

## Reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies

Die Überproduktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies wird bei ganz unterschiedlichen Erkrankungen des ZNS als ein entscheidender Faktor in der Ereigniskaskade, die letztlich zum Zelltod führt, angesehen. Die im Verlauf der Schädigung in Gliazellen induzierbare NOS, und insbesondere das Peroxynitrit als Reaktionsprodukt aus Stickoxid und Superoxid, finden dabei zunehmendes Interesse. Die In-vivo-Effekte einer erhöhten Stickoxid-/Peroxynitritproduktion lassen sich in Mikro-/Astrogliaulturen simulieren, indem durch Zugabe von Interferon-gamma und Lipopolysaccharid die Expression der iNOS provoziert wird. Zunächst konnte im zellfreien System erstmalig gezeigt werden, daß Peroxynitrit, und zwar in relativ geringen Konzentrationen, das Fluorogen DCF-H zum fluoreszierenden DCF oxidiert. Die mittels der konfokalen Laserscanmikroskopie als bildgebendes Detektionssystem gewonnenen Befunde belegten die Eignung des DCF-H als Indikator für Peroxynitrit in lebenden Zellen. Wenn auch DCF-H in Bezug auf die Oxidantien als nicht spezifisch gelten kann, so ließ sich doch zeigen, daß die wechselseitige Manipulation der Konzentration von Stickoxid und Superoxid Effekte in der DCF-Fluoreszenz ergaben, die allen Eigenschaften eines Peroxynitritmarkers entsprechen.

Obwohl gezeigt werden konnte, daß die mit Interferon-gamma und Lipopolysaccharid induzierten Kulturen erhöhte Mengen an Peroxynitrit und Stickoxid bildeten, war die Zellviabilität über einen Zeitraum von einigen Tagen nicht beeinflusst. Eine immunohistochemische Untersuchung zur Verteilung der antioxidativen Schutzenzyme Mn-SOD und Cu/Zn-SOD als Superoxid-,Scavenger‘, als auch der Wasserstoffperoxid abbauenden Enzyme Glutathionperoxidase und Katalase ergab, daß alle genannten Enzyme sowohl in Mikrogliazellen als auch in Astrocyten vorkommen. Für die Mn-SOD konnte zudem mittels Westernblot eine durch die Induktion mit Interferon-gamma und Lipopolysaccharid verstärkte Expression nachgewiesen werden. Gerade die mitochondriale Lokalisation dieses hochregulierten Enzyms ist möglicherweise ein entscheidender Schutzmechanismus, der die Zellen vor einer übermäßigen Peroxynitritbildung bewahrt.

Im Widerspruch zur Theorie, und entsprechend diskutiert, steht allerdings der Befund, daß sowohl die Hemmung der SOD als auch der Einsatz einer modifizierten, zellpermeablen SOD (SOD-PEG) sich als wirkungslos in Bezug auf das DCF-Signal erwiesen. Als ‚Scavenger‘ bedeutsam ist offenbar das Glutathion, ergab doch eine Absenkung der intrazellulären Glutathionkonzentration einen dramatischen Anstieg der DCF-Fluoreszenz, der durch das Glutathionperoxidase-Mimeticum Ebselen, nicht aber durch Ascorbat, kompensiert wurde. Mit der hier dargestellten Möglichkeit zum Life-Imaging der Peroxynitrit-Bildung mittels DCF-H auf Einzelzellebene ergeben sich eine Vielzahl von Anwendungen. Dabei bietet sich zum einen eine Analyse der zelltypspezifischen Entstehung des Peroxynitrits und zum anderen die Evaluierung protektiver Substanzen an.