

## 4.1 Expressionsmuster der iNOS

### Zell Kultur

Das hier vorgestellte primäre Zellkulturmodell aus Astro- und Mikrogliazellen exprimierte die iNOS nach Zugabe von LPS/IFN so gut wie ausschließlich in Mikrogliazellen. Dieser Befund steht im Widerspruch zur Literatur (Galea, Feinstein et al. 1992; Hu, Martella et al. 1994; Murphy, Grzybicki et al. 1995; Colton, Wilt et al. 1996), in der seit Jahren die Expression der iNOS auch in Astrocyten beschrieben wird. Allerdings ist hierzu kritisch anzumerken, daß etliche Autoren auf eine differenzierte Lokalisation der iNOS verzichten und sich ausschließlich auf die erhöhten Nitritwerte als Beleg der iNOS-Aktivität berufen haben.

Ein wichtiges Detail ist die Verwendung von sogenannten reinen (oder angereicherten) Astrogliakulturen (Galea, Reis et al. 1994). Deren Präparation ist technisch aufwendig, indem die Mikrogliazellen sorgfältig zu eliminieren sind. Rest-Vorkommen von Mikrogliazellen sind in unterschiedlichem Ausmaß zu erwarten und führen zwangsläufig zu Fehlinterpretationen. Mikrogliazellen als auch Astrocyten produzieren in Kultur eine Vielzahl von regulatorischen Cytokinen (Shafer & Murphy 1997; Vincent, Tilders et al. 1997; Yang, Tanaka et al. 1998), die die iNOS-Expression in Astrocyten möglicherweise verhindern. Die endogene Produktion von Cytokinen, insbesondere von Mikrogliazellen ist in Zellkultur erhöht, da üblicherweise angenommen wird, daß die im adulten Hirn ‚ruhenden‘ Astrocyten und Mikrogliazellen durch die Präparation einen Stimulus erhalten, der sie in den ‚aktivierten‘ Zustand versetzt (Gebicke-Haerter, Van Calker et al. 1996). Das genaue Ausmaß der Aktivierung ist schwierig oder gar unmöglich zu bestimmen, mag aber gewissen Schwankungen in den einzelnen Laboren unterliegen.

In etwa 3 Prozent der Kulturschalen waren einige wenige iNOS-positive Zellen zu erkennen, die weder für den Mikroglia marker Ox42 noch für den Astrocyten marker GFAP positiv waren. Es handelt sich hierbei vermutlich um unreife Vorläuferzellen, die die benannten zelltypspezifischen Proteine noch nicht exprimieren. Die zelltypspezifische Verteilung der iNOS nach Induktion blieb im Rahmen dieser Arbeit bei allen 150 untersuchten Kulturen und über einen Zeitraum von 2,5 Jahren konstant. In Bezug auf die hier untersuchten Fragestellungen zu den Effekten von Stickoxid bzw. Peroxynitrit war das vorgestellte Zellkulturmodell bestens geeignet. Von Vorteil war dabei, daß sich die iNOS-freien Astrocyten bei den mikroskopischen Untersuchungen zur iNOS-abhängigen Peroxynitritproduktion als Referenz innerhalb der Zellkultur verwenden ließen.

## **In-vivo**

Unter In-vivo-Bedingungen war die zelltypspezifische Verteilung der iNOS dem zuvor in Zellkultur gefundenen analog. Nach Injektion von LPS/IFN in das Striatum der Ratte wurde auch hier die iNOS nur in Ox42-positiven Zellen detektiert. Im Gegensatz zur Zellkultur sind im Gehirn zwei Formen von Mikrogliazellen vorzufinden. Die ramifizierte (oder auch ruhende) Mikroglia reagiert auf Hirntraumata durch charakteristische Veränderung, indem sie sich zu der amöboiden (oder auch aktivierten) Mikroglia entwickelt, die morphologisch, biochemisch und funktionell den Makrophagen ähnelt. Sowohl Mikroglia als auch Makrophagen exprimieren dieselben zelltypspezifischen Antigene, so daß es bis heute nicht sicher möglich ist, nach einer Läsion, bei der eben auch ‚blut-stämmige‘ Immunzellen einwandern, die beiden Zellpopulationen im Hirngewebe immunhistochemisch zu differenzieren. Es ist anzunehmen, daß ein gewisser Anteil der iNOS-positiven Zellpopulation Makrophagen sind. Obwohl die iNOS in ramifizierten Mikrogliazellen zwar nur selten - und im Vergleich zu amöboiden Zellen schwächer - auftrat, so spricht gerade dieser Befund für eine vorwiegende Expression der iNOS in Mikrogliazellen, da die ramifizierte Morphologie ausschließlich genuinen Mikrogliazellen zukommt (Streit, Graeber et al. 1988). Die Tatsache, daß nur ein Teil der amöboiden, Ox42-positiven Zellen gleichzeitig die iNOS exprimierte, ist potentiell von funktioneller Bedeutung, war allerdings für die vorliegende Untersuchung eher zweitrangig. Für eine Bewertung wären zudem zeitabhängige und statistische Untersuchungen zur iNOS-Expression nötig. Wenn auch die Befunde in der Zellkultur im Widerspruch zur bisher veröffentlichten Literatur stehen, so wurden die In-vivo-Befunde der exklusiven Expression der iNOS in Mikrogliazellen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Kitamura, Takahashi et al. 1996).

Zu bedenken ist allerdings, daß es gerade bei dem massiven iNOS-Signal in Mikrogliazellen eine vergleichsweise sehr schwache iNOS-Expression in Astrocyten durch die Immunhistochemie möglicherweise nicht genügend deutlich wird. Außerdem sind Negativ-Befunde dieser Methode generell nur unter Vorbehalt als absolut einzustufen, da korrekterweise nur Nicht-Detektierbarkeit festgestellt werden kann. Auch wenn die Astrocyten geringe Spuren des iNOS-Proteins exprimieren sollten, so läßt sich dieser Anteil auf weniger als ein Prozent abschätzen (siehe z. B. Abb. 3). In der vorliegenden Arbeit wird diesen Überlegungen zufolge davon ausgegangen, daß die Mikrogliazellen die praktisch ausschließliche Quelle des Stickoxids darstellen.

## 4.2 Zellviabilität und enzymatische Schutzenzyme

Interessanterweise bewirkte die mit der Induktion verbundene erhöhte Stickoxidproduktion über einen Zeitraum von 60 h keine Zellschädigung. Als Maß galt hierbei der Austritt der Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Zellen, ein relativ grobes Verfahren, da die Zellen schon so weit geschädigt sein müssen, daß ihre Membranen für die LDH permeabel sind. Berichte aus der Literatur belegen, daß Stickoxid die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette bereits 18 h nach Induktion zu 30 – 50 % inhibiert (Bolanos, Peuchen et al. 1994). Dies beruht auf einer Kompetition mit Sauerstoff um die reversible Bindung des Stickoxids an die mitochondriale Cytochromoxidase (Brown & Cooper 1994; Richter, Gogvadze et al. 1994). Die durch Störung des zellulären Energiestoffwechsels mögliche Schädigung konnten auch andere Autoren, zumindest bis 48 h nach iNOS-Induktion, nicht beobachten (Hu, Martella et al. 1994). Als Ursache dafür sind entweder die unvollständige Hemmung der Mitochondrien oder kompensatorische Mechanismen, wie eine erhöhte Glykolyse, die das ATP-Defizit ausgleicht, anzunehmen.

In Bezug auf die enzymatischen Schutzsysteme ist insbesondere die SOD in der Lage, durch Kompetition mit dem Stickoxid um das Superoxid die Entstehung des toxischen Peroxynitrits zu begrenzen. Durch Westernblot-Analyse ließ sich zeigen, daß die mitochondriale Mn-SOD drastisch hochreguliert wurde. Daß die cytosolische Cu/Zn-SOD nicht in dieser Weise reguliert wird, ist von anderen Arbeitsgruppen bestätigt worden (Mokuno, Ohtani et al. 1994) und kann spekulativ als Indiz für die Rolle der Mitochondrien als entscheidende Superoxidquelle oder als eben besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress gesehen werden. Die Bedeutung der Mitochondrien beim Zelluntergang - nicht nur als empfindliche Energiequelle der Zelle, sondern möglicherweise als entscheidender ‚Trigger‘ in der Apoptose und Nekrose - wird derzeit von etlichen Arbeitsgruppen untersucht (Ankarcrona, Dypbukt et al. 1995; Skulachev 1996; Brüne, von Knethen et al. 1998).

Die verwendeten Antikörper zum Nachweis der antioxidativen Schutzenzyme stammen aus dem Labor von Dr. Asayama (bis auf den kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die Katalase) und sind hinreichend auf ihre Spezifität bzw. Kreuzreaktivität überprüft worden (Asayama & Burr 1985; Asayama, Yokota et al. 1994; Noack, Lindenau et al. 1998). Festzustellen war, daß die Cu/Zn-SOD, Glutathionperoxidase (GPx), wie auch die Katalase in ihrer Expression weder durch die Zugabe von LPS/IFN noch durch die erhöhte Stickoxidproduktion beeinflusst wurden. Die immunhistochemische Analyse ergab für die

Mn-SOD, wie auch für die drei anderen Schutzenzyme, wenn überhaupt, nur geringfügige Unterschiede zwischen Astrocyten und Mikrogliazellen. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Hochregulation der Mn-SOD für beide Zelltypen zutrifft. Zwar erscheinen gelegentlich einige Mikrogliazellen intensiver gefärbt als Astrocyten, jedoch liegt die Intensität der Färbung häufig auf einem ähnlichen Niveau. Außerdem war jeweils innerhalb der beiden Zellpopulationen eine Streuung in der Intensität der Färbung zu beobachten. Die in der Immunhistochemie gefundene Varianz zwischen individuellen Zellen mag auf einem unterschiedlichen Differenzierungsgrad oder auf verschiedenen Phasen im Zellcyclus beruhen (Shull, Heintz et al. 1991).

Die Hochregulation der Mn-SOD in den Mitochondrien ist nicht auf die Stickoxidproduktion zurückzuführen, da sie auch dann auftrat, wenn die Aktivität der iNOS zugleich mit der Induktion inhibiert wurde. In der Astroglia-Zelllinie C6 erwies sich hingegen die alleinige Zugabe eines Stickoxid donors als hinreichend, um eine Hochregulation der Mn-SOD zu bewirken (Dobashi, Pahan et al. 1997). Wie in Epithelzellen durch Actinomycin nachgewiesen werden konnte, beruht die Hochregulation der Mn-SOD nach Zugabe von LPS auf einer vermehrten mRNA-Synthese (Visner, Dougall et al. 1990). Aus der Literatur lassen sich Hinweise entnehmen, daß die verstärkte Aktivität der Mn-SOD beim sogenannten ‚Preconditioning‘ auftritt (Zhou, Zhai et al. 1996). Unter ‚Preconditioning‘ versteht man den Effekt, daß eine milde Schädigung die betreffenden Zellen gegenüber einer zu einem späteren Zeitpunkt erfolgenden, massiven Schädigung resistenter macht. Die toxische Induktion der iNOS in einer Zelllinie von beta-Zellen des Pankreas kann sowohl durch die stabile Überexpression der Mn-SOD als auch die Inhibition der NOS verhindert werden (Hohmeier, Thigpen et al. 1998). Für die Rolle der Mn-SOD als induzierbarer Schutzmechanismus bei erhöhtem oxidativen Stress (Shull, Heintz et al. 1991) spricht auch die Abhängigkeit der Induktion vom redoxsensitiven Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Mattson, Goodman et al. 1997), dessen Aktivierung durch Antioxidantien verhindert wird (Post, Holsboer et al. 1998). Es zeigte sich, daß durch eine Blockade der Aktivierung von NF- $\kappa$ B nicht nur die Hochregulation der Mn-SOD nach Induktion ausblieb, sondern auch die Peroxynitritkonzentration in den Zellen anstieg (Mattson, Goodman et al. 1997).