

### 3.2 Oxidation von DCF-H im zellfreien System

Nach der Etablierung eines stabilen Zellkulturmodells war es ein Ziel, die Produktion des Stickoxids und/oder sekundärer Stickoxidprodukte mittels der bildgebenden Mikroskopie in lebenden Zellen direkt zu verfolgen. In der Literatur (Gunasekar, Kanthasamy et al. 1995) wird das Fluorochrom DCFH-DA als prinzipiell für das ‚Life-Imaging‘ von Stickoxid verwendbar beschrieben. Dieses Derivat des Fluoresceins kann in seiner acetylierten Form (DCFH-DA) die Zellmembran passieren und wird durch Deacetylierung (durch unspezifische Esterasen) in der Zelle ‚getrappt‘. Die Oxidation des DCF-H zu dem stabilen und fluoreszierenden DCF ermöglicht dann dessen Detektion.

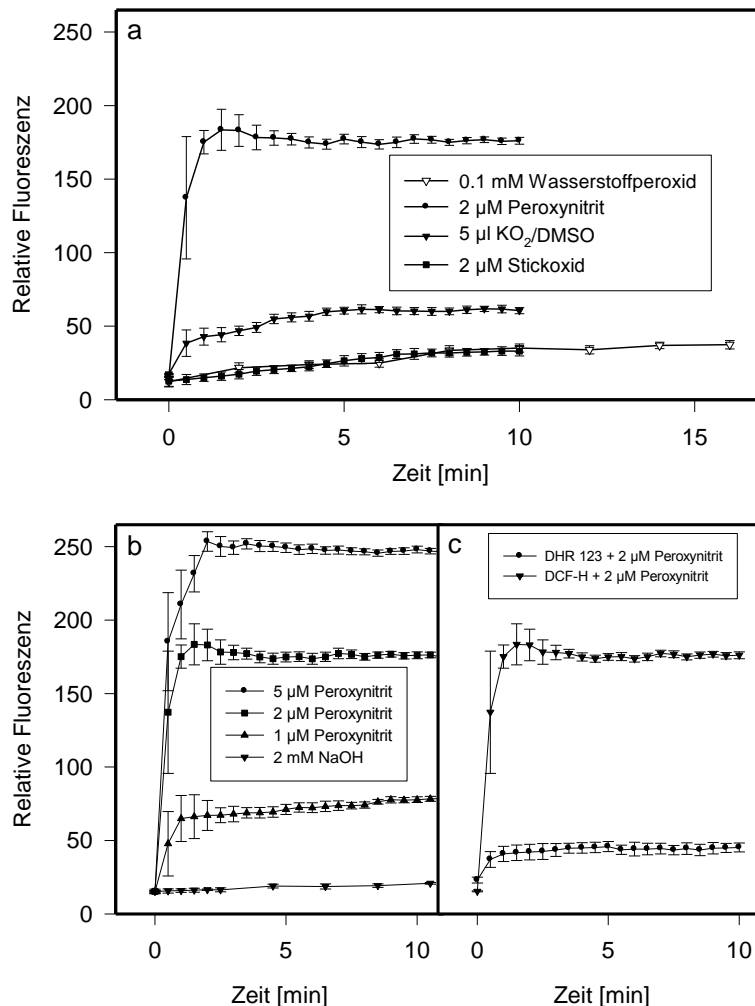


Abbildung 11: Oxidation von DCF-H im zellfreien System durch verschiedene Oxidantien. DCF-H zeigt eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber Peroxynitrit als gegenüber Stickoxid, Wasserstoffperoxid und Superoxid (a). Die Oxidation von DCF-H durch Peroxynitrit ist konzentrationsabhängig (b) und zeigt eine gegenüber dem Peroxynitrit-Indikator Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) etwa 4-fach höhere Fluoreszenzausbeute (c). Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Experimenten pro Gruppe.

Da allerdings DCFH-DA bereits seit den 80er Jahren als Marker für Wasserstoffperoxid verwendet wird (LeBel, Ischiropoulos et al. 1992), erfolgte zunächst eine eingehende Analyse der DCF-H oxidierenden Substanzen. Verschiedene Oxidantien wurden in einem zellfreien Ansatz auf ihre Wirksamkeit hin untersucht, das nicht-fluoreszierende DCF-H zu dem fluoreszierenden DCF zu oxidieren. Um hierbei möglichst nahe an die Bedingungen für das ‚Life-Imaging‘ heranzukommen, erfolgten diese Messungen am konfokalen Mikroskop mit den auch für das ‚Life-Imaging‘ verwendeten Einstellungen (Laseranregung: 488 nm, Emissionsfilter: LP 510 nm). Zunächst wurde mittels alkalischer Hydrolyse die Esterbindung des DCFH-DA gespalten und das resultierende DCF-H in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Dabei erwies sich das Peroxynitrit als effektivstes Oxidans, das konzentrationsabhängig DCF-H zu dem fluoreszierenden DCF oxidierte (Abb. 11a, b). Vergleichbare oder höhere Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, Stickoxid und Superoxid oxidierten DCF-H in einem wesentlich schwächeren Ausmaß (Abb. 11a). Ein Vergleich mit dem alternativ verwendbaren Peroxynitrit-Indikator Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) ergab, daß Peroxynitrit diese Verbindung mit einer ähnlichen Kinetik oxidiert, dieses aber mit einer gegenüber DCF etwa 4 fach geringeren Fluoreszenzausbeute (Abb. 11c).

Die Oxidation von DCF-H durch Peroxynitrit (2  $\mu\text{M}$ ) verlief sehr schnell und erreichte ein Plateau nach etwa 1 min (Abb. 11a). Hingegen oxidierten Stickoxid und Wasserstoffperoxid DCF-H relativ langsam über einen Zeitraum von mindestens 15 bzw. 30 min. Die durch Stickoxid (2  $\mu\text{M}$ ) vermittelte Oxidation von DCF-H erreichte nach 15 min etwa 10 % der Oxidationsrate einer equimolaren Peroxynitritmenge. Wasserstoffperoxid wurde in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt, da geringere Mengen bei der verwendeten Einstellungen kein meßbares Signal lieferten. Eben diese, gegenüber Stickoxid/Peroxynitrit 50 fach höhere Konzentration, lieferte ein Signal, das in etwa dem des Stickoxids entspricht und weit unterhalb des Peroxynitrits liegt.

Zur Oxidation von DCF-H durch Superoxid wurden 10  $\mu\text{l}$  einer gesättigten Kaliumsuperoxidlösung (in wasserfreiem DMSO) zu der wässrigen Pufferlösung hinzugegeben und damit ein ‚Superoxidburst‘ erzeugt. Unter diesen Bedingungen ist mit einer Konzentration von etwa 10  $\mu\text{M}$  Superoxid zu rechnen (Valentine & Curtis 1975; Haseloff, Zollner et al. 1997). Diese gegenüber Peroxynitrit 5 fach höhere Konzentration erzielte jedoch nur etwa 25 % der durch Peroxynitrit erreichten Signalstärke.

Die gefundene Oxidation von DCF-H zu DCF durch Peroxynitrit wurde mittels HPLC-Messungen bestätigt. Das durch Zugabe von Peroxynitrit bzw. Stickoxid zu einer 50  $\mu\text{M}$  DCF-H Lösung gebildete DCF konnte durch Absorption bei 488 nm detektiert werden. Auch bei diesem methodentechnischen Nachweis erwies sich Peroxynitrit als deutlich effektiveres Oxidans als Stickoxid (Daten gezeigt in (Possel, Noack et al. 1997)).

#### Zusammenfassung

DCF-H wird durch Peroxynitrit, und zwar schon in relativ geringen Konzentrationen, effektiv oxidiert und ist daher potentiell zu dessen Detektion geeignet. Einschränkend ist festzuhalten, daß DCF-H keineswegs als ein spezifischer Marker für Peroxynitrit gelten kann. Es ist daher geboten, entweder über eine kinetische Analyse der Oxidationsgeschwindigkeit (die sich für Peroxynitrit gegenüber Wasserstoffperoxid und Stickoxid dramatisch unterscheidet) und/oder durch gezielte Einflußnahme auf die Peroxynitrit konstituierenden Radikale den Nachweis zu spezifizieren.

### 3.3 Oxidation von DCF-H in Stickoxid produzierenden Mikrogliazellen

Die oben detailliert beschriebenen, mit DCFH-DA beladene Kulturen wurden am konfokalen Mikroskop untersucht und die Daten aufgrund morphologischer Kriterien, getrennt nach Astroglia und Mikrogliazellen, ausgewertet. Neben induzierten Zellkulturen (I) wurden als Kontrollen sowohl unbehandelte (K) als auch Zellkulturen verwendet, denen mit den Induktoren der NOS-Inhibitor NIL (N) zugesetzt wurde.

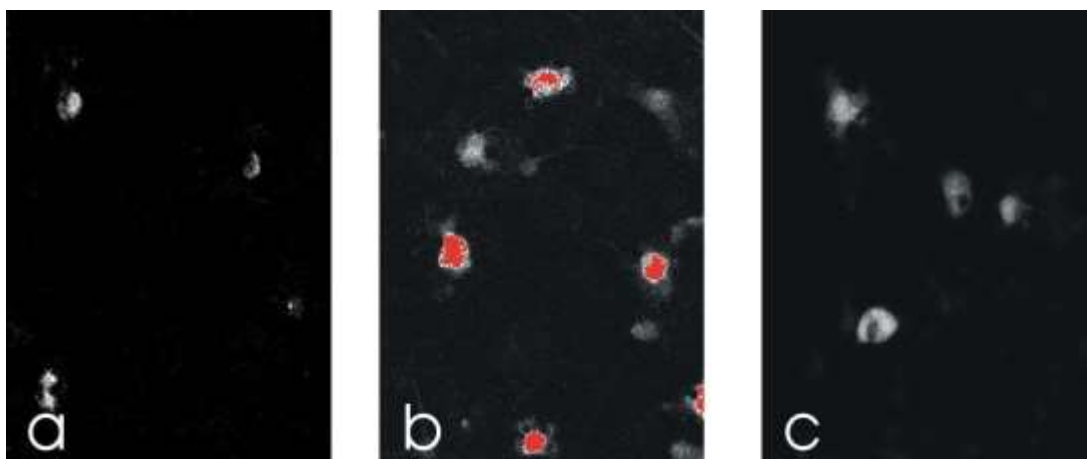


Abbildung 12: Visuelle Darstellung der DCF-H Fluoreszenz in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen unter verschiedenen Induktionszuständen (wobei der höchste Grauwert mit der Farbe Rot kodiert ist). In

Kontrollkulturen (a) zeigen nur wenige Mikrogliazellen ein detektierbares DCF-H Signal, während in iNOS exprimierenden Kulturen deren Anzahl dramatisch ansteigt (b). Durch Zugabe des NOS-Inhibitors NIL läßt sich die Anzahl und Signalstärke der DCF-H positiven Mikroglia wieder auf das Niveau der Kontrollkulturen senken (c). In allen Fällen jedoch weisen Astrocyten, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache DCF-Fluoreszenz auf, die auch durch Induktion der iNOS nicht erhöht wird.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch einen visuellen Vergleich von DCFH-DA beladenen Zellkulturen unterschiedlicher Induktionszustände. Generell zeigten die Astrozyten in diesem System bestenfalls Spuren einer DCF-Fluoreszenz, während die oberhalb des ‚Astrocyten-Rasen‘ aufsitzenden Mikrogliazellen in Abhängigkeit von der iNOS-vermittelten Stickoxidproduktion ein deutlich erhöhtes DCF-Signal aufwiesen. In Kontrollkulturen waren nur wenige Mikrogliazellen detektierbar, während in induzierten Kulturen deren Anzahl, verbunden mit einer erheblichen Steigerung des Fluoreszenzsignals, deutlich anstieg. Die Abhängigkeit dieses Effekts von der Stickoxidproduktion ließ sich durch Zugabe des NOS-Inhibitors eindrucksvoll belegen (Abb. 12).

Da die Peroxynitritbildung auch von der Superoxidkonzentration abhängt, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die Bildung von Peroxynitrit nach Zugabe des Phorbolesters PMA, einem Stimulans der Superoxid produzierenden NADPH-Oxidase, gemessen (Abb. 13).

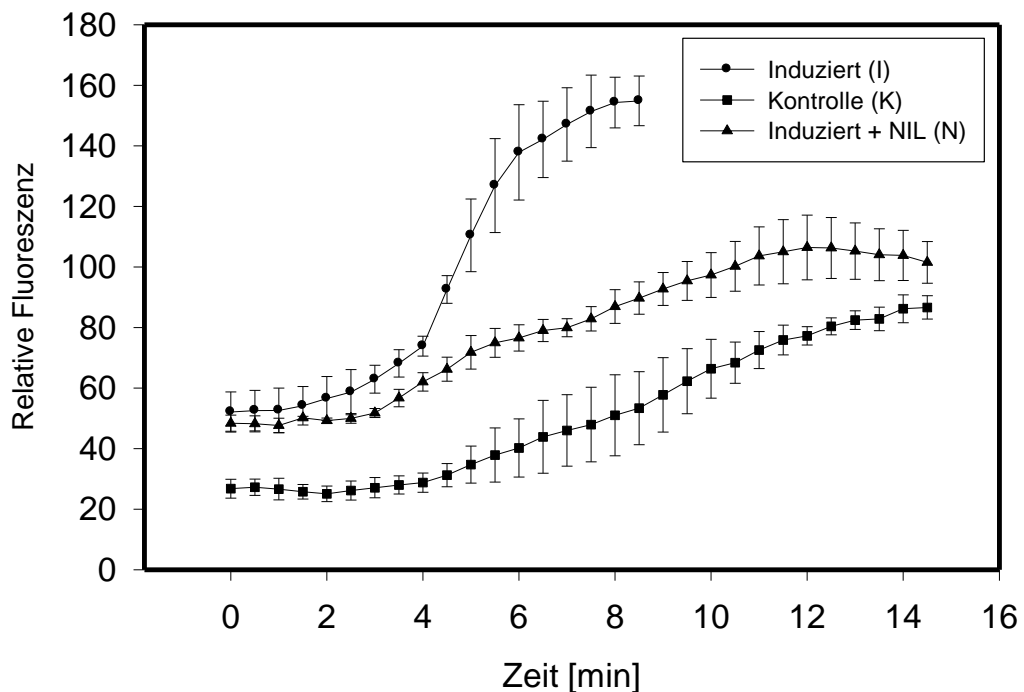


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der DCF-Fluoreszenz in mit DCFH-DA beladenen Mikrogliazellen. Nach 2 min der Ruhebeobachtung wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M des Phorbolesters PMA stimuliert. Deutlich zeigt sich, daß in induzierten Kulturen (I) der Anstieg des DCF-Signals wesentlich höher ausfällt als in Kontrollkulturen (K, N), die kein Stickoxid produzieren. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 30 Zellen pro Gruppe.

Bei Zeitserien wurden die Zellen zunächst einige Minuten unter ‚Ruhebedingungen‘ beobachtet, um dann durch Zugabe von PMA die Superoxidproduktion zu steigern. Die PMA-Stimulation bewirkte in iNOS-exprimierende Mikrogliazellen innerhalb von Minuten einen raschen Anstieg der DCF-Fluoreszenz, der in Kontrollkulturen (K und N) deutlich geringer ausfiel. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase führte auch in diesen Kulturen zu einer vermehrten Oxidation des DCF-H, offenbar wegen der fehlenden Stickoxidbildung, jedoch nicht Peroxynitrit-vermittelt, sondern direkt durch das Superoxid. Während die Oxidation des DCF-H in Stickoxid produzierenden Kulturen bereits 6 min nach PMA-Stimulation den nicht-linearen Bereich des Meßanordnung erreichte, stieg die Fluoreszenz in den Kontrollkulturen über einen Zeitraum von 12 min, bevor sie in einem Plateau endete, das bei etwa 60 % der Stickoxid produzierenden Mikroglia lag.

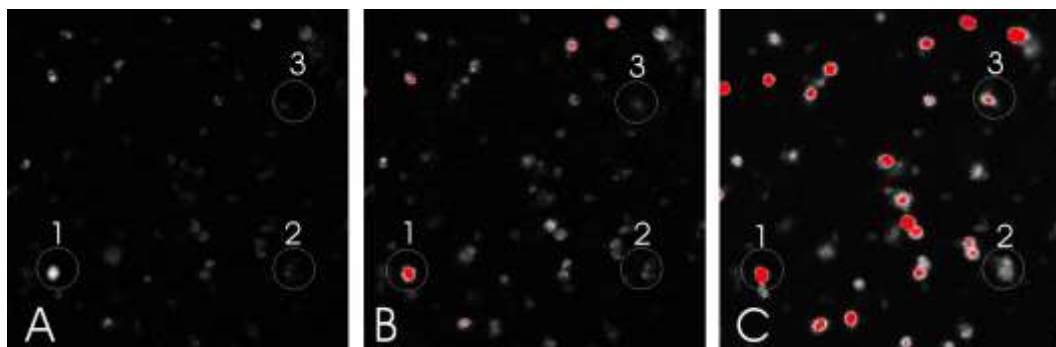
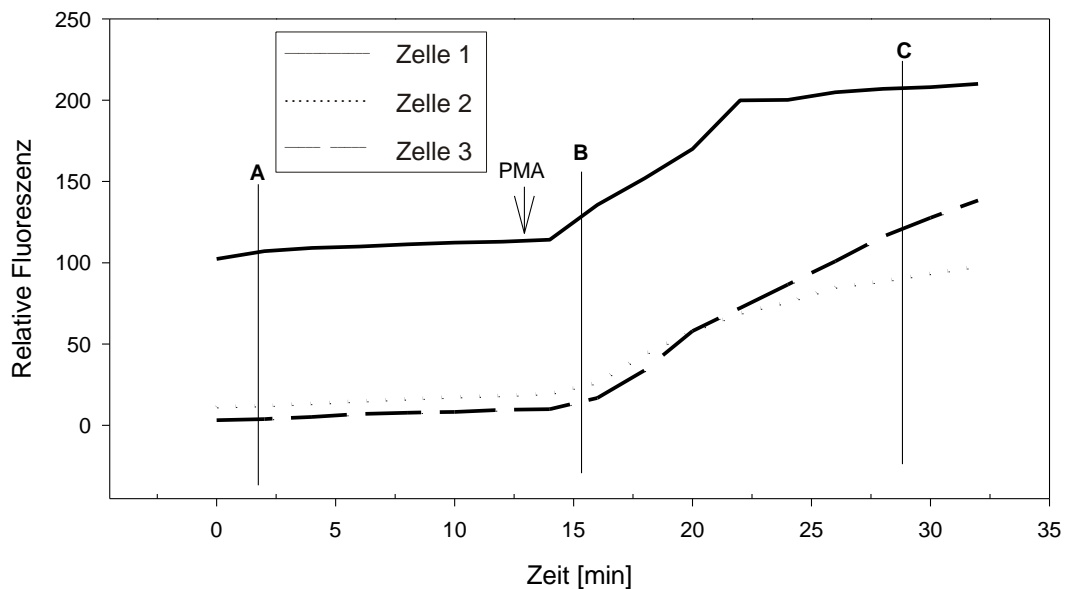


Abbildung 14: Einzelzellanalyse von DCFH-DA beladenen, mit LPS/IFN induzierten Mikrogliazellen vor und nach Stimulation mit dem Phorbolster PMA (1  $\mu$ M). Die Abbildungen (A, B, C) entsprechen den jeweiligen Zeitpunkten im Graphen, wobei der höchste Grauwert mit der Farbe Rot kodiert ist. In den Bildausschnitten sind die Zellen umkreist und durch Nummern gekennzeichnet, deren digitalisierte Grauwerte im Graphen dargestellt sind. Trotz einer gewissen Heterogenität in den Ausgangswerten ist zunächst ein nur sehr geringer Anstieg der DCF-Fluoreszenz über 15 min erkennbar, der allerdings nach PMA-Stimulation deutlich ansteigt. Ebenso ist zu sehen, daß ein Teil der Zellen vor der Stimulation mit PMA dicht am unteren Detektionslimit liegt (in Abbildung A so gut wie nicht sichtbar) und erst nach Stimulation mit PMA in Abbildung C zu erkennen ist.

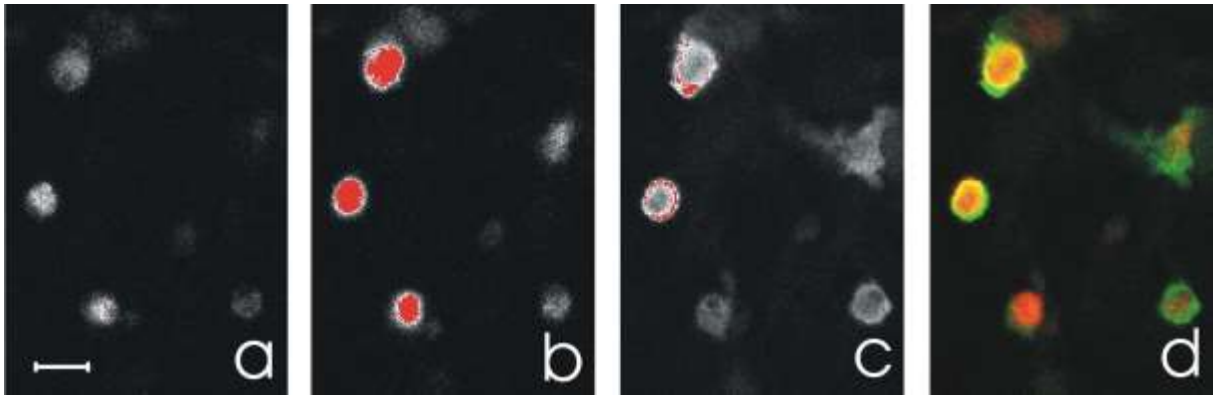


Abbildung 15: Vergleich der iNOS-Immunoreaktivität in Mikrogliazellen mit deren DCF-Signalstärke (Balken 10  $\mu\text{M}$ ). Die Zellen wurden nach dem Scannen des DCF-Bildes (vor (a) und nach (b) PMA-Stimulation) noch auf dem Mikroskopisch fixiert und der Prozedur zur immunhistochemischen Visualisierung der iNOS unterzogen (c). Die Überlagerung und Farbkodierung der Bilder b und c läßt die positive Korrelation von DCF-Signal und iNOS-Expression deutlich hervortreten (d).

In Abbildung 14 ist ein typischer Verlauf der Peroxynitritbildung vor und nach der Stimulation der Superoxidproduktion durch PMA dargestellt. Die Analyse auf Einzelzellebene ergab eine gewisse Heterogenität sowohl in den Ausgangswerten als auch im Zeitverlauf und in der Intensität des DCF-Signals vor und nach der Zugabe von PMA. Die durch DCF im Fluoreszenzbild sichtbaren Mikrogliazellen hatten fast ausschließlich die für sogenannte aktivierte Mikrogliazellen typische, amöboide Morphologie. Zunächst war nur ein schwacher Anstieg der DCF-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 min zu sehen, der dann allerdings nach Zugabe von PMA in allen drei exemplarisch analysierten Zellen deutlich steiler ausfiel. Bezogen auf das Anfangssignal war dieser Anstieg in den drei Zellen ziemlich uniform. Ausgehend von einem relativ hohem Anfangssignal erreicht Zelle 1 bereits nach 6 min den nicht-linearen Bereich der Meßanordnung. Das Signal der Zellen 2 und 3 lag zu Beginn des Experiments im unteren Sensitivitätsbereich Bereich des Detektors, wobei die Fluoreszenz der Zelle 3 bereits 7 min nach PMA-Stimulation in eine, hier nicht meßtechnisch bedingte, Plateauphase überging, während das Signal der Zelle 2 über 15 min kontinuierlich anstieg. Besonders hervorzuheben ist, daß die Zellen 2 und 3 vor der PMA-vermittelten Superoxidproduktion praktisch nicht sichtbar waren, während sie kurz darauf klar im Bildausschnitt hervortraten.

Zur weiteren Verifizierung der Peroxynitrit korrelierten Oxidation von DCF-H wurden mit DCFH-DA beladene Zellkulturen zunächst mit PMA stimuliert und dann dem immunhistochemischen iNOS-Nachweis unterzogen. Da das DCF-Signal einer immunhistochemischen Prozedur nicht standhält, erfolgte nach digitaler Erfassung des DCF-Bildes die Fixierung und Färbung der Zellen noch auf dem Mikroskopisch. Diese Vorgehensweise ermöglicht Aussagen über individuelle Zellen in Bezug auf den iNOS-Proteingehalt und die DCF-Signalstärke. Die Überlagerung der Bilder ergab, daß rundliche, stark iNOS-positive Mikrogliazellen zugleich ein starkes DCF-Signal zeigten, während ramifizierte, relativ wenig iNOS exprimierende Mikrogliazellen ein schwächeres DCF-Signal aufwiesen (Abb. 15).

#### Zusammenfassung

DCFH-DA ist geeignet, die Peroxynitritbildung in lebenden Zellkulturen zu beobachten. Exemplarisch konnte dies am Beispiel der iNOS exprimierenden Mikrogliazellen gezeigt werden, die ein wesentlich höheres DCF-Signal zeigen als Kontrollkulturen. Dieses Signal läßt sich durch Stimulation der Superoxidproduktion innerhalb weniger Minuten noch einmal

erheblich steigern und ist durch iNOS-Inhibitoren unterdrückbar. Die gefundene Beziehung zwischen dem DCF-Signal und dem Grad der iNOS-Expression in Mikrogliazellen belegen die Korrelation zwischen DCF-Fluoreszenz und Peroxynitritbildung.

### 3.4 Modulation der Peroxynitritbildung

Ziel der Untersuchung war es, durch pharmakologische Modulation der diversen Schutzsysteme und/oder durch Zugabe von enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien, die Peroxynitritbildung zu beeinflussen. Durch Zugabe des GSH-Synthese-Hemmers L-Buthionin-(S,R)-Sulfoximin (BSO; 60  $\mu$ M) für 24 h ließ sich die GSH-Konzentration in den Zellen auf etwa 13 % des Kontrollwertes absenken (Abb. 16). Die Messung der Peroxynitritbildung erfolgte in mit BSO behandelten Kulturen mittels DCFH-DA unter den verschiedenen Induktionszuständen (K, I, N). Die Daten wurden, nach morphologischen Kriterien aufgeschlüsselt, für Mikro- und Astrogliazellen getrennt ausgewertet (Abb. 17). Ein deutlicher Anstieg der DCF-Fluoreszenz wurde in allen mit BSO behandelten Kulturen beobachtet, und zwar sowohl in Mikrogliazellen als auch in Astrocyten. In induzierten und zugleich mit BSO behandelten Mikrogliazellen war das DCF-Signal, verglichen mit nur induzierten Kulturen (ohne BSO), um den Faktor 2, in Astrozyten um den Faktor 3 erhöht. Sowohl in iNOS-freien Kontrollen, wie auch in induzierten, aber mit NIL behandelten Kulturen zeigte sich eine, wenn auch vergleichsweise erheblich geringere, Steigerung des DCF-Signals.

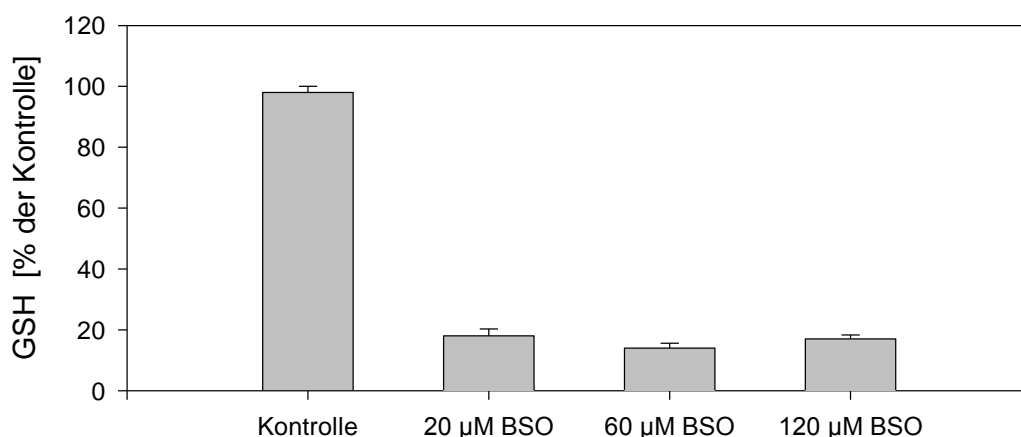


Abbildung 16: GSH-Konzentrationen in primären Mikro-/Astroglia-Mischkulturen, die mit verschiedenen Konzentrationen des GSH-Synthese-Hemmstoffs BSO behandelten waren. Die Kulturen wurden für 24 h mit BSO inkubiert und anschließend die GSH-Konzentrationen spektrophotometrisch bestimmt. Mittelwerte + SEM aus 6 Experimenten pro Gruppe.



Durch den Einsatz des SOD-Inhibitors Diethyldithiocarbamat (DTC) wurde untersucht, ob die Hemmung der SOD und die damit erhöhte Superoxidproduktion einen ähnlich drastischen Effekt auf das DCF-Signal hat. Es zeigte sich, daß Diethyldithiocarbamat bei Konzentrationen von bis zu 1 mM keinen Effekt auf das DCF-Signal hat (Abb. 18a). Ebenso erwies sich der Eisenchelator Desferoxamin im Hinblick auf eine Veränderung des DCF-Fluoreszenzsignals als wirkungslos.

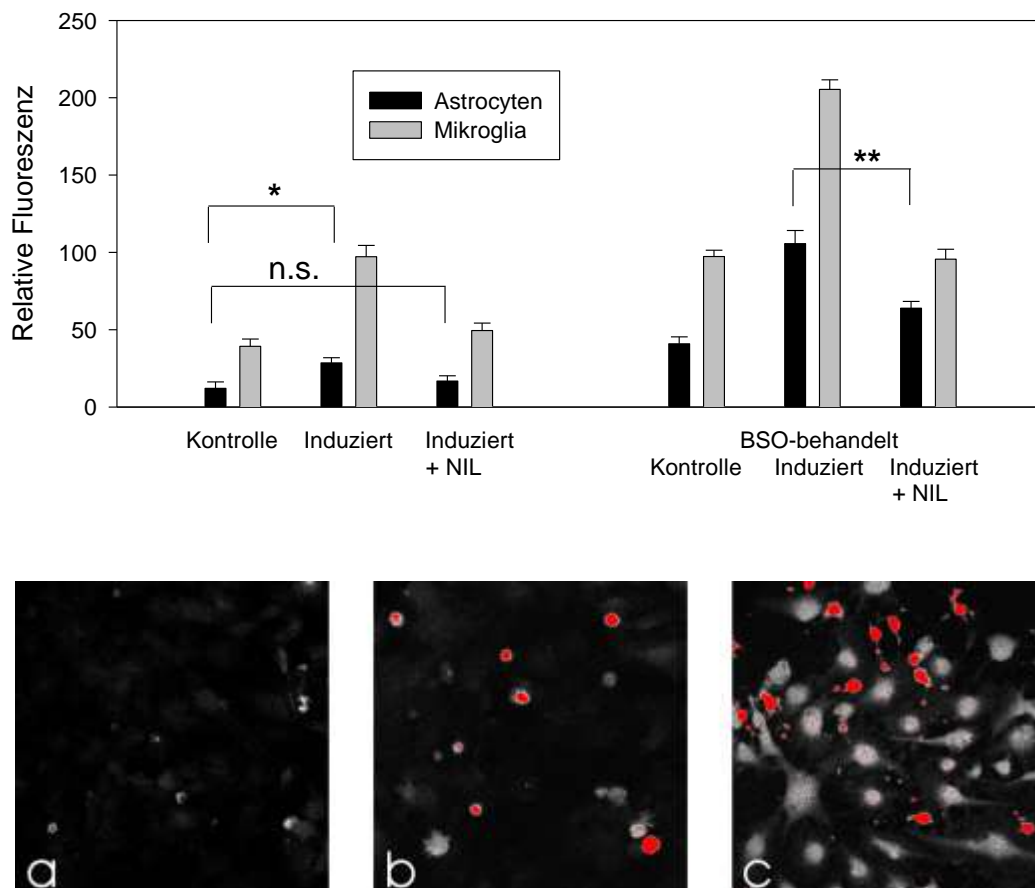


Abbildung 17: Effekte der iNOS-Induktion in Kombination mit der Depletion von GSH auf die DCF-Fluoreszenz in Mikro-/Astroglia-Mischkulturen. Die Kulturen wurden simultan für 18 h mit LPS/IFN sowie für 24 h mit BSO behandelt, anschließend mit DCFH-DA inkubiert und dann am konfokalen Laserscannmikroskop analysiert. Der Graph zeigt die numerische Grauwertanalyse, getrennt für Mikroglia und Astrocyten. Exemplarisch ist je ein Ausschnitt aus (a) Kontrollkulturen, (b) induzierten Kulturen sowie (c) induzierten und BSO-behandelten Kulturen dargestellt, wobei der höchste Grauwert mit der Farbe Rot kodiert ist. In induzierten und BSO-behandelten Kulturen zeigten erstmals Astrocyten ein deutliches DCF-Signal (c), während in den übrigen Induktionszuständen fast ausschließlich Mikrogliazellen detektiert wurden. Mikrogliazellen weisen bei zusätzlicher BSO-Behandlung eine Erhöhung der DCF-Fluoreszenz um den Faktor 2 auf gegenüber Zellen, die lediglich mit LPS/IFN stimuliert wurden, und gegenüber Astrocyten um den Faktor 2,5. Mittelwerte + SEM aus 30 Zellen pro Gruppe (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0001$ , n.s. = nicht signifikant).

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, mittels verschiedener enzymatischer und nicht-enzymatischer Antioxidantien, die durch GSH-Depletion erhöhten Peroxynitrit-Konzentrationen abzusenkten. Entgegen der Erwartung zeigten sich Ascorbat und SOD-PEG als wirkungslos, während das Glutathionperoxidase-Analogon und zugleich als Peroxynitritfänger bekannte Ebselen eine deutliche Verminderung des DCF-Signals bewirkte (Abb. 18b).

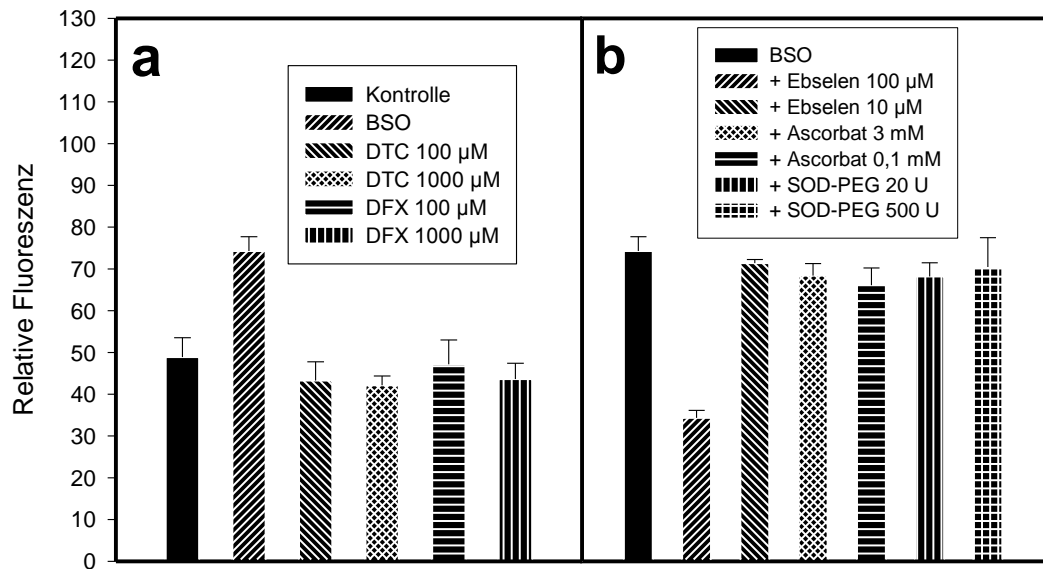


Abbildung 18: Modulation der oxidativen Belastung in iNOS-exprimierenden Mikrogliazellen. Die Zellkulturen wurden für 1 h mit DCFH-DA und der jeweiligen Testsubstanz beladen und dann am konfokalen Lasersanmikroskop analysiert. Für Diethyldithiocarbamat (DTC) und SOD-PEG wurde das Experiment mit einer Vorinkubation von 8 h wiederholt, ohne das sich eine wesentliche Veränderung ergab (Daten nicht gezeigt).

- a) Die Hemmung der SOD durch Diethyldithiocarbamat sowie die Zugabe des Eisenchelators Desferoxamin (DFX) bewirkten im Gegensatz zu der GSH-Depletion durch BSO keine Veränderung im DCF-Signal.
- b) In mit BSO (24 h) behandelten Kulturen ergab die zusätzliche Inkubation mit Ascorbat als auch mit SOD-PEG keine Auswirkungen auf die DCF-Fluoreszenz. Allerdings erwies sich Ebselen, zumindest in höheren Konzentration, als sehr effektiv und reduzierte die DCF-Fluoreszenz auf einen Wert, der den von Kontrollkulturen entspricht. Mittelwerte + SEM aus 30 Zellen pro Gruppe.

Um auszuschließen, daß die Wirkung von Ebselen auf einer direkten Reduktion von DCF zu DCF-H beruht, wurde in einem Ansatz mit Zellhomogenat die Wirkung von Ebselen sowie von weiteren Reduktionsmitteln überprüft. Fluorometrische Untersuchungen ergaben, daß weder Ebselen noch Ascorbat in der Lage sind, oxidiertes DCF zu reduzieren. Die Zugabe der Kofaktoren NADPH, NADH sowie von Zellhomogenat (als Quelle für weitere potentielle Kofaktoren und/oder Enzyme, Daten nicht gezeigt) änderten das Ergebnis nicht. Einzig das starke Reduktans Natriumdithionit (3 mM) reduzierte DCF zu DCF-H, und das unter den angegebenen Bedingungen vollständig.

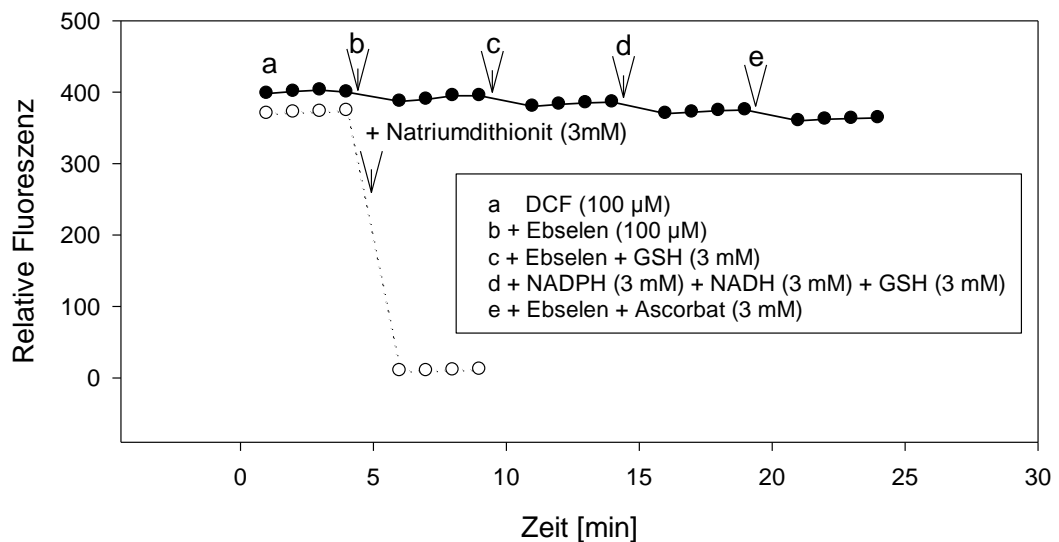


Abbildung 19: Die Emission von DCF (als Maß des Oxidationsgrades) wurde fluorometrisch vor und nach Zugabe verschiedener Antioxidantien gemessen. Die getesteten Antioxidantien waren bis auf Natriumdithionit nicht in der Lage, DCF zu reduzieren.

### Zusammenfassung

Die DCF-Fluoreszenz ließ sich durch Depletion des GSH in Mikro-/Astrogliaulturen um mehr als den Faktor 2 steigern. Auffällig war dabei, dass hier erstmals auch Astrocyten ein detektierbares DCF-Signal zeigten. Überraschend war, dass sowohl Ascorbat als auch die zellpermeable SOD-PEG nicht in der Lage waren, das DCF-Signal signifikant zu beeinflussen. Allerdings bewirkte die Zugabe des Peroxynitritfängers Ebselen einen drastischen Abfall des DCF-Signals. Die Messung der DCF-Fluoreszenz in zellfreien Versuchen ergaben, dass diese Verringerung nicht auf einer direkten Reduzierung des DCF zu DCF-H durch Ebselen beruht. Von den weiteren getesteten Substanzen war einzig Natriumdithionit in der Lage, DCF in das nicht-fluoreszierende DCF-H zu überführen.