des Überfließens von Elektronen ebenfalls zu geringerer Radikalbildung. Dieser Aspekt hat zunehmendes gerontologisches Interesse auf sich gezogen [36-39]. Mittlerweile sind Signalwege der mitochondrialen Biogenese identifiziert worden, wobei Faktoren wie AMPK (AMP-activated protein kinase), PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) und PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) eine Schlüsselrolle zukommt [4,39]. Aktivatoren dieser Signalwege sollten die Radikalvermeidung fördern. Interessanter Weise existiert hier eine Verbindung zum Energiestoffwechsel auf der Basis von Nährstoffverfügbarkeit. Die lebensverlängernde Wirkung kalorischer Restriktion wird gegenwärtig in diesem Sinne interpretiert [36-38].

### **Interventionen zur Radikalvermeidung**

Neben der Beachtung eines gesundheitsfördernden Lebensstils, der u.a. ein Übermaß an Kalorienzufuhr vermeidet sowie häufige Störungen des circadianen Oszillatorsystems, stellt sich die Frage nach Substanzen, die der Radikalvermeidung dienen könnten. Dieses Thema ist kürzlich in einer längeren Übersicht [4] dargestellt worden und soll hier nur zusammenfassend behandelt werden. Diverse Studien haben sich mit Nitronen beschäftigt, die primär als *spin traps* wirken, aber eine Vielzahl von Folge- und Nebeneffekten erzeugen. Hierzu gehören die Herabregulation von Entzündungsmediatoren, Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), Modulation des mitochondrialen Elektronenflusses, mitochondriale Protektion und Biogenese. Um eine höhere mitochondriale Verfügbarkeit zu erreichen, wurden Varianten mit mitochondrialem Targeting und amphiphilen Eigenschaften synthetisiert [4,40-42]. Viele von ihnen reduzierten die Elektronendissipation und erwiesen sich als potente Protektoren gegenüber mitochondrial wirkenden Toxinen. Bei einem gerontologischen Modellorganismus, dem Rotator *Philotodina*, verlängerten einige amphiphile Nitronen die Lebensspanne z.T. um mehr als das Doppelte [4,40]. Leider überwogen bei Nagern jedoch toxische Effekte aufgrund metabolischer Instabilität [4].

Mitochondriale Protektion in Verbindung mit Modulation des Elektronenflusses und mitochondrialer Biogenese wurde auch für Leptin beschrie-



ben [4], was zunächst überraschend erscheint, jedoch mit Blick auf die nutritive Rolle dieses Hormons nicht unplausibel ist. Da Leptin auch von Neuronen ausgeschüttet wird, sind beschriebene neuroprotektive Effekte ebenfalls von Interesse. Für praktische Anwendungen wird man jedoch vermutlich auf Leptin-Mimetika zurückgreifen müssen [4].

Radikalvermeidung und Zellprotektion wurden auch für einige antiexzitatorische glutamaterge Modulatoren gezeigt [4]. Kynurensäure wirkt als endogener Inhibitor des NMDA-Rezeptors und des Acetylcholin-Rezeptors  $\alpha 7nAChR$ . Diese beiden Rezeptoren sind ebenfalls Bindungsorte von Memantin, einem Adamantanderivat mit moderaten Einflüssen auf weitere Signalsysteme, welches derzeit in der Alzheimer-Therapie getestet wird [4]. Ein relativ schwach bindender Modulator insbesondere metabotroper Glutamat-Rezeptoren wie  $mGlu_3$  ist L-Theanin [4], das in Ostasien in erheblichen Mengen als Nahrungsergänzungsmittel konsumiert wird. Obwohl diese Substanz nach bisheriger Kenntnis nur über mäßige antiexzitatorische Effekte verfügt, scheint sie als indirekter mitochondrialer Modulator effektiv zu sein. Noch unveröffentlichte Daten zeigen bei Nagern Erhöhungen der ATP-Konzentration im ZNS, lebensverlängernde Wirkungen, Schutz der serotonergen Innervation im Hippocampus und Förderung eines gesunden Alterns [B. Poeggeler, pers. Mitt.]. Solche Befunde werfen jedoch die Frage auf, ob diese allein durch Antiexzitation erklärbar sind oder ob nicht bislang wenig verstandene neurotrophe Effekte der Interpretation zu Grunde gelegt werden müssten.

Sirtuine sind als Faktoren der Langlebigkeit in der aktuellen Diskussion. Einige ihrer Isoformen (Sirt1 bis Sirt7) modulieren den Elektronenfluss und fördern die mitochondriale Biogenese, teils sind sie mitochondrial lokalisiert [4, 16, 36, 38]. Als Sirtuin-Aktivator ist zunächst das Phytoalexin Resveratrol bekannt geworden, welches u.a. in Rotwein und Erdnüssen enthalten ist, jedoch in Hinblick auf Sirtuine nur mäßig wirksam ist und dies vielleicht nur auf indirekte Weise [4]. Synthetische Sirtuin-Aktivatoren sind um Größenordnungen effektiver, bedürfen jedoch genauer Verträglichkeitsstudien [4]. Resveratrol zeigt darüber hinaus Effekte als Antioxidans und Entzündungshemmer, die im Sinne der Radikalvermeidung zum Tragen kommen mögen.

Die Substanz mit dem breitesten bekannten Wirkungsspektrum in Hinblick auf Radikalvermeidung ist Melatonin, ein Hormon des Pinealorgans, welches aber auch extrapineal synthetisiert wird [4, 11, 15]. Seine bemerkenswerte Pleiotropie beruht zum einen auf seiner orchestrierenden Rolle, zum anderen auf seiner Funktionserweiterung in der Evolution, vom direkten

Antioxidans bei Einzellern zu einem Signal der Dunkelheit, der Immunmodulation, sexueller Selektion und reproduktiver Fitness bei Vertebraten [43]. Unter den diskutierten Substanzen ist es die einzige mit primärer chronobiologischer Rolle. Es synchronisiert circadiane Rhythmen und koordiniert interne Phasenbeziehungen zentraler und peripherer Oszillatoren, einschließlich zellulärer Paralleloszillatoren, die auf Isoformen der Uhrgene basieren [44-46]. Darüber hinaus stimuliert es antioxidative Enzyme, vor allem Glutathionperoxidase, und besitzt multiple antiexzitatorische und antiinflammatorische Effekte [5,44]. Besonders bedeutend für die Radikalvermeidung erscheinen die Herabregulation der iNOS, einschließlich ihrer mitochondrialen Subform, sowie die Hemmung der neuronalen NOS (nNOS) [11,16,47,48]. Beim Sepsis-Modell der Zökalligator und Punktion ließen sich mit Melatonin in ihrem Ausmaß bemerkenswerte Protektionen der Mitochondrienfunktion erreichen, wobei die Abhängigkeit der Blockaden von der iNOS durch die Toleranz gegenüber mitochondrialen Schäden bei iNOS-*knockouts* demonstriert wurde. Ähnlich deutliche Effekte wurden im ZNS gegen mitochondriale und Exzitotoxine durch Hemmung der nNOS erzielt. In allen Fällen ließen sich Verbesserungen in den Aktivitäten der Komplexe I, III und IV, Erhöhungen der Energieeffizienz und der ATP-Bildung zeigen. Interessanter Weise wurden ähnliche Effekte wie beim Melatonin hinsichtlich iNOS, nNOS und respirasomalen Aktivitäten auch durch seinen Metaboliten *N*<sup>1</sup>-Acetyl-5-methoxykynuramin erzeugt [11,16,47,48]. Über diese Wirkungen hinaus deutet sich ein weiterer Mechanismus der mitochondrialen Kontrolle durch Melatonin an: In der Amphipathischen Rampe von Komplex I wurde eine hochaffine Bindungsstelle ( $K_d = 150 \text{ pM}$ ) für Melatonin gefunden [10, 11, 15], deren genaue Bedeutung noch unklar ist.

### Ausblick

Radikalvermeidung ist unter verschiedenen Aspekten von Interesse. Substanzen, die der Peroxynitrit-Bildung entgegen wirken, könnten sich bei akuten, dramatischen Situationen wie im Extremfall Sepsis als nützlich erweisen. Neuronale Überexzitation, ggf. in Verbindung mit schleichenden Entzündungsprozessen bei neurodegenerativen Erkrankungen, könnte ebenfalls Anwendungsziel radikalvermeidender Therapien werden. Memantin und auch Melatonin sind diesbezüglich untersucht worden, doch stehen überzeugende Resultate beim Menschen noch aus, vielleicht aufgrund des oft zu späten Therapiebeginns.

Ein weiteres Feld betrifft den Alterungsprozess selber. Hier gibt es immerhin einige Hoffnung gebende tierexperimentelle Ansätze. Gealterte Seneszenz-akzelerierte SAMP8-Mäuse, die mit normal alternden, genetisch ähnlichen SAMR1-Mäusen verglichen werden können, zeigen eine Vielzahl mitochondrialer Änderungen wie Herabregulation respirasomaler Untereinheiten, verminderte Aktivitäten der betroffenen Komplexe und erhöhte Elektronendissipation [4,11]. Melatonin führt bei SAMP8 zu Verbesserungen in der Aktivität von Komplex I, in der Energie-Effizienz der Atmungskette und der ATP-Bildung, ferner zur Steigerung der mentalen Leistung und zur Lebensverlängerung [Zusf.: 4,11,16]. Neuere Daten zeigen, dass Melatonin ebenfalls die Expression von Sirt1 und hiervon ausgehende Signalwege der mitochondrialen Biogenese ansteuert [16,49-51].

Lebensverlängerung, die im Tiermodell auch für L-Theanin gezeigt wurde (s.o.), muss nicht primäres Ziel der Forschung zur Radikalvermeidung sein, könnte sich jedoch als Nebeneffekt einer Förderung gesunden Alterns ergeben.

Bevor eine der hier aufgeführten Substanzen beim Menschen für gerontologische Zwecke anwendbar wird, sind klinische Langzeitstudien erforderlich. Im Vergleich zu vielen anderen Substanzen ist Melatonin zumeist sehr gut verträglich, doch existieren durchaus Bedenken bezüglich Reproduktion, Medikamentenwechselwirkung sowie einzelner Erkrankungen [52]. Jede Anwendung von Melatonin hat jedoch seine chronobiologische Funktion zu berücksichtigen und ein striktes Zeitschema einzuhalten. Durchaus erwünschte weitere Effekte können eine Verbesserung der Schlafqualität sein [52], doch erscheint die Antagonisierung altersbedingter Verluste der circadianen Schwingungsamplitude und des Verlusts interner Rhythmuskopplungen eher als ein primäres Ziel, welches neben akuten Effekten auf die Einschlaf latenz nachhaltige Verbesserungen im gesamten Schlafverhalten mit sich bringen kann. Die chronobiologischen Wirkungen können zu anderen radikalvermeidenden Mechanismen hinzu treten. Ohne medikamentöse Intervention ist jedoch, solange keine Neurodegeneration in den circadianen Schrittmachern oder im Pineal vorliegt, eine Verbesserung der Rhythmik ebenfalls durch intensive morgendliche Lichtexposition möglich, am besten durch Licht mit hohem Blauanteil, welches von den Melatonopsin-haltigen retinalen Ganglienzellen absorbiert wird, die die photische Information an die Schrittmacher vermitteln.

## Literatur

- [1] Halliwell, B.B., Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine, 4<sup>th</sup> Edition; Oxford University Press, Oxford 2007.
- [2] Frank, B., Gupta, S.: A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Psychiatry* 2005; 17: 269-286.
- [3] Isaac, M.G.E.K.N., Quinn, R., Tabet, N.: Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2008; 3: article no. CD002854.
- [4] Hardeland, R.: Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents. *Molecules* 2009; 14: 5054-5102.
- [5] Hardeland, R.: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27: 119-130.
- [6] Chéret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P., Mallet, J., Cumano, A., Krause, K.H., Mallat, M.: Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J. Neurosci.* 2008; 28: 12039-12051.
- [7] Block, K., Gorin, Y., Abboud, H.E.: Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 14385-14390.
- [8] Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G.; Lenaz, G.: The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* 2001; 505: 364-368.
- [9] Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C., Biondi, A.: Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1757: 1406-1420.
- [10] Hardeland, R., Poeggeler, B., Pappolla, M.A.: New vistas on mitochondrial electron flux rates and aging. *Cell* 2008; Comment: <http://www.cell.com/content/article/comments?uid=PIIS0092867408000627>.
- [11] Hardeland, R., Poeggeler, B., Pappolla, M.A. Mitochondrial actions of melatonin — an endeavor to identify their adaptive and cytoprotective mechanisms. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Math.-Nat. Kl.* 2009; 65(3): 14-31.
- [12] Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, M.P., Kao, J.P., Lakatta, E.G., Sheu, S.S., Ouyang, K., Chen, J., Dirksen, R.T., Cheng, H.: Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008; 134: 279-290.
- [13] Sheu, S.S., Wang, W., Cheng, H., Dirksen, R.T.: Superoxide flashes: illuminating new insights into cardiac ischemia/reperfusion injury. *Future Cardiol.* 2008; 4: 551-554.
- [14] Saotome, M., Katoh, H., Yaguchi, Y., Tanaka, T., Urushida, T., Satoh, H., Hayaishi, H.: Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reac-

- tive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296: H1125-H1132.
- [15]Hardeland, R.: Melatonin, mitochondrial electron flux and leakage: recent findings and resolution of contradictory results. *Adv. Stud. Biol.* 2009; 1: 207-230.
- [16]Hardeland, R., Coto-Montes, A.: New vistas on oxidative damage and aging. *Open Biol. J.* 2010; 3: 39-52.
- [17]Lesnefsky, E.J., Hoppel, C.L.: Cardiolipin as an oxidative target in cardiac mitochondria in the aged rat. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1777: 1020-1027.
- [18]Lesnefsky, E.J., Minkler, P., Hoppel, C.L.: Enhanced modification of cardiolipin during ischemia in the aged heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 46: 1008-1015.
- [19]Wenz, T., Hielscher, R., Hellwig, P., Schägger, H., Richers, S., Hunte, C.: Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc<sub>1</sub> complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim. Biophys. Acta* 2009; 1787: 609-616.
- [20]Harman, D.: The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 1972; 20: 145-147.
- [21]Thompson, L.V.: Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Exp. Gerontol.* 2006; 41: 1220-1222.
- [22]Lane, N.: Mitochondrial disease: Powerhouse of disease. *Nature* 2006; 440: 600-602.
- [23]MacKenzie, I.R.A., Hao, C., Muñoz, D.G.: Role of microglia in senile plaque formation. *Neurobiol. Aging* 1995; 16: 797-804.
- [24]McGeer, E.G., McGeer, P.L.: Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* 2010; 19: 355-361.
- [25]Guillemin, G.J., Brew, B.J., Noonan, C.E., Takikawa, O., Cullen, K.M.: Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2005; 31: 395-404.
- [26]Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., Perry, G.: Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 1997; 17: 2653-2657.
- [27]Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R.: Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav. Brain Funct.* 2006; 2: article no. 15 [doi: 10.1186/1744-9081-2-15].
- [28]Hensley, K., Maidt, M.L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W.R., Floyd, R.A.: Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.* 1998; 18: 8126-8132.
- [29]Hardeland, R., Coto-Montes, A., Poeggeler, B.: Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 2003; 20: 921-962.
- [30]Coto-Montes, A., Hardeland, R.: Diurnal rhythm of protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in *Drosophila melanogaster*: Influence of clock gene alleles and deficiencies in the formation of free-radical scavengers. *Biol. Rhythm Res.* 1999; 30: 383-391.

- [31]Coto-Montes, A., Tomás-Zapico, C., Rodríguez-Colunga, M.J., Tolivia-Cadreja, D., Martínez-Fraga, J., Hardeland, R., Tolivia, D.: Effects of the circadian mutation 'tau' on the Harderian glands of Syrian hamsters. *J. Cell. Biochem.* 2001; 83: 426-434.
- [32]Hurd, M.W., Ralph, M.R.: The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *J. Biol. Rhythms* 1998; 13: 430-436.
- [33]Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C.F., Steegborn, C.: Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J. Mol. Biol.* 2008; 382: 790-801.
- [34]Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., León, J., Carazo, A., Khaldy, H.: Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 527: 549-557.
- [35]Anisimov, V.N., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Anisimov, S.V., Vesnushkin, G.M., Vinogradova, I.A.: Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 57: 573-589.
- [36]Guarente, L.: Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2007; 72: 483-488.
- [37]Fontán-Lozano, A., López-Lluch, G., Delgado-García, J.M., Navas, P., Carrión, A.M.: Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.* 2008; 38: 167-177.
- [38]Guarente, L.: Mitochondria — a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 2008; 132: 171-176.
- [39]Onyango, I.G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A.B., Swerdlow, R.H.: Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1802: 228-234.
- [40]Poeggeler, B., Durand, G., Polidori, A., Pappolla, M.A., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A., Böker, J., Hardeland, R., Pucci, B.: Mitochondrial medicine: neuroprotection and life extension by the new amphiphilic nitron LPBNAH acting as a highly potent advanced antioxidant agent. *J. Neurochem.* 2005; 95: 962-973.
- [41]Ortial, S., Durand, G., Poeggeler, B., Polidori, A., Pappolla, M.A., Böker, J., Hardeland, R., Pucci, B.: Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers: A new class of protective agents. *J. Med. Chem.* 2006; 49: 2812-2820.
- [42]Durand, G., Poeggeler, B., Böker, J., Raynal, S., Polidori, A., Pappolla, M.A., Hardeland, R., Pucci, B.: Fine-tuning the amphiphilicity: A crucial parameter in the design of potent  $\alpha$ -phenyl-*N-tert*-butylnitron analogues. *J. Med. Chem.* 2007; 50: 3976-3979.
- [43]Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J.: The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2010; 85: 607-623.

- [44]Hardeland, R.: Melatonin, hormone of darkness and more – occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65: 2001-2018.
- [45]Hardeland, R.: Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors* 2009; 35: 183-192.
- [46]Agez, L., Laurent, V., Guerrero, H.Y., Pévet, P., Masson-Pévet, M., Gauer, F.: Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J. Pineal Res.* 2009; 46: 95-105.
- [47]Escames, G., López, L.C., Ortiz, F., López, A., García, J.A., Ros, E., Acuña-Castroviejo, D.: Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* 2007; 274: 2135-2147.
- [48]Tapias, V., Escames, G., López, L.C., López, A., Camacho, E., Carrión, M.D., Entrena, A., Gallo, M.A., Espinosa, A., Acuña-Castroviejo, D.: Melatonin and its brain metabolite *N*<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* 2009; 87: 3002-3010.
- [49]Gutierrez-Cuesta, J., Tajés, M., Jiménez, A., Coto-Montes, A., Camins, A., Pallàs, M.: Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J. Pineal Res.* 2008; 45: 497-505.
- [50]Chang, H.-M., Wu, U.-I., Lan, C.-T.: Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats. *J. Pineal Res.* 2009; 47: 211-220.
- [51]Tajés, M., Gutierrez-Cuesta, J., Ortuño-Sahagun, D., Camins, A., Pallàs, M.: Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J. Pineal Res.* 2009; 47: 228-237.
- [52]Hardeland, R.: New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged release melatonin and synthetic melatonergic agonists. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2009; 5: 341-354.