4 Diskussion

4.1 Neuronale Precursor-Zellen

Bei der Behandlung von Früh- und Neugeborenen, älteren Kindern und Erwachsenen mit respiratorischen Erkrankungen erfolgt häufig die Anwendung supraphysiologischer Konzentrationen von Sauerstoff (Hyperoxie). Seit längerem bekannt ist ein Toxizitätspotential der Hyperoxie im Hinblick auf viele Organe und Gewebe. Eine wichtige Rolle der Hyperoxie in der Pathogenese der Retinopathie (85-87) und der bronchopulmonalen Dysplasie (88-90) der Frühgeborenen ist beschrieben worden, wobei nicht vergessen werden darf, dass für Frühgeborene Raumluft bereits Hyperoxie darstellt (intrauteriner pO_2 27-35 mmHg, postnataler pO_2 40-80 mmHg). Da in erster Linie die Lunge hohen O_2-Partialdrücken ausgesetzt ist, sind Modelle von epithelialen und endothelialen Zellen der Lunge besonders gut untersucht. Neuere Untersuchungen an neonatalen Ratten zeigten jedoch auch eine Sensibilität des Gehirns gegenüber Hyperoxie, die in der Phase besonders starken Wachstums zwischen den postnatalen Tagen 0 und 7 am ausgeprägtesten ist (91). Im Vergleich mit der normalen menschlichen Entwicklung entspricht diese Zeitspanne den letzten drei intrauterinen Monaten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen an neonatalen Ratten (91) konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Hyperoxie-Sensitivität neuronaler Zellen reifeabhängig ist. Als Modell für neuronale Precursor-Zellen dienten hier native Phäochromozytom(PC12)-Zellen der Ratte. Durch Hyperoxie (80% O_2) akkumulierten diese in Abhängigkeit von der Expositionszeit in der S-Phase des Zellzyklus, einhergehend mit einer Verminderung des Anteils in G0/G1. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Untersuchungen an humanen BSMC (bronchial smooth-muscle cells) und neonatalen Lungenfibroblasten (NLF), die durch Hyperoxie-Exposition eine verringerte Proliferations- und DNA-Syntheserate zeigen, begleitet von einem Anstieg der S-Phase-Zellen (92). Der Arrest in der S-Phase geht mit einer Erhöhung der Spiegel des cdk-Inhibitors p21 und des Tumor-Supressor-Gens p53 einher. Auch bei A549-Zellen (klonale Linie aus humanen Alveolarzellen Typ 2) wurde ein Hyperoxie-bedingter S-Phase-Arrest sowie eine Erhöhung von p21 und p53 und eine Reduktion der Kinaseaktivität von cyclin D1/cyclin E1-cdk-Komplexen nachgewiesen (93). Mit redoxmodulierenden Agenzien wie H_2O_2 oder Hemin behandelte PC12- und auch Jurkat-Zellen zeigen ebenfalls eine Aktivierung von p21 (94), die durch parallele Inhibition der GSH-Synthese mit BSO verstärkt werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass Hyperoxie-Exposition auch bei neuronalen Precursor-Zellen (native PC12-Zellen) zur Aktivierung eines Zellzyklus-Checkpoints mit nachfolgender Akkumulation in der S-Phase führt, möglicherweise durch oxidative Schädigung der DNA oder Aktivierung redoxsensitiver Kinasen, die zur Aktivierung von Enzymen und Genen mit Schlüsselfunktion in der Zellzyklusregulation führen.

48stündige Hyperoxie-Exposition nativer PC12-Zellen zeigte neben einer noch stärkeren Akkumulation in der S-Phase auch einen höheren Anteil Zellen in der sub-G1-Region, was auf durch Hyperoxie ausgelöste Apoptose hindeutet. Ähnliche Ergebnisse zeigen sowohl Untersuchungen der Lunge im Tiermodell (95, 96) als auch an endothelialen und epithelialen

Zellkulturmodellen der Lunge (97-101), wobei der genaue Schädigungsmechanismus in großen Teilen noch unklar ist. In der Literatur (102) wird davon ausgegangen, dass Hyperoxie in den Zellen zur Bildung reaktiver Sauerstoffgruppen (ROS), u.a. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid-Anionen (O_2^-), mit folgender oxidativer Schädigung zellulärer Makromoleküle führt, die einen gesteigerten Zelltod nach sich zieht. Der verstärkte Umsatz des Fluoreszenzfarbstoffes DCF durch native PC12-Zellen mit einem Maximum nach 2- und 12stündiger Hyperoxie-Exposition weist auf eine Beteiligung von ROS an den in der vorliegenden Studie beobachteten Veränderungen hin. Zelltod kann durch zwei verschiedene Wege erfolgen, zum einen durch Apoptose, zum anderen durch Nekrose. Zur Form des Zelltodes durch Hyperoxie-Exposition gibt es differierende Ergebnisse: Während murine Lungenepithelzellen (MLE), humane retinale Kapillarendothelzellen sowie zerebrale Endothelzellen Merkmale apototischen Zelltodes wie vermehrte Annexin V-Propidiumjodid-Bindung und Inhibierbarkeit des Zelltodes mit Caspase-Inhibitoren zeigen (70, 71), konnten Kazzaz et al. bei humanen A549-Zellen nach Hyperoxie-Exposition keine apoptosetypischen Parameter nachweisen (61). Untersuchungen der Folgen oxidativen Stresses an Modellen für neuronale Zellen erbrachten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse: Hyperoxie initiiert in hippocampalen Zellen in Kultur Apoptose (103). Oxidativer Stress durch Reduktion der verfügbaren Antioxidantien (vorrangig GSH) führt bei verschiedenen neuronalen Modellen in Abhängigkeit von der Art der Reduktion des GSH-Pools zu Apoptose oder Nekrose: Reduktion des zytoplasmatischen GSH-Pools durch Inhibition der γ-Glutamylcysteinsynthetase mit BSO initiiert bei Neuroblastom(NS20Y)-Zellen Apoptose (104), kortikale (gemischte gliale und neuronale) Kulturen zeigen nekrotischen Zelltod (105). Bei gleichzeitiger Reduktion des zytoplasmatischen und des mitochondrialen GSH-Pools durch Konjugation von GSH mit Etacrynsäure wiesen die gemischten kortikalen Kulturen Kennzeichen des apoptotischen Zeltodes auf, das gleiche Ergebnis erbrachten Untersuchungen an zerebellaren Körnerzellen (31). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten nativen PC12-Zellen zeigten durch alleinige 24stündige Hyperoxie-Exposition kaum eine Veränderung der Zellaktivität in der MTT-Messung, auch Reduktion des zytoplasmatischen GSH-Pools durch BSO-Behandlung (200 µM) unter Raumluft führte lediglich zu einer geringen Senkung der Zellaktivität. Die Messung apoptosetypischer Parameter wie vermehrte AnnexinV-Propidiumjodid-Bindung und aktivierte Caspase-3 zeigte ebenfalls kaum einen Unterschied bei Verwendung lediglich eines Stressors. Erst die Kombination von Reduktion der verfügbaren Antioxidantien mit BSO und Hyperoxie-Exposition führte zu einer starken Reduktion der Zellaktivität. Durch Messung apoptosetypischer Parameter wie vermehrte Annexin V-Propidiumjodid-Bindung und aktivierte Caspase-3 sowie die Inhibierbarkeit des Zelltodes mit dem Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk konnte gezeigt werden, dass die Ursache für die reduzierte Zellaktivität der nativen PC12-Zellen apoptotischer Zelltod ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an neonatalen Ratten überein, bei denen Hyperoxie (95% O_2) in Kombination mit BSO-Behandlung zu einer erhöhten Apoptoserate im Vorderhirn, Hippocampus, Striatum und Cerebellum führt (62). Auch hier zeigt sich nach Behandlung mit einem der beiden Stressoren keine signifikante Veränderung. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass schon alleinige 6stündige Hyperoxie-Exposition

neonataler Ratten zu einem Anstieg der GSSG-Konzentration und der GSSG/GSH-Ratio (hinweisend auf eine gesteigerte Produktion von ROS) sowie zu einer signifikanten Erhöhung des apoptotischen Zelltodes im Vorderhirn, Hypothalamus, Hippocampus und in den Basalganglien führt (91). Juvenile hippocampale Schnittkulturen von Ratten zeigen ebenso eine hohe Sensitivität gegenüber Hyperoxie mit konsekutiv gesteigertem Zelltod (17).

4.2 Neuronal differenzierte PC12-Zellen

Neuronale Vorläuferzellen sind wie native PC12-Zellen mitotisch kompetent. Stimulation der Tyrosinkinase-Rezeptoren durch Mitglieder der Neurotrophin-Familie (u.a. NGF) ist notwendig für das Überleben und die Vermehrung der neuronalen Vorläuferzellen in der Embryonalperiode. Neben der antiapoptotischen Wirkung haben Neurotrophine großen Einfluss auf die morphologische Differenzierung, das axonale Wachstum, die Entwicklung synaptischer Verbindungen und die Bildung von Neurotransmittern in der späten Fetalperiode und der Neonatalperiode. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass der Spiegel der Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 im Nabelschnurblut mit dem Gestationsalter sowie der fortschreitenden neuronalen Reifung korreliert (106, 107).

Behandlung nativer PC12-Zellen mit NGF führt zu einer Verringerung der Zellteilungsrate sowie durch Änderung der aktiven Gene zu einem veränderten Enzymmuster der Zellen mit anschließender Differenzierung in neuronale Zellen (108). Terminal differenzierte neuronale Zellen sind in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert, und Schlüsselregulatoren des Zellzyklus sind downreguliert. Yan et al. (109) konnten zeigen, dass NGF-Behandllung die Transkription und Expression des cdk-Inhibitors p21 induziert, der auch durch das Tumor-Supressor-Protein p53 induziert wird. Parallel wird die Konzentration spezifischer cdk-Proteine (cdc2, cdk2, cdk6 und in geringem Maße auch cdk4) sowie der G2-M-spezifischen Cycline B1 und B2 reduziert (110, 111). Es kommt zwar zu einem Anstieg der Konzentration von Cyclin D1, die Cyclin D1-assoziierte Kinaseaktivität ist jedoch u.a. durch Bildung von p21/CyclinD1-Komplexen absolut verringert. Folge ist eine De- bzw. Hypophosphorylierung des Rb-Proteins, die einen Übergang in die S-Phase verhindert und so den Arrest in der G0/G1-Phase nach sich zieht. Damit lässt sich der in der vorliegenden Studie nach NGF-Behandlung nachgewiesene höhere Anteil von PC12-Zellen in der G0/G1-Phase erklären.

Die durch NGF initiierte neuronale Differenzierung und der damit verbundene Wachstumsstop in G0/G1 verhinderte die bei nativen PC12-Zellen durch Hyperoxie-Exposition induzierte Akkumulation in der S-Phase des Zellzyklus. Ebenso stieg der Anteil der Zellen in der subG1-Region nach 48stündiger Hyperoxie-Exposition nicht an. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen an epithelialen Zellen der Lunge (Mv1Lu = mink lung adenocarcinoma): Durch TGF-ß, Serumdeprivation oder Konfluenz kann bei diesen ebenfalls ein Wachstumsstop in der G1-Phase des Zellzyklus induziert werden, der wie bei neuronal differenzierten PC12-Zellen vor den hyperoxiebedingten Zellzyklusveränderungen schützt (112). Auch der in der vorliegenden Arbeit durch Inhibition der GSH-Synthese mit BSO und anschließende Hyperoxie-Exposition

verursachte Abfall der Zellaktivität durch apoptotischen Zelltod nativer PC12-Zellen war nach neuronaler Differenzierung nicht mehr nachweisbar, wobei der Schutz durch NGF konzentrations- und zeitabhängig war. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Studien von Pan et al. (30), die zeigen konnten, dass 24stündige Präinkubation mit NGF PC12-Zellen vor H_2O_2-induziertem oxidativem Stress schützt. Ursache für den durch NGF vermittelten Schutz könnte neben dem oben beschriebenen Zellzyklusarrest in G0/G1 eine Erhöhung der Konzentrationen und Aktivitäten verschiedener antioxidativer Enzyme sein. So konnte gezeigt werden, dass durch NGF die Stabilität der GCS-mRNA in PC12-Zellen erhöht wird, was zu einem Anstieg der Aktivität des Enzymaktivität um 50% nach 3 Tagen führt (113). Auch die mRNA-Spiegel von Katalase und GSH-Px steigen nach Stimulation von PC12-Zellen mit NGF (29, 114-116). Die Aktivität der GCS steigt bereits 9 Stunden nach NGF-Gabe um 50% (113), höhere Aktivitäten nach NGF wurden ebenfalls für GSH-Px, G6P-D und NADH-/NADPH-Dehydrogenase gemessen (30, 70). Im Widerspruch dazu steht die Arbeit von Sasaki et al. (117), die zeigt, dass die Empfindlichkeit der PC12-Zellen gegenüber oxidativen Agenzien durch Differenzierung mit NGF steigt, unter anderem durch Abfall von GSH-Px-Aktivität und GSH-Konzentration. Präinkubation mit BSO erhöht die Toxizität der oxidativen Agenzien gegenüber nativen Zellen, die Sensitivität der differenzierten Zellen wird dadurch jedoch nicht verändert. Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte neben Unterschieden im experimentellen Design der Studien auch die bekannte Neigung der PC12-Zellen zur Bildung verschiedener Subklone sein.

Die Ursache für die in der vorliegenden Studie nachgewiesene erhöhte Resistenz differenzierter neuronaler Zellen könnte zum einen durch den NGF-induzierten Arrest in G1 bedingt sein, da nicht-replizierende DNA durch die dichtere Chromatinstruktur weniger empfindlich gegenüber oxidativer Schädigung sein könnte. Zum anderen könnte auch die nach NGF-Behandlung beschriebende Erhöhung der Konzentrationen und Aktivitäten der antioxidativen Enzyme oder eine Kombination aus beidem die Ursache sein. Für eine Beteiligung der *de novo* Proteinsynthese an der beobachteten schützenden Wirkung von NGF spricht die in der vorliegenden Studie notwendige Präinkubation mit NGF von mindestens 12-16 Stunden vor Hyperoxie-Exposition. Auch die Inhibierbarkeit des Schutzes durch Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid weist darauf hin.

4.3 Signaltransduktion

Die durch NGF nach Bindung an den trk-A-Rezeptor induzierte neuronale Differenzierung mit Zellzyklusarrest in G0/G1 wird durch anhaltende Aktivierung verschiedener Signaltransduktions-kaskaden in den PC12-Zellen (ERK1/2, PI3-K) vermittelt. In der vorliegenden Studie konnte durch Inhibition von ERK1/2 mit U0126 oder PI3-Kinase mit Wortmannin der NGF-vermittelte Schutz vor hyperoxiebedingten Veränderungen im Zellzyklus wieder aufgehoben werden, der Schutz vor verstärktem oxidativen Stress bestand bei Koinkubation mit einem der beiden Inhibitoren (U0126 / Wortmannin) und NGF jedoch weiterhin. Ähnlich konnten auch Virdee et al. (118) zeigen, dass Inhibition der ERK1/2 mit PD98059 zwar das Aussprossen von Neuriten

verhindern kann, jedoch nicht das NGF-induzierte Überleben sympathischer Neuronen nach Serumdeprivation. Dies deutet auf eine Beteiligung oder ein Zusammenspiel weiterer, bisher noch nicht identifizierter Signaltransduktionswege an der NGF-vermittelten Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli hin.

ERK1/2-Aktivierung ist typischerweise assoziiert mit proliferativen oder differenzierenden Prozessen, sie wird durch Mitogene und Wachstumsfaktoren induziert. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass der Aktivierungsstatus der ERK1/2-Kaskade auch durch Hyperoxie verändert werden kann. Bei differenzierten PC12-Zellen, deren ERK1/2 durch NGF-Stimulation anhaltend aktiviert ist, ließ sich durch Hyperoxie-Exposition eine Abschwächung der Aktivität nachweisen. Native PC12-Zellen zeigen eine geringere ERK1/2-Grundaktivität. Bei ihnen führte Hyperoxie zu einer Aktivierung der ERK1/2 mit einem Maximum nach 24 Stunden, möglicherweise über Bildung von ROS oder durch Änderung des zellulären Redoxstatus. Dafür spricht auch, dass eine Verstärkung des oxidativen Stresses durch Inhibition der GSH-Synthese mit BSO eine noch stärkere Aktivierung der ERK1/2 zur Folge hatte, die bereits nach 4 Stunden Hyperoxie-Exposition deutlich nachweisbar war. Inhibition der ERK1/2-Kaskade mit U0126 konnte die hyperoxiebedingte Akkumulation nativer PC12-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu einem großen Teil verhindern, ebenso war die durch verstärkten oxidativen Stress induzierte Reduktion der Zellvitalität durch apoptotischen Zelltod nicht mehr nachweisbar. Untersuchungen an nicht-neuronalen Zellen wie murinen Makrophagen und murinen Lungenepithelzellen (MLE1) zeigen ebenso, dass Hyperoxie über eine verstärkte Bildung von ROS zu einer Aktivierung der ERK1/2-Kasakade führt, die proapototisch wirkt (7, 70). In verschiedenen *in vitro*-Modellen, die Neurotoxizität simulieren, konnte ebenfalls eine Beteiligung der ERK1/2-Kaskade an der Vermittlung proapoptotischer Signale nachgewiesen werden (119-122).

Interessant ist, dass in Fällen, in denen ERK1/2-Aktivierung Apoptose zur Folge hatte, der Zelltod durch oxidativen Stress induziert war. ERK-Aktivierung kann also zum einen pro-, zum anderen antiapoptotische Prozesse zur Folge haben, wobei es vom stimulierenden Agens, von der präzisen Kinetik und vom zellulären Umfeld abhängt, ob die aktivierten Kinasen zum Überleben oder zum Tod der Zelle führen: Stimulation mit NGF hat Aktivierung von ERK1/2 mit Translokation des aktiven Enzyms vom Zytoplasma in den Nucleus zur Folge, wo es die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wie CREB und AP-1 durch Phosphorylierung reguliert (105). Folgen sind der beobachtete G0/G1-Arrest und die stärkere Resistenz gegenüber oxidativen Stimuli durch höhere Konzentrationen und Aktivitäten antioxidativer Enzyme. Im Gegensatz dazu führt ERK-Aktivierung durch hyperoxiebedingte ROS-Bildung oder oxidative Imbalance zu dem in der vorliegenden Studie beschriebenen S-Phase-Arrest mit Induktion des apoptotischen Programms (123). Als Ursache der Toxizität anhaltender ERK1/2-Aktivierung nach Glutamat-induziertem oxidativem Stress bei hippocampalen HT22-Zellen und primären kortikalen Neuronenkulturen ist eine unphysiologische Akkumulation der aktivierten ERK1/2 im Nucleus gefunden worden (124), die wahrscheinlich durch oxidative Inaktivierung redoxsensitiver ERK-spezifischer Phosphatasen bedingt ist (110). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die Toxizität der kombinierten BSO-Hyperoxie-Exposition bei nativen PC12 -

Zellen maßgeblich sein, zumal auch hier, wie in den oben beschriebenen Arbeiten der Einsatz des MEK1/2-Inhibitors U0126 protektiv wirkt.

Zusammenfassend soll diese Arbeit zur Aufklärung beitragen, welche Mechanismen die Toxizität der Hyperoxie vor allem im Zusammenhang mit beschränkten antioxidativen Reserven vermitteln, um eine Grundlage für die Erforschung möglicher protektiver Substanzen zu schaffen. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität neuronaler Zellen reifeabhängig ist. Die vorliegenden Experimente sind ausschließlich an Phäochromozytom-Zellen der Ratte durchgeführt worden, die ein anerkanntes Modell für proliferierende und durch Differenzierbarkeit mit NGF auch für terminal differenzierte neuronale Zellen darstellen. Es ist jedoch zu bedenken, dass die nativen PC12-Zellen Tumorzellen sind und viele Eigenschaften derselben tragen (125), die sich durch Differenzierung möglicherweise verlieren. Mithin ist also unklar, inwieweit sich die Ergebnisse von PC12-Zellen auf mitotisch kompetente neuronale Precursor-Zellen übertragen lassen.