

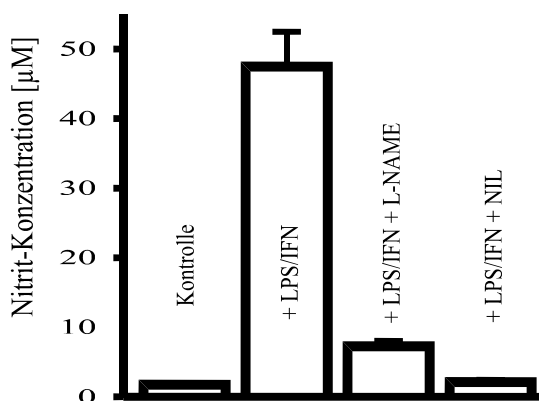
3.1 Induktion der Stickoxid Produktion

Ziel war es, mittels eines Zellkulturmodells die Effekte einer erhöhten Stickoxidproduktion zu untersuchen. Dazu dienten primäre Mikro-/Astroglia-kulturen der Ratte, die durch Zugabe einer Kombination aus LPS und IFN zur Expression der induzierbaren NOS (iNOS) provoziert werden (Galea, Feinstein et al. 1992).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden zu allen Experimenten unbehandelte Kulturen als Kontrollen verwendet. Um zu zeigen, daß die gemessenen Effekte in der Tat auf einer erhöhten Stickoxidproduktion, und nicht etwa auf einem sekundären Induktionseffekt beruhen, wurden induzierte Kulturen verwendet, die zusätzlich mit dem NOS-Inhibitor NIL behandelt wurden. Zugunsten einer übersichtlichen Darstellung wird dieser Sachverhalt im folgenden mit den Buchstaben **K** (für Kontrolle), **I** (für induziert) und **N** (für induziert + NIL) verkürzt dargestellt.

3.1.1 Expressionsmuster der iNOS und Stickoxidproduktion

Nach Zugabe von LPS und IFN zur Zellkultur für 18 h wurde die Produktion von Stickoxid durch die Messung seines Oxidationsprodukts Nitrit verifiziert, ebenso die Wirksamkeit der NOS-Inhibitoren NIL und L-NAME (Abb. 1).



Stickoxidbildung. Induzierte Kulturen zeigen 18 h nach Stimulation mit LPS/IFN eine Nitritakkumulation von durchschnittlich $48 \mu\text{M}$ ($\pm 8 \mu\text{M}$). Die gleichzeitige Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME (1 mM) bewirkte einen Abfall der Nitritwerte auf $8 \mu\text{M}$ ($\pm 1 \mu\text{M}$), während durch den NOS-Inhibitor NIL (500 μM) eine vollständige Repression der Nitritwerte erreicht wurde. Mittelwerte + SEM aus 60 Experimenten pro Gruppe.

Abbildung 1: Nitritbildung in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen als Nachweis der

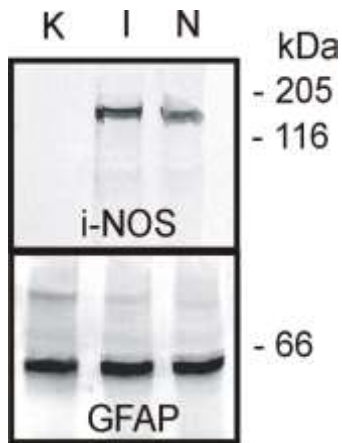


Abbildung 2: Westernblots von 10 %igen SDS-Gelen zum Nachweis der iNOS-Expression im Homogenat von primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen. In unbehandelten Kontrollkulturen (K) läßt sich die iNOS nicht nachweisen, während in mit LPS/IFN (I) für 18 h behandelten Kulturen eine deutliche Bande (133 kDa) im Western-Blot erscheint. Diese Bande ist auch detektierbar, wenn parallel zur Induktion der iNOS-Inhibitor NIL (N) zugesetzt wird. Die Intensität der Bande des Astrocytenmarkers GFAP (68 kDa), ist in allen 3 Gruppen annähernd gleich.

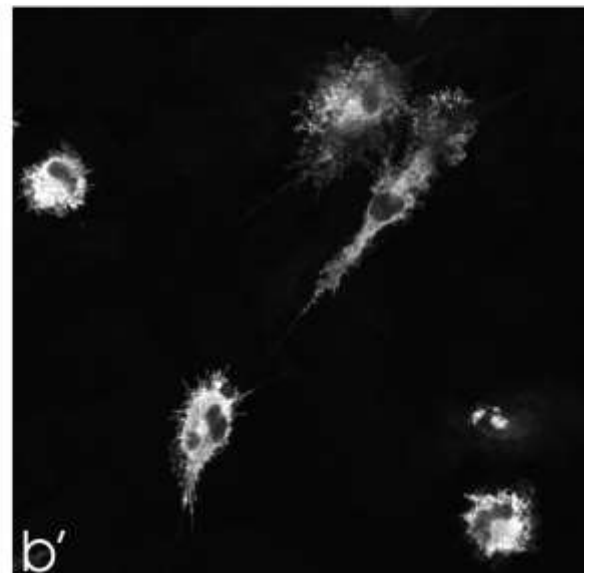
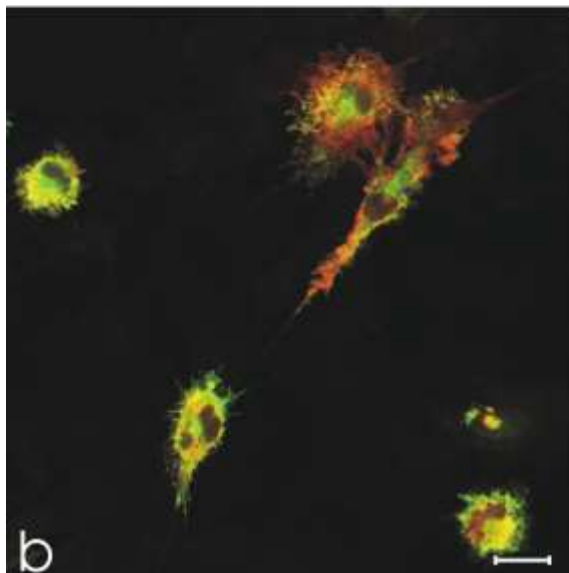
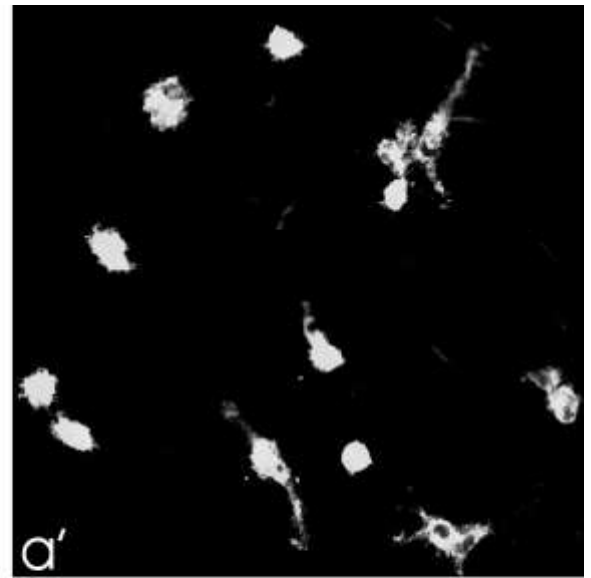
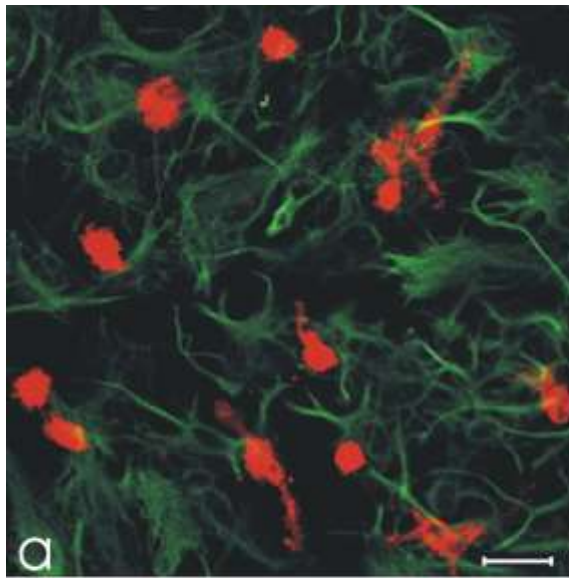


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis der iNOS in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen 18 h nach Zugabe von LPS/IFN. Zur zellulären Lokalisation wurde als Astrocytenmarker ein Antikörper gegen GFAP und als Mikroglia marker ein Antikörper gegen CD11b/c (Ox42) verwendet (jeweils grün, iNOS rot). Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen (GFAP in a und Ox42 in b), während die rechte Spalte den roten Kanal (iNOS) als Graustufenbild darstellt. GFAP positive Astrocyten exprimieren keine iNOS (a: Balken 20 μ M), wohl aber Ox42-positive Mikrogliazellen (b: Balken 10 μ M).

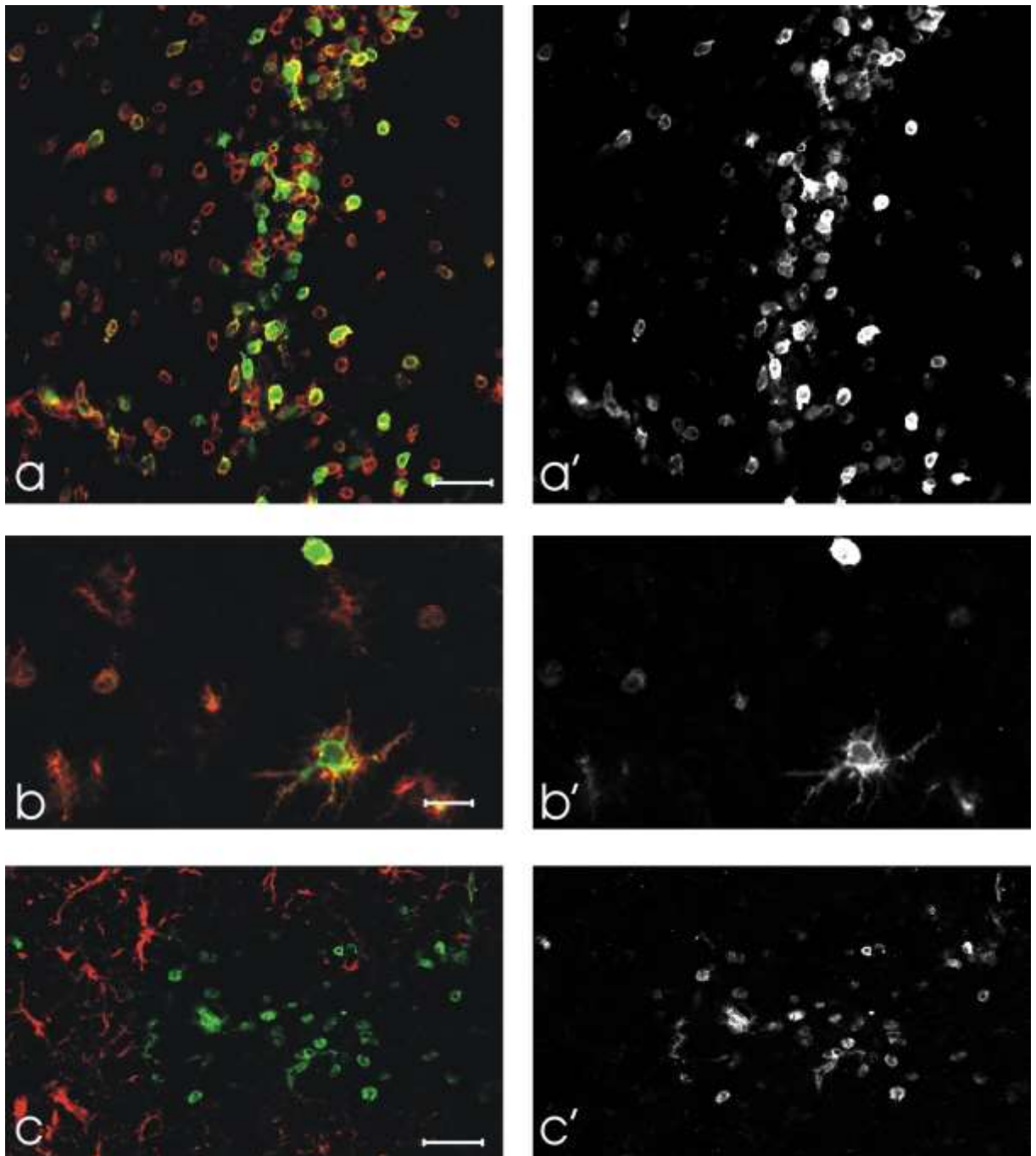


Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis der iNOS im Striatum der Ratte 24 h nach intrastriatärer Injektion von LPS/IFN. Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen, während die rechte Spalte den grünen Kanal (iNOS) als Graustufenbild darstellt. Die iNOS läßt sich ausschließlich in Ox42-positiven (rot) Mikrogliazellen nachweisen (a: Balken 25 μ M, b: Balken 10 μ M), während GFAP-positive Astrocyten (rot) dieses Protein nicht exprimieren (c). Jedoch exprimiert nur eine Subpopulation der Ox42-positiven Mikroglia die iNOS. Die iNOS-positiven Mikroglia haben überwiegend eine amöboide Morphologie (a) und nur in Einzelfällen ließ sich die iNOS in ramifizierten Mikrogliazellen nachweisen (b).

Es zeigte sich, daß NIL die iNOS-vermittelte Nitritproduktion deutlich besser blockiert als das Arginin-Analogon L-NAME. Die Induktion der Zellkulturen war gut reproduzierbar mit einer Nitritakkumulation von 48 μ M (\pm 8 μ M) nach 18 h. Mittels Westernblot-Analyse ließ sich die Expression der iNOS nach LPS/IFN-Stimulation im Kulturhomogenat nachweisen (Abb. 2).

Die Bande im Westernblot liegt bei 133 kDa, was dem bekannten Molekulargewicht der iNOS (Ratte 133 kDa) entspricht. Die Induktion der iNOS erfolgte bei dem gleichzeitigen Zusatz des NOS-Inhibitors NIL mit einer ähnlich ausgeprägten Bande, ist also durch die Eigenaktivität des Enzyms nicht beeinflusst.

Da die Westernblot-Analyse des Zellkulturhomogenats keine Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation der iNOS Expression erlaubt, erfolgte außerdem der immunohistochemische Nachweis der iNOS in den verwendeten Kulturen. Hierbei diente das Intermediärfilament GFAP (glial fibrillary acidic protein) als Marker für Astrocyten und der Komplementrezeptor 3 (CD11b/c) als Marker für Mikrogliazellen. Innerhalb dieser Arbeit wird, wie in der Fachliteratur üblich, zur Zelltypisierung nicht der Name des Antigens (CD11b/c), sondern der des Antikörpers Ox42 verwendet.

Die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der iNOS-Expression durch iNOS/GFAP und iNOS/Ox42-Doppelfärbungen ergaben, daß das Enzym ausschließlich in Ox42 positiven Mikrogliazellen exprimiert wird, während GFAP-positive Astrozyten generell keine iNOS-Expression zeigten (Abb. 3). In 60 untersuchten Zellkulturen fanden sich lediglich drei Zellkulturen mit jeweils einigen (5 bis 10) Zellen, die zwar iNOS-positiv waren, aber nicht für Ox42 (noch für GFAP). Zudem war das detektierte Fluoreszenzsignal wesentlich schwächer als das der umliegenden Mikrogliazellen.

Die Ergebnisse der iNOS-Induktion in Zellkultur wurden mit denen unter In-vivo-Bedingungen verglichen. Die Injektion von LPS/IFN in das Striatum der Ratte ergab ein ähnliches Expressionsmuster der iNOS, das dem zuvor in Zellkulturen gefundenen glich. Nach einem Tag Überlebenszeit beschränkt sich die iNOS-Expression ebenfalls auf Mikrogliazellen (Abb. 4). Das deutlichste Signal zeigten dabei amöboide Mikrogliazellen, während ramifizierte Mikrogliazellen (die ubiquitär im ZNS vorkommen und als ‚ruhend‘ angesehen werden (Gehrmann, Matsumoto et al. 1995)) nur in Einzelfällen, und dann wesentlich schwächer gefärbt waren. Sowohl auf der kontralateralen Injektionsseite als auch auf der ipsilateralen Injektionsseite in Tieren, die eine Kontrollinjektion mit PBS erhalten hatten, ließ sich die iNOS nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Da eine erhöhte Stickoxidproduktion potentiell zellschädigend wirkt, wurde die Viabilität der Kulturen untersucht. Als Maß hierfür wurde der LDH-Gehalt im Kulturüberstand verwendet. Diese Methode beruht auf der Freisetzung der LDH aus dem Cytoplasma infolge einer

Schädigung der Plasmamembran und ist als Viabilitätstest seit langem akzeptiert. Der Zeitverlauf, sowohl der LDH-Freisetzung als auch der Nitritbildung, wurde über 4 Tage verfolgt (Abb. 5). Erhöhte Nitritwerte konnten bereits 5 h nach Zugabe von LPS/IFN nachgewiesen werden. Es folgte ein kontinuierlicher Anstieg für 24 h, der sich dann etwas abflachte. Bis 24 h nach Induktion zeigten induzierte Kulturen, trotz gesteigerter Stickoxidproduktion, keine wesentliche Erhöhung der LDH-Werte im Vergleich zu Kontrollkulturen. Eine leichte Differenz ergab sich erst nach 40 – 60 h, einem Zeitraum, der in den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde.

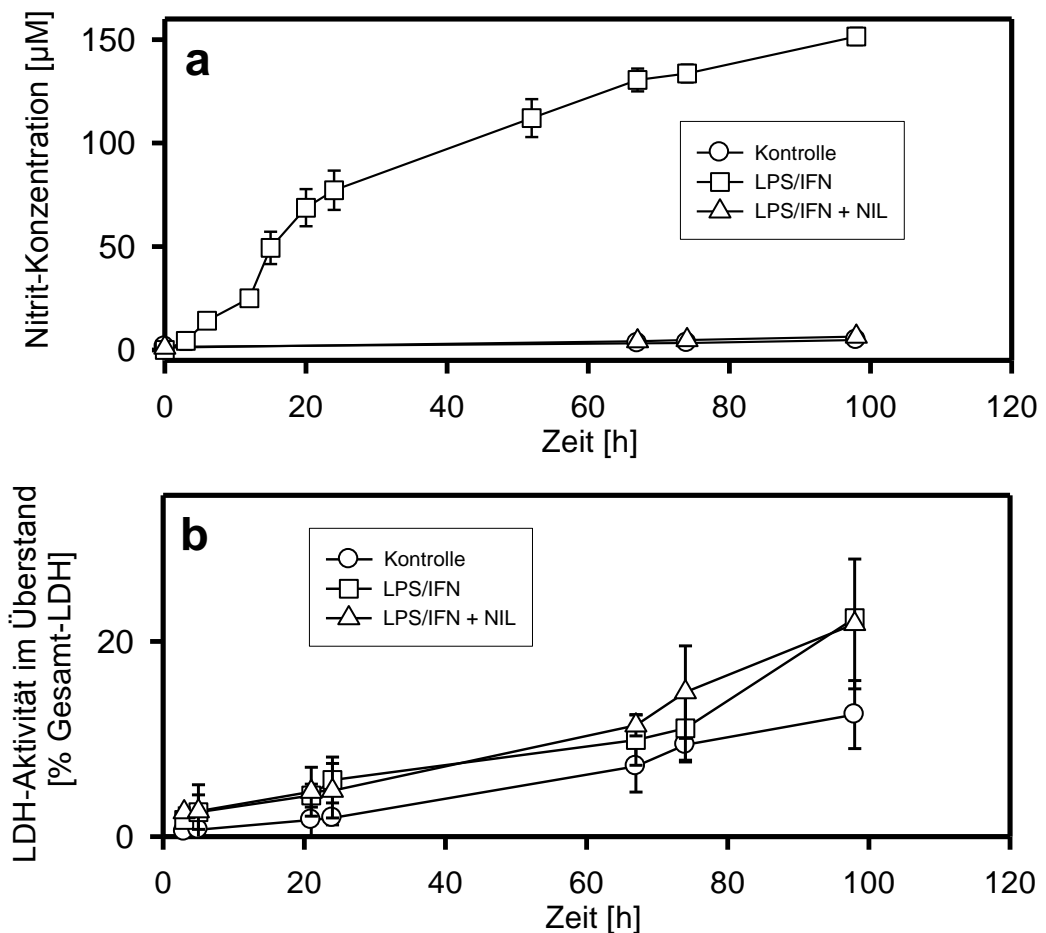


Abbildung 5: Zeitverlauf der (a) Nitrit- und (b) LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand von Kontrollkulturen, mit LPS/IFN induzierten Kulturen sowie von induzierten Kulturen, die parallel zur Induktion mit NIL behandelt wurden. Die Nitritwerte steigen in induzierten Kulturen nach einer initialen Lag-Phase von etwa 6 h steil an, wobei der Anstieg nach 24 h deutlich flacher ausfällt. Die parallel gemessenen LDH-Werte zeigen einen nahezu linearen Anstieg über einen Zeitraum von 72 h. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich für alle 3 Meßreihen ein Wert von etwa 10 % der Gesamt-LDH im Zellkulturüberstand nachweisen. Im weiteren Verlauf divergieren die Werte der Meßreihen, so daß die induzierten Kulturen (mit oder ohne NIL) nach weiteren 24 h eine Verdoppelung der LDH auf 20 % im Überstand erreichen, während die Kontrollkulturen linear weiter auf 12 % ansteigen. Mittelwerte \pm SEM aus 30 Experimenten pro Gruppe.

3.1.2 Schutzenzyme

Für die effektive oxidative Belastung einer Zelle spielen intrazelluläre Schutzenzyme eine bedeutende Rolle. Durch Westernblot-Analyse wurden im Zellkulturlysate die Enzyme Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Glutathionperoxidase (GPx) sowie Katalase nachgewiesen (Abb. 6). Ein Induktionseffekt durch LPS/IFN ließ sich nur für die Mn-SOD beobachten. Daß diese Induktion ein Effekt des LPS/IFN, und nicht etwa einer gesteigerten Stickoxidproduktion ist, konnte durch die gleichzeitige Gabe des NOS-Inhibitors NIL gezeigt werden. Alle anderen Enzyme waren sowohl in Kontrollkulturen als auch in induzierten Kulturen gleichmäßig exprimiert.

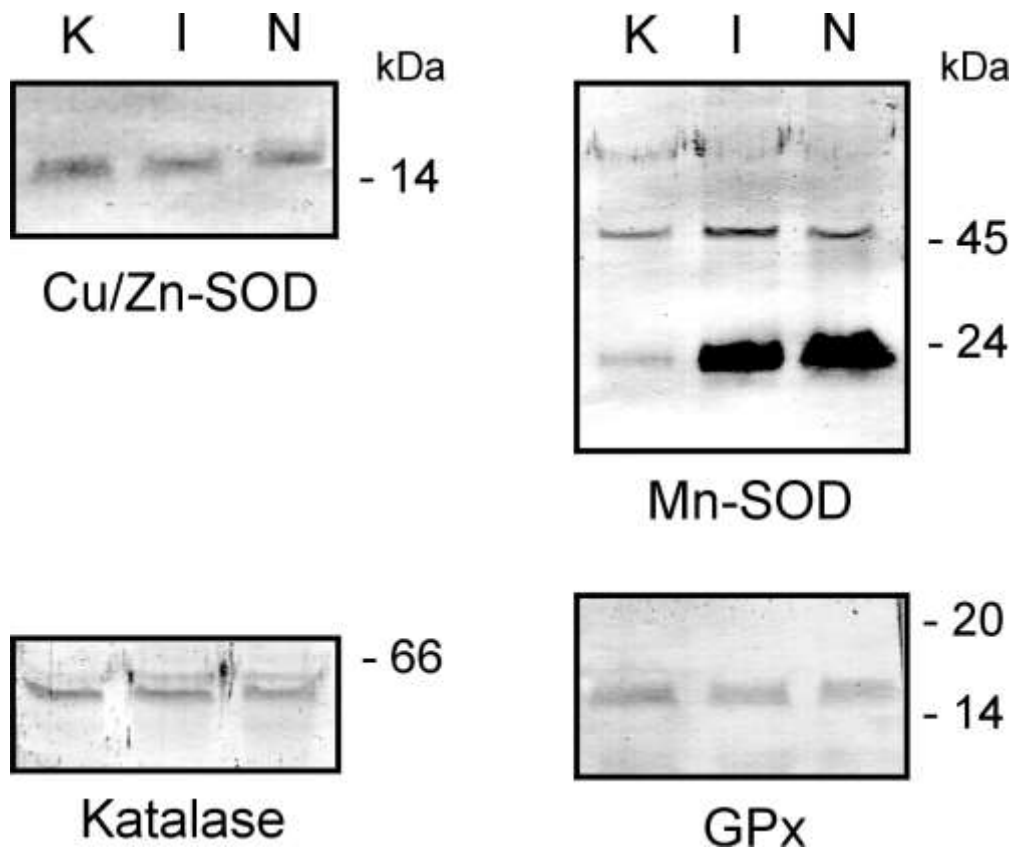


Abbildung 6: Westernblots von 8%igen SDS-Gelen des Homogenats von primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen zum Nachweis antioxidativer Schutzenzyme. Nur für die Mn-SOD (zwei Banden bei 24 und 45 kDa) ließ sich ein Induktionseffekt durch den Zusatz von LPS/IFN zeigen, während die Enzyme Cu/Zn-SOD (16 kDa), GPx (18 kDa) und Katalase (60 kDa) sowohl in Kontrollkulturen (K) als auch in induzierten Kulturen (I, N) Banden mit einer ähnlichen Intensität zeigten. Die verstärkte Expression der Mn-SOD beruht in der Tat auf dem Zusatz von LPS/IFN und, wie durch den Einsatz des NOS-Inhibitors NIL gezeigt, nicht auf der Produktion von Stickoxid.

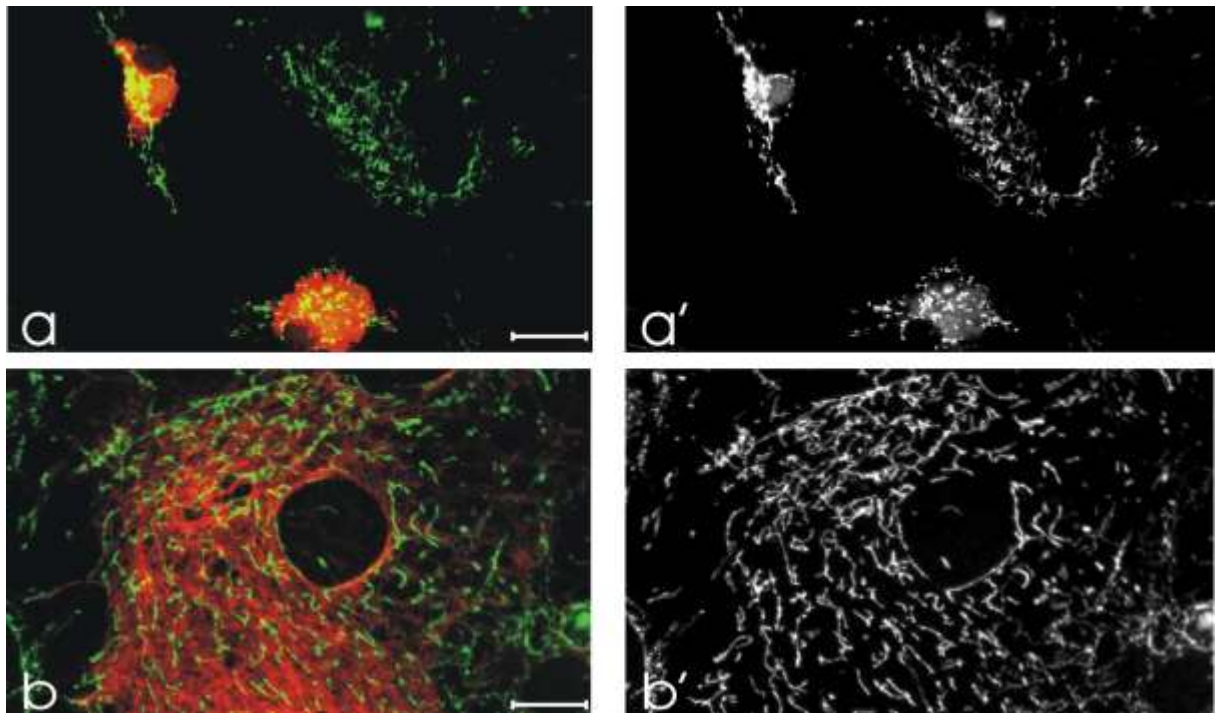


Abbildung 7: Immunhistochemische Lokalisation der Mn-SOD in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen. Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen (Ox42 in a und GFAP in b; jeweils rot), während die rechte Spalte den grünen Kanal (Mn-SOD) als Graustufenbild darstellt. Die Mn-SOD lässt sich sowohl in Mikrogliazellen (a) wie auch in Astrocyten in Mitochondrien darstellen. Die Intensität der Färbung unterliegt einer gewissen Streuung (a), zeigt aber keine zelltypspezifischen Unterschiede.

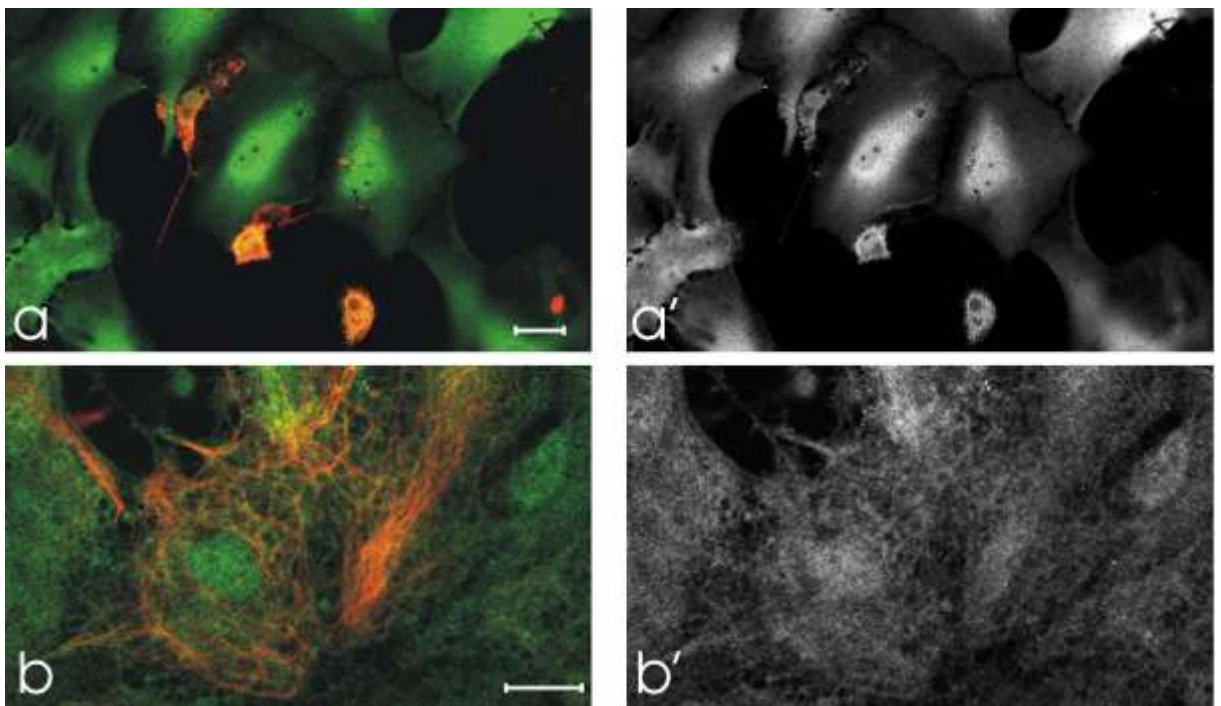


Abbildung 8: Immunhistochemische Lokalisation der Cu/Zn-SOD in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen (Balken a, b: 10 μ M). Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen (Ox42 in a und GFAP in b; jeweils rot), während die rechte Spalte den grünen Kanal (Cu/Zn-SOD) als Graustufenbild darstellt. Die Cu/Zn-SOD ist ubiquitär im Cytoplasma und in einigen Zellen auch im Zellkern verteilt. Bei höherer Vergrößerung lassen sich fein-granuläre Strukturen erkennen (b). Die Intensität der Färbung unterliegt einer gewissen Streuung (a), zeigt aber keine zelltypspezifischen Unterschiede.

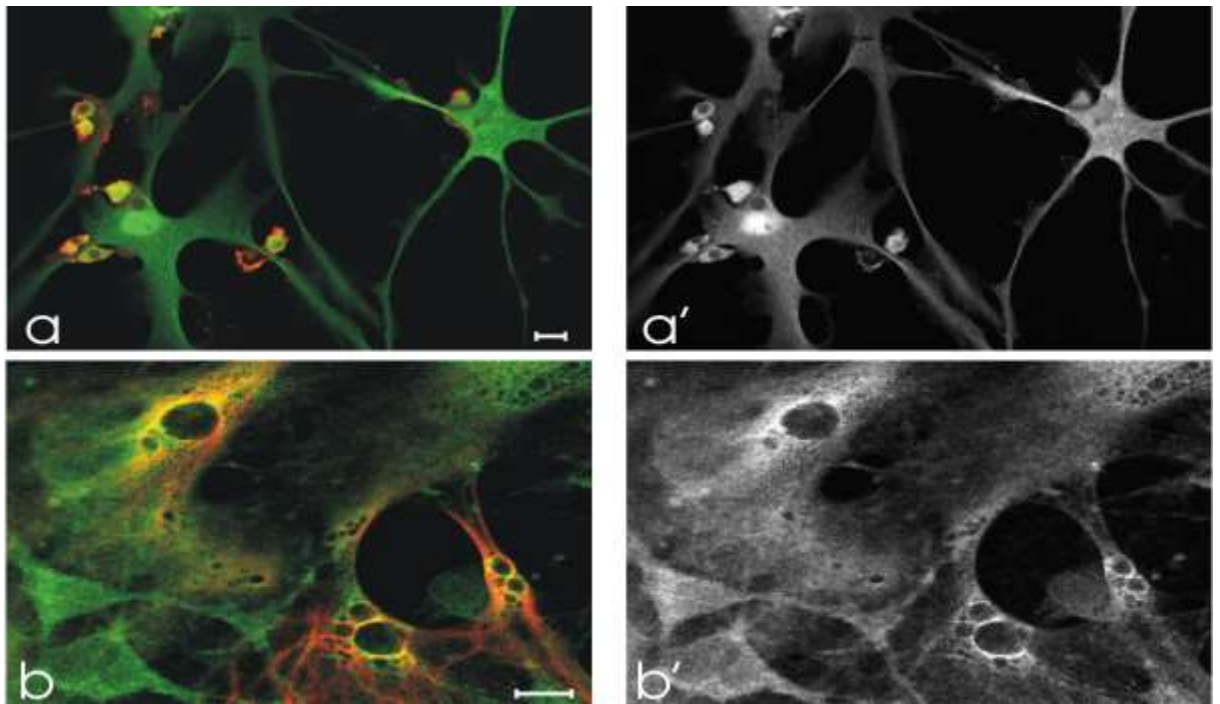


Abbildung 9: Immunhistochemische Lokalisation der Glutathionperoxidase (GPx) in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen (Balken a, b: 10 μ M). Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen (Ox42 in a und GFAP in b; jeweils rot), während die rechte Spalte den grünen Kanal (GPx) als Graustufenbild darstellt. Die GPx ist relativ ubiquitär im Cytoplasma und in einigen Zellen auch im Zellkern verteilt. Bei höherer Vergrößerung lassen sich fein-granuläre Strukturen erkennen (b). Die Intensität der Färbung unterliegt einer gewissen Streuung (a), zeigt aber keine zelltypspezifischen Unterschiede.

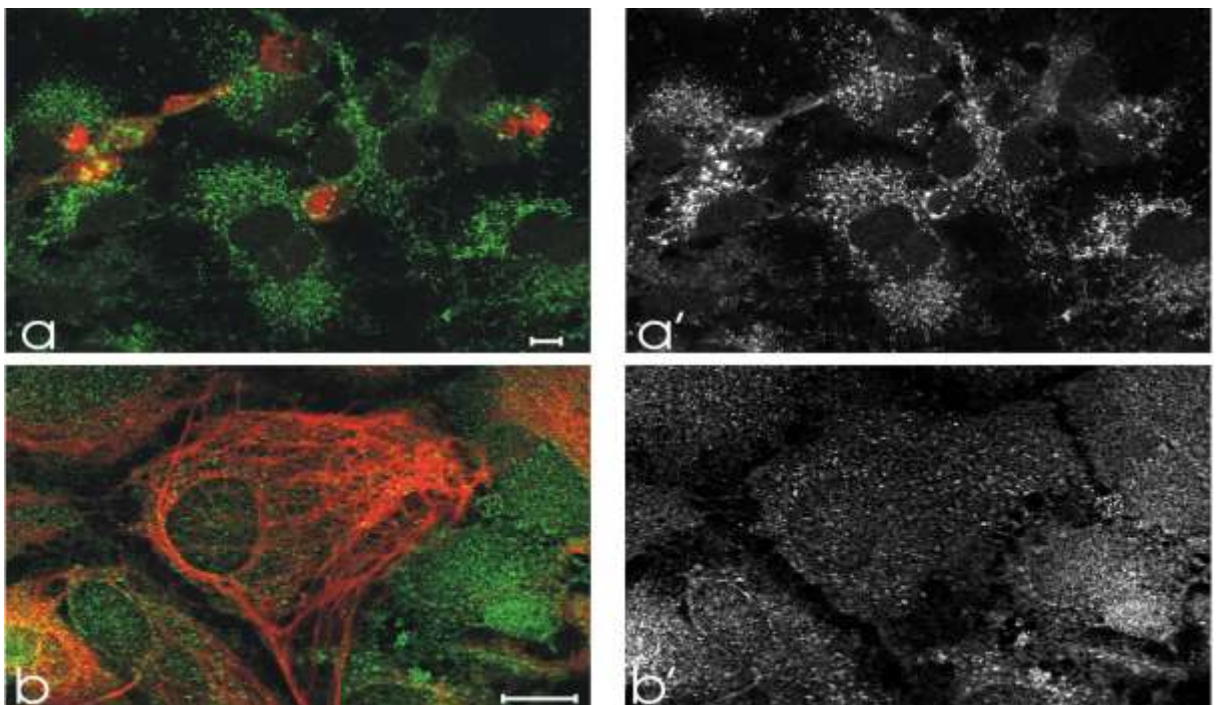


Abbildung 10: Immunhistochemische Lokalisation der Katalase in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen (Balken a, b: 10 μ M). Die linke Spalte zeigt die farbigen Doppelmarkierungen (Ox42 in a und GFAP in b; jeweils rot), während die rechte Spalte den grünen Kanal (Katalase) als Graustufenbild darstellt. Die Katalase ist in granulären Strukturen lokalisiert, offenkundig Peroxisomen (a, b). Die Intensität der Färbung unterliegt einer gewissen Streuung (a), zeigt aber keine zelltypspezifischen Unterschiede.

Durch immunohistochemische Kolo­kalisierung mit den zelltypspezifischen Markern (GFAP für Astrozyten sowie Ox42 für Mikrogliazellen) wurde die Verteilung der Superoxid abbauenden Enzyme Mn-SOD (Abb. 7) und Cu/Zn-SOD (Abb. 8), sowie der Wasserstoffperoxid abbauenden Enzyme Glutathionperoxidase (Abb. 9) und Katalase (Abb. 10) untersucht. Alle vier Enzyme kamen sowohl in Astrozyten als auch in Mikrogliazellen vor, und das mit nur geringen quantitativen Unterschieden. Die Mn-SOD war in beiden Zelltypen ausschließlich mitochondrial lokalisiert, die Cu/Zn-SOD und GPx vorwiegend cytosolisch und die Katalase in Peroxisomen.

Zusammenfassung

Das hier vorgestellte Zellkulturmodell eröffnet die Möglichkeit, die Effekte des Stickoxids zu untersuchen. Die Induktion der iNOS durch LPS/IFN und die damit verbundene Nitritbildung waren sehr gut reproduzierbar. Die Mikroglia, als ein Zelltyp dieses Kultursystems, exprimiert nach Zugabe von LPS/IFN die iNOS, während Astrogliazellen dieses Enzym nicht exprimieren. Für weitere Experimente wurden Kulturen nach 18 h Induktion verwendet, da diese ein sehr gutes Verhältnis zwischen Nitritbildung (als Maß der Stickoxidproduktion) und LDH-Werten (als Maß der Zellviabilität) zeigten. Die immunhistochemische Lokalisation der vier untersuchten Schutzenzyme (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, GPx und Katalase) zeigte, wenn überhaupt, nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Gliazelltypen.