

4.3 DCF als Marker für Peroxynitrit

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, daß DCF-H durch Peroxynitrit zu DCF oxidiert wird. Der Nachweis des DCF gelang sowohl am konfokalen Laserscanmikroskop als auch durch HPLC-Analyse nach Trennung der DCF-Derivate (Possel, Noack et al. 1997). Zeitgleich erschien eine Veröffentlichung, die diese Ergebnisse, ebenfalls im zellfreien System, bestätigte (Kooy, Royall et al. 1997). Peroxynitrit oxidiert in wesentlich geringeren Konzentrationen als Stickoxid, Superoxid und Wasserstoffperoxid das DCF-H zu DCF, und dies mit einer erheblich schnelleren Kinetik und Ausbeute. Es läßt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht feststellen, ob Peroxynitrit oder eines seiner Zerfallsprodukte das DCF-H oxidieren. Diese Unterscheidung mag für Messungen in biologischen System nicht entscheidend sein, wäre jedoch von außerordentlicher Bedeutung für die Erforschung der Zerfallswege des Peroxynitrits.

Spezifität von DCF-H

DCF-H ist, wie hier und auch schon an anderer Stelle gezeigt (Zhu, Bannenberg et al. 1994), ein keineswegs spezifischer Indikator für ein spezielles Oxidans. Deshalb muß in komplexen biologischen Systemen der Nachweis einer Peroxynitrit-vermittelten DCF-H Oxidation stets gesondert geführt werden. Dies kann entweder über Konzentrationsabschätzungen, die Analyse der Kinetik oder durch Manipulation der Peroxynitrit konstituierenden Radikale geschehen. In den hier verwendeten Mikro-/Astrogliaulturen ergab die gleichzeitige endogene Produktion von Stickoxid und Superoxid einen deutlichen Anstieg des DCF-Signals, verglichen mit dem Anstieg bei Hemmung der iNOS. Die Vorteile der Mikroskopie geschickt nutzend, konnte zudem durch den immunhistochemischen iNOS-Nachweis in denselben Zellen, mit denen zuvor DCF-Messungen durchgeführt wurden, eine fast vollständige Übereinstimmung zwischen DCF- und iNOS-Signal gezeigt werden.

Weitergehende Experimente ergaben unter ‚Ruhebedingungen‘ eine nur unwesentliche Veränderung des DCF-Signals in Stickoxid-produzierenden Mikrogliazellen über einen Zeitraum von 15 min, das dann jedoch nach Stimulierung der Superoxidproduktion durch Aktivierung der NADPH-Oxidase dramatisch anstieg. Daraus läßt sich folgern, daß die Superoxidproduktion in den verwendeten Zellen der limitierende Faktor der

Peroxynitritbildung ist. Dies wiederum deutet darauf hin, daß das Superoxid in den Mitochondrien effektiv abgebaut wird, eine Vermutung, die durch die Ausstattung der Zellen mit Mn-SOD gestützt wird. Andererseits ist die cytosolische Cu/Zn-SOD offenbar nicht in der Lage, das von der an der Zellmembran lokalisierten NADPH-Oxidase produzierte Superoxid abzufangen.

Der Anstieg der DCF-Fluoreszenz in Kontrollkulturen nach Aktivierung der NADPH-Oxidase verdient gesonderte Betrachtung. Die Versuche im zellfreien System ergaben, daß Superoxid DCF-H oxidiert. Dieser Befund wird von anderen Autoren bestritten (Zhu, Bannenberg et al. 1994). Superoxid ist entgegen der allgemeinen Auffassung ein eher schwaches Oxidans und kann auch reduzierend wirken (Deby & Goutier 1990). Die Cytotoxizität des Superoxids beruht wahrscheinlich vielmehr auf seiner Fähigkeit, freies Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren und andererseits darauf in [4Fe-4S]-Clustern gebundenes Eisen zu oxidieren, wobei die Konzentration des freien Fe^{2+} erhöht wird (Liochev & Fridovich 1994). In der Folge kann durch die Fentonreaktion das hochreaktive Hydroxylradikal entstehen. Es ist daher durchaus möglich, daß die Effekte des Superoxids auf das DCF-Signal, sowohl in Kultur als auch im zellfreien System, durch das Hydroxylradikal vermittelt sind.

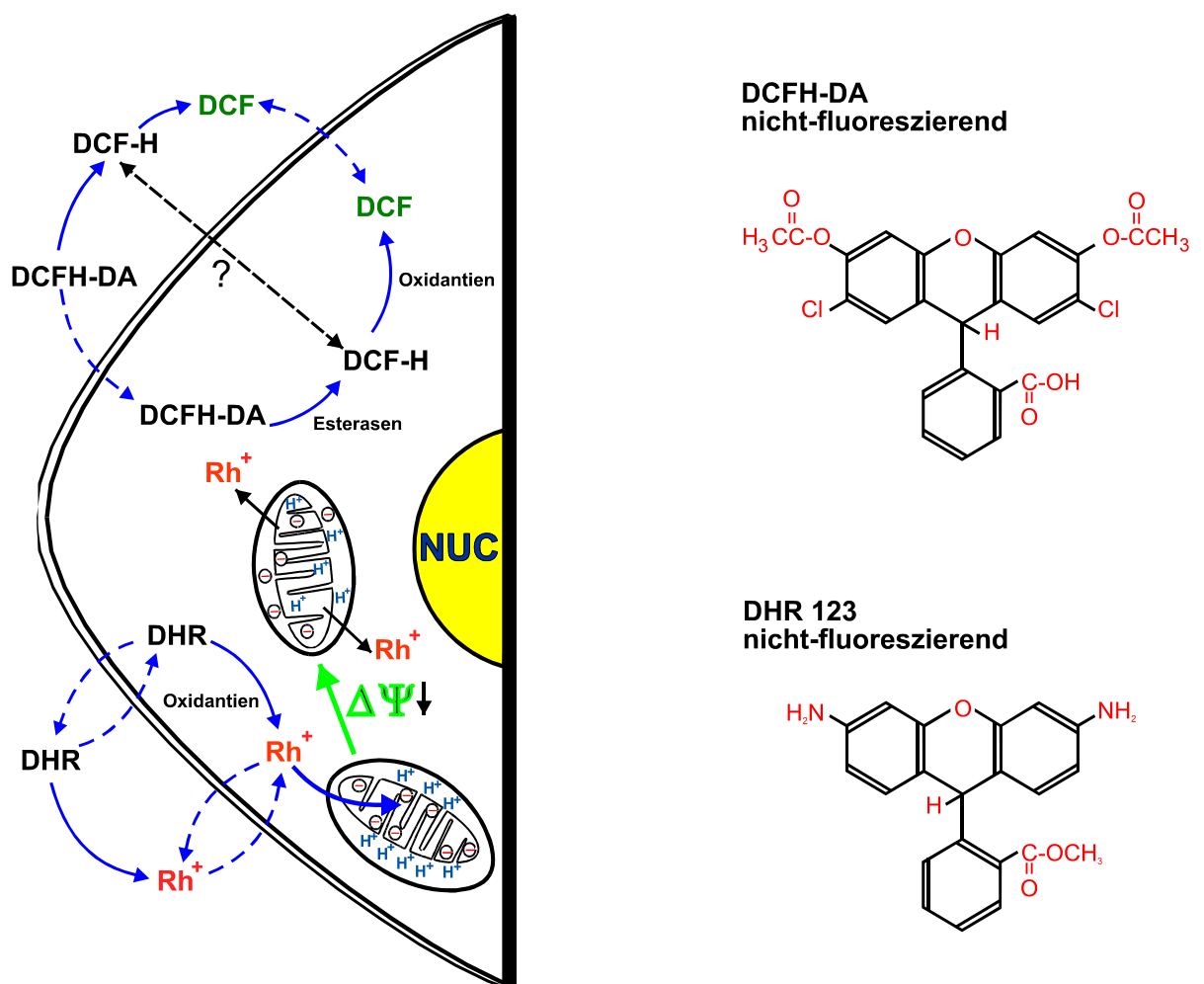
Als ein weiteres wichtiges Oxidans kommt die Hypochlorsäure in Betracht. Dieses hochtoxische Molekül wird von der Myeloperoxidase in aktivierten Neutrophilen, Makrophagen und Monocyten aus Wasserstoffperoxid und Chlorid synthetisiert und ist etwa 100 – 1000 fach reaktiver als Wasserstoffperoxid oder Superoxid (Conner & Grisham 1996). Jedoch wurde an anderer Stelle gezeigt (Crow 1997), daß Hypochlorsäure das DCF-H nur mit geringer Effizienz oxidiert und somit wahrscheinlich gegenüber der weit effektiveren Oxidation durch Peroxynitrit zu vernachlässigen ist. Zudem ist die Frage der Expression und der Regulation der Myeloperoxidase in Mikrogliazellen noch ungeklärt (Nagra, Becher et al. 1997; Carlson, Parrish et al. 1998), so daß nicht ohne weiteres angenommen werden kann, daß Hypochlorid unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen produziert wird.

Vergleich von DCF-H und DHR 123

DCF-H und DHR 123 sind strukturell verwandt (Übersicht 9), weswegen ein ähnliches Spektrum an oxidierenden Substanzen nicht verwundert. Jedoch gibt es, wie im folgenden

dargestellt, prinzipielle Unterschiede in der Membranpermeabilität und intrazellulären Kompartimentierung.

DCF-H wird den Zellen als Diacetat (DCFH-DA) angeboten, da der Ester, anders als die freie Base, membranpermeabel ist. Nach Passage der Zellmembran wird das DCFH-DA durch unpezifische Esterasen zu DCF-H deacetyliert. DCF-H ist erst nach Oxidation zu DCF fluoreszierend, da einzig DCF die für die Fluoreszenz notwendigen konjugierten Doppelbindungen aufweist (Übersicht 8 in Material und Methoden). DCF-H wie auch DCF sind nur eingeschränkt membranpermeabel und verbleiben, außer im Falle einer massiven Membranschädigung, für eine gewisse Zeit innerhalb der Zelle.



Übersicht 9: Oxidation von DCF-H und DHR 123

Im Gegensatz zu DCF-H ist DHR 123 selbst gut membranpermeabel, ebenso wie sein Oxidationsprodukt Rhodamin 123 (Übersicht 9). Rhodamin 123 ist ein häufig verwendetes Fluorochrom, das als Indikator des mitochondrialen Membranpotentials Verwendung findet, da es sich infolge seiner positiven Ladung innerhalb der Mitochondrien anreichert. Bei

Messungen mit DHR 123 wird somit das zu messende Oxidationsprodukt in den Mitochondrien kompartimentiert und die Fluoreszenz aufgrund der Akkumulation in einem nicht quantifizierbaren Ausmaß gequenchet. Des Weiteren ergibt sich das Problem, daß die Kinetik und damit die Quantität, mit der Rhodamin 123 aus dem Cytoplasma entfernt wird, entscheidend vom Membranpotential der Mitochondrien und deren Anzahl innerhalb einer individuellen Zelle abhängt. Zudem kann Rhodamin 123 ebenso durch die intakte Zellmembran diffundieren und ist dann im Medium, aufgrund des Verdünnungseffekt, zumindest mikroskopisch nicht mehr detektierbar. Da gerade das mitochondriale Membranpotential unter Bedingungen des oxidativen Stresses schnell abfallen kann, erscheint, abgesehen von der höheren Sensitivität, die Verwendung von DCF-H für das ‚Life-Imaging‘ von Peroxynitrit weitaus vorteilhafter.

4.4 Modulation der Schutzsysteme/Antioxidantien

Glutathion

Die massive Erhöhung des DCF-Signals nach Absenkung der intrazellulären GSH-Konzentration bestätigt die entscheidende Funktion dieses ubiquitären Antioxidans (Cooper & Kristal 1997). In Oligodendrocyten konnte ebenfalls eine Abhängigkeit des DCF-Signals vom GSH-Gehalt der Zellen gezeigt werden (Juurlink, Thorburne et al. 1998). Die unter GSH-Depletion beobachtete erhöhte DCF-Fluoreszenz in Astrocyten beruht wahrscheinlich auf der Diffusion des Stickoxids und/oder Peroxynitrits aus den Mikrogliazellen in die Astrocyten. Allerdings ist aus methodentechnischen Gründen nicht zu entscheiden, ob nun Stickoxid oder Peroxynitrit Ursache für die Erhöhung der DCF-Fluoreszenz ist. Durch die Beladungsdauer kommen auch andere Oxidantien außer Peroxynitrit in Frage. Da Astrocyten keine NADPH-Oxidase oder ein anderes stimulierbares Enzym, das Superoxid produziert, besitzen, lassen sich keine kinetischen Daten erheben, die Auskunft über die Anteile der intrazellulären Oxidantien an der DCF-Fluoreszenz geben. Neben einem direkten Einfluß des verminderten GSH-Levels auf die DFC-Fluoreszenz ist ebenso die Inhibition der Glutathionperoxidase, die Peroxynitrit katalytisch abbaut (Sies, Sharov et al. 1997), in Betracht zu ziehen. Dieses Enzym benutzt GSH als Kofaktor (K_M etwa 3 mM (De Marchena, Guarnieri et al. 1974)). Die Hemmung der GSH-Synthese durch BSO reduziert bei einer GSH-Konzentration von etwa 8 mM in Mikro-/Astrogliaulturen (Dringen & Hamprecht

1998) diesen Wert auf 1 mM. Damit liegt die GSH-Konzentration in BSO-behandelten Kulturen um Faktoren unterhalb des K_M -Wertes der Glutathionperoxidase für GSH, was wahrscheinlich eine verringerte Aktivität zur Folge hat.

Superoxiddismutase

Entgegen der Erwartung zeigte die Modulation der SOD-Aktivität keinen Effekt auf das DCF-Signal, sei es durch Einsatz des Kupferchelators Diethyldithiocarbamat als Inhibitor oder durch Zusatz der membrangängigen SOD-PEG zur Erhöhung der Aktivität.

Vor einer detaillierten Diskussion im Sinne eines eher monokausal wirkenden Mechanismus soll darauf hingewiesen werden, daß die Manipulation eines Schutzzyms (hier die SOD) in komplexen biologischen System aufgrund der Überkapazität anderer Schutzsysteme durchaus wirkungslos sein kann. Dazu sei auf die außergewöhnliche Resistenz von Mikro-/Astrogliazellen gegenüber oxidativem Stress hingewiesen (Bolanos, Heales et al. 1995). Dazu trägt auch das GSH mit einer Konzentration von etwa 8 mM in Mikro-/Astrogliazellen bei (Barker, Bolanos et al. 1996; Dringen & Hamprecht 1998). Damit liegt die Konzentration in diesen Zellen um Faktoren höher als der durchschnittliche GSH-Gehalt des Gehirns von etwa 1 - 3 mM (Cooper & Kristal 1997).

Zur Wirkung der SOD-PEG gibt es widersprüchliche Daten. Zahlreiche Publikationen belegen die protektive Wirkung der SOD-PEG in den unterschiedlichsten Schädigungsmodellen (Beckman, Minor et al. 1988; Liu, Beckman et al. 1989; Walther, Wade et al. 1991; Ito, Hiraishi et al. 1992), aber eben auch die Ineffektivität der exogen zugeführten SOD-PEG (Olson, Grizzle et al. 1987; Bertolatus, Klinzman et al. 1991; Haun, Kirsch et al. 1991; Igarashi, Hoshino et al. 1994). Da hier keine SOD-Aktivitätsbestimmungen (gemäß dem Motto: "All superoxide dismutases are equal but some are more equal than others" (Jadot & Michelson 1987)) durchgeführt wurden, ist es denkbar, daß die SOD-PEG nicht in ausreichender Konzentration cytosolisch aufgenommen wurde, obwohl, allerdings in Endothelzellen, durch markierte SOD-PEG die Aufnahme nachgewiesen werden konnte (Beckman, Minor et al. 1988).

Die Ineffektivität des SOD-Inhibitors Diethyldithiocarbamat im Hinblick auf die DCF-Fluoreszenz kann zum einem darin begründet liegen, daß die mitochondriale Mn-SOD durch Diethyldithiocarbamat nicht gehemmt, und so das in den Mitochondrien produzierte Stickoxid weiter abgebaut wird. Zum anderen wurde ein prooxidativer Effekt des Diethyldithio-

carbamats berichtet, der auf der effektiven Freisetzung von Stickoxid aus S-Nitrosoglutathion (GSNO) beruht und dabei möglicherweise zugleich Superoxid produziert (Arnelle, Day et al. 1997). GSNO, das durch die Reaktion von Stickoxid mit GSH entsteht (Stamler, Simon et al. 1992), wird als ‚package‘ betrachtet, das in der Lage ist, Stickoxid zu speichern und zu transportieren (Ignarro 1990; Do, Benz et al. 1996; Mayer, Pfeiffer et al. 1998). Da GSNO in humanen Neutrophilen in mikromolaren Konzentrationen gefunden wurde (Clancy, Levartovsky et al. 1994), besteht der begründete Verdacht, daß auch Mikrogliazellen erhöhte GSNO-Konzentrationen aufweisen.

Ascorbat und Ebselen

Die Konzentration des Ascorbats beträgt in-vivo etwa 3 mM, jedoch ist dieses Vitamin in primären Mikro-/Astrogliaulturen nicht nachweisbar (Spector 1989). Exogenes Ascorbat zeigte keinen Effekt auf das DCF-Signal in primären Mikro-/Astrogliaulturen. Dieser Befund bestätigt die detaillierten Untersuchungen zur Reaktion von Ascorbat und Peroxynitrit (Bartlett, Church et al. 1995). Obwohl Ascorbat im zellfreien System durchaus mit Peroxynitrit reagiert, ist es aufgrund der unterschiedlichen Reaktionskinetik von Peroxynitrit mit Ascorbat und GSH (sowie der Konzentrationsverhältnisse) höchst unwahrscheinlich, daß Ascorbat in lebenden Zellen, sogar in millimolaren Konzentrationen, mit Peroxynitrit reagiert (Bartlett, Church et al. 1995). Im Gegensatz zu Ascorbat zeigte sich die anti-inflammatorische Substanz Ebselen (Muller, Cadenas et al. 1984; Sies & Masumoto 1997) in Konzentrationen ab 100 µM als äußerst effektiv. Ebselen verringerte das DCF-Signal in GSH-verarmten Kulturen auf den Wert von Kontrollkulturen. In zellfreien Experimenten konnte zudem gezeigt werden, daß Ebselen, auch in Gegenwart von diversen Kofaktoren, nicht in Lage ist, DCF zu DCF-H zu reduzieren. Auch wenn mit dieser Arbeit in Bezug auf Ebselen nur deskriptive Ergebnisse dargestellt sind, so ist doch anzunehmen, daß die beobachteten Effekte auf dem katalytischen Abbau von Peroxynitrit beruhen. Dieser Mechanismus ist gut untersucht und stellt das selenhaltige Ebselen, wie auch die in ihrer Wirkung ähnliche selenhaltige Glutathionperoxidase, in den Rang eines effektiven Schutzmechanismus gegenüber Peroxynitrit (Masumoto, Kissner et al. 1996; Briviba, Kissner et al. 1998).

4.5 Ausblick

Aus den vorgestellten Eigenschaften des DCF-H ergeben sich eine Vielzahl von experimentellen Anwendungen für das Life-Imaging des Peroxynitrits. Dazu zählt insbesondere die Untersuchung solcher Zellen, die eine reichhaltige NOS-Ausstattung aufweisen, wie die Endothelzellen der Gefäße, Zellen des hämatopoetischen Systems sowie eine Subpopulation von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. In diesem Zusammenhang ist es auch von Interesse, die zweiseitigen Effekte des Stickoxids im neurodegenerativen Geschehen genauer als bisher zu analysieren. Die Verwendung von DCF-H liefert hier einen Ansatz, die zu vermutende erhöhte Entstehung von Peroxynitrit im Fall einer destruktiven Stickoxidwirkung zu verifizieren. Weiterhin bedarf die in dieser Arbeit experimentell nur am Rande gestreifte Ineffektivität der pharmakologischen Modulation der SOD-Aktivität einer Aufklärung. Dazu ist eine detaillierte Untersuchung der Superoxidkonzentrationen in Mikro- und Astrogliazellen vor und nach Zugabe der exogenen Wirkstoffe notwendig. Schlußendlich ergibt sich durch die Kombination des DCF-H und der konfokalen Laserscanmikroskopie eine Möglichkeit zur Evaluierung protektiver Substanzen, die Aussagen über zelltypspezifische Wirkungen innerhalb zellulär komplexer Systeme erlaubt.