

Mitochondriale Effekte von Minozyklin und Neuroprotektion



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Neurowissenschaftlerin Kathleen Kupsch
geb. am 18.05.1981 in Lauchhammer

Gutachter: Prof. Dr. Gerald Wolf
Prof. Dr. Erich Gulbins

eingereicht am 06.11.2008

verteidigt am 15.04.2009

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VI |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | IX |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen | 1 |
| 1.2 Minozyklin und Neuroprotektion | 4 |
| 1.2.1 Wirkmechanismen von Minozyklin | 5 |
| 1.2.2 Blockade der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore durch Minozyklin | 8 |
| 1.2.3 Minozyklin bei Morbus Alzheimer | 11 |
| 1.2.4 Die Rolle der Permeabilitätstransitions-pore bei Morbus Alzheimer | 13 |
| 1.3 Ziele der Arbeit | 15 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1 Material | 17 |
| 2.1.1 Geräte | 17 |
| 2.1.2 Chemikalien | 17 |
| 2.1.3 Puffer und Medien | 20 |
| 2.1.4 Sonstige Lösungen | 22 |
| 2.1.5 Lösungsmittel | 22 |
| 2.1.6 Gradientengel | 23 |
| 2.2 Methoden | 23 |
| 2.2.1 Zellkultur | 23 |
| 2.2.1.1 A β -Präparation | 23 |
| 2.2.1.2 Beschichtung von Deckgläschen und Wellplatten | 23 |
| 2.2.1.3 Präparation primärer Hippokampuskulturen | 24 |
| 2.2.1.4 Mikroskopie | 24 |
| 2.2.1.5 MTT-Assay | 25 |
| 2.2.1.6 Bestimmung der Formazan-Exozytose | 25 |
| 2.2.1.7 Bestimmung der LDH-Freisetzung | 26 |
| 2.2.1.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials | 27 |
| 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden | 27 |
| 2.2.2.1 Proteinbestimmung mittels BCA | 27 |
| 2.2.2.2 SDS-Gelelektrophorese und <i>Western Blotting</i> | 28 |
| 2.2.3 Analyse mitochondrialer Funktionalität | 28 |
| 2.2.3.1 Isolation von Mitochondrien aus Lebergewebe | 28 |
| 2.2.3.2 Isolation nicht-synaptischer Mitochondrien aus Hirngewebe mittels Percoll | 29 |
| 2.2.3.3 Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe mittels Digitonin | 29 |
| 2.2.3.4 Inkubationsmedien | 30 |
| 2.2.3.5 Spektrophotometrische Bestimmung des Matrixvolumens | 30 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.2.3.6 | Messung von Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität | 31 |
| 2.2.3.7 | Analyse des freigesetzten Cytochrom c | 32 |
| 2.2.3.8 | Bestimmung der Redoxaktivität | 32 |
| 2.2.3.9 | Bestimmung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration | 33 |
| 2.2.4 | Analyse der Daten und Statistik | 33 |
| 2.2.4.1 | Analyse der mitochondrialen Schwellung | 34 |
| 3 | ERGEBNISSE | 35 |
| 3.1 | Effekte von Minozyklin in einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer | 35 |
| 3.1.1 | Minozyklin schützt primäre hippokampale Kulturen gegen eine $\text{A}\beta_{25-35}$ -induzierte Hemmung der MTT-Reduktion | 35 |
| 3.1.2 | Minozyklin normalisiert die durch $\text{A}\beta_{25-35}$ beschleunigte Externalisierung des MTT-Formazans | 38 |
| 3.1.3 | Minozyklin schützt primäre hippokampale Kulturen nicht vor $\text{A}\beta_{25-35}$ -vermittelter Toxizität | 42 |
| 3.2 | Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien | 45 |
| 3.2.1 | Untersuchungen an Lebermitochondrien | 45 |
| 3.2.1.1 | In Saccharose-Medium verhindert Minozyklin die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung von Rattenlebermitochondrien | 45 |
| 3.2.1.2 | In KCl-basiertem Medium induziert Minozyklin eine mitochondriale Schwellung, Depolarisation und Cytochrom c-Freisetzung | 51 |
| 3.2.1.3 | Minozyklin erhöht die Leitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran für Na^{+} -, K^{+} - sowie Cl^{-} -Ionen | 57 |
| 3.2.1.4 | Minozyklin induziert eine drastische Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration | 59 |
| 3.2.1.5 | Die Blockade des mitochondrialen K^{+} -Uniporters oder des <i>inner membrane anion channel</i> verringert die MC-induzierte Schwellung in KCl-basiertem Medium | 62 |
| 3.2.2 | Untersuchungen an Hirnmitochondrien | 64 |
| 4 | DISKUSSION | 68 |
| 4.1 | Effekte von Minozyklin in einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer | 68 |
| 4.2 | Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien | 73 |
| 4.3 | Schlussfolgerung | 84 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 86 |
| 6 | ABSTRACT | 87 |
| 7 | LITERATUR | 88 |
| | DANKSAGUNG | 107 |

| | |
|--------------------|------------|
| LEBENS LAUF | 109 |
| ERKLÄRUNG | 110 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------|--|
| 5-HD | 5-Hydroxydekanoat |
| a. u. | willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>) |
| ABAD | Amyloid-bindende Alkoholdehydrogenase |
| ADAM | <i>a disintegrin and metalloprotease domain</i> |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AICD | <i>amyloid precursor protein intracellular domain</i> |
| AIF | <i>apoptosis inducing factor</i> |
| ALS | amyotrophe Lateralsklerose |
| AM | Acetomethyl |
| AMA | Antimycin A |
| ANOVA | Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>) |
| ANT | Adeninnukleotidtransporter |
| APP | <i>amyloid precursor protein</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| A β | β -Amyloid |
| BA | Bongkreksäure (<i>bongkreki acid</i>) |
| BACE1 | <i>β-site APP converting enzyme</i> |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma gene 2</i> |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CA | Chloramphenicol |
| CaG | Calcium Green |
| CRC | Kalziumaufnahmekapazität (<i>calcium retention capacity</i>) |
| CsA | Cyclosporin A |
| CTF | C-terminales Fragment |
| CypD | Cyclophilin D |
| DCCD | Dizyklohexylcarbodiimid |
| DIABLO | <i>direct IAP-Binding Protein with low pI</i> |
| DIV | <i>days in vitro</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FCCP | Carbonylzyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon |
| FKS | fötales Kälberserum |
| HBSS | <i>Hank's buffered salt solution</i> |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure |

| | |
|------------------------|--|
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>) |
| IAP | <i>inhibitor of apoptosis</i> |
| ICAD | <i>inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease</i> |
| IG | Immunglobulin |
| IMAC | <i>inner membrane anion channel</i> |
| IMM | innere Mitochondrienmembran |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| JC-1 | 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaninchlorid |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LTP | <i>long term potentiation</i> |
| MC | Minozyklin |
| MgG | Magnesium Green |
| MMP | Matrixmetalloprotease |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| mPTP | mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore |
| MPTP | 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin |
| MT Green | Mitotracker Green |
| mtCK | mitochondriale Kreatinkinase |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NAD ⁺ /NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NEM | N-Ethylmaleimid |
| OMM | äußere Mitochondrienmembran (<i>outer mitochondrial membrane</i>) |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| P _i | anorganisches Phosphat (<i>inorganic phosphate</i>) |
| PS | Präsenilin |
| PT | Permeabilitätstransition |
| RBM | Rattenhirnmitochondrien (<i>rat brain mitochondria</i>) |
| RCR | <i>respiratory control ratio</i> |
| RLM | Rattenlebermitochondrien |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNS | Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| RuR | Rutheniumrot |
| sAPP | lösliches APP (<i>soluble APP</i>) |
| SC | Sanzyklin |
| SDS | Natriumdodezylsulfat |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>) |
| Smac | <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i> |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> |

| | |
|----------------|--|
| TBST | TBS/Tween |
| TC | Tetrazyklin |
| TEA | Tetraethylammonium |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TMRM | Tetramethylrhodaminmethylester |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| VDAC | <i>voltage dependent anion channel</i> |
| vs. | <i>versus</i> |
| WST | wasserlösliches Tetrazoliumsalz (<i>water soluble tetrazolium</i>) |
| zVAD-fmk | Carbobenzoxy-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon |
| $\Delta\psi_m$ | mitochondriales Membranpotential |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|----|
| Abb. 1.1: | Strukturformel und Radikalfängereigenschaften von Minozyklin | 7 |
| Abb. 1.2: | Molekularer Aufbau der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore | 10 |
| Abb. 1.3: | <i>Processing</i> des <i>Amyloid-Precursor-Proteins</i> | 13 |
| Abb. 2.1: | Ablauf der Exozytose des MTT-Formazans | 26 |
| Abb. 2.2: | Bestimmung der Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme | 34 |
| Abb. 3.1: | Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit $A\beta_{25-35}$ auf die MTT-Reduktion primärer hippocampaler Kulturen | 35 |
| Abb. 3.2: | Modulation der Wirkung von $A\beta_{25-35}$ auf die MTT-Reduktion durch Minozyklin | 36 |
| Abb. 3.3: | Einfluss von $A\beta_{25-35}$ auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) primärer hippocampaler Kulturen | 37 |
| Abb. 3.4: | Verlauf der MTT-Externalisierung in primären hippocampalen Kulturen | 39 |
| Abb. 3.5: | Quantifizierung der Wirkung von $A\beta_{25-35}$ und Minozyklin auf die Formazan-Externalisierung | 40 |
| Abb. 3.6: | Effekt von Cholesterol auf die MTT-Umsetzung primärer Hippokampuskulturen | 41 |
| Abb. 3.7: | Effekt von Cholesterol und Minozyklin auf die MTT-Formazan-Externalisierung | 42 |
| Abb. 3.8: | LDH-Freisetzung und mitochondriales Membranpotential ($\Delta\psi_m$) nach Langzeitinkubation mit $A\beta_{25-35}$ | 43 |
| Abb. 3.9: | Effekt von Minozyklin auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) $A\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen | 43 |
| Abb. 3.10: | Phasenkontrastaufnahmen $A\beta_{25-35}$ -behandelter Kulturen nach 6-tägiger Inkubationszeit | 44 |
| Abb. 3.11: | Effekt einer Blockade der mPTP auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) $A\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen | 45 |
| Abb. 3.12: | Einfluss von Minozyklin auf die Ca^{2+} -induzierte Schwellung von Lebermitochondrien | 46 |
| Abb. 3.13: | Modulation der Ca^{2+} -induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus isolierten Lebermitochondrien durch Minozyklin | 47 |
| Abb. 3.14: | Fluorometrische Bestimmung von Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität - Versuchsprinzip | 48 |
| Abb. 3.15: | Effekt einer Minozyklin-Behandlung auf das Membranpotential von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium | 49 |
| Abb. 3.16: | Einfluss von Minozyklin auf die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium | 50 |

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 3.17: | Wechselwirkung von Minozyklin und Ca^{2+} -Ionen auf das Membranpotential und die Ca^{2+} -Homöostase von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium | 51 |
| Abb. 3.18: | Vergleich von Minozyklin- und Ca^{2+} -induzierter Schwellung und Wirksamkeit verschiedener mPTP-Inhibitoren | 52 |
| Abb. 3.19: | Vergleich der Phosphatabhängigkeit von Minozyklin- und Ca^{2+} -induzierter Schwellung von Lebermitochondrien | 53 |
| Abb. 3.20: | Einfluss verschiedener Antibiotika auf das Schwellungsverhalten isolierter Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium | 54 |
| Abb. 3.21: | Cytochrom c-Freisetzung durch Ca^{2+} -Ionen und Minozyklin in KCl-basiertem Medium | 55 |
| Abb. 3.22: | Effekt von Minozyklin auf die MTT-Reduktion isolierter Lebermitochondrien in KCl- und Saccharose-basiertem Medium | 55 |
| Abb. 3.23: | Einfluss von Minozyklin auf das Membranpotential von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium | 56 |
| Abb. 3.24: | Effekt von Minozyklin auf die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium | 57 |
| Abb. 3.25: | Einfluss von Minozyklin auf das Schwellungsverhalten von Lebermitochondrien in modifiziertem Saccharose-basierten Medium | 58 |
| Abb. 3.26: | Abhängigkeit der Minozyklin-induzierten Schwellung von der Ionenzusammensetzung des Mediums | 59 |
| Abb. 3.27: | Einfluss von Minozyklin auf die intramitochondriale Mg^{2+} -Konzentration in KCl-basiertem Medium | 60 |
| Abb. 3.28: | Einfluss von Minozyklin auf die intramitochondriale Mg^{2+} -Konzentration in Saccharose-basiertem Medium | 61 |
| Abb. 3.29: | Einfluss von Tetracyclin auf die intramitochondriale Mg^{2+} -Konzentration von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium | 61 |
| Abb. 3.30: | Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration im Medium auf die Minozyklin-induzierte Schwellung und Depolarisation von Rattenlebermitochondrien | 62 |
| Abb. 3.31: | Einfluss einer Blockade von mitochondrialem K^+ -Uniporter bzw. des IMAC auf die Minozyklin-induzierte Schwellung von Lebermitochondrien | 63 |
| Abb. 3.32: | Einfluss einer Inhibierung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanals auf die Minozyklin-induzierte Schwellung | 64 |
| Abb. 3.33: | Schwellungsverhalten isolierter Rattenhirnmitochondrien in KCl-basiertem Medium | 65 |
| Abb. 3.34: | Wirkung von Minozyklin auf das Schwellungsverhalten isolierter Hirnmitochondrien in KCl-basiertem Medium | 65 |

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 3.35: | Messung von Ca^{2+} -Aufnahmekapazität und Membranpotential an Hirnmitochondrien | 66 |
| Abb. 3.36: | Effekt von Minozyklin auf die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität und das Membranpotential isolierter Hirnmitochondrien in KCl- und Saccharose-basiertem Medium | 67 |
| Abb. 4.1: | Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien | 81 |

1 EINLEITUNG

Neurodegenerative Erkrankungen sind meist sporadisch auftretende, langsam fortschreitende Erkrankungen des Nervensystems, die durch den progressiven Verlust von Nervenzellen gekennzeichnet sind. Damit einhergehend kommt es zunehmend zu neurologischen Funktionsausfällen, wie Gedächtnisproblemen, Sprach- oder Bewegungsstörungen (siehe Übersichtsartikel in Martin, 1999). Typischerweise nimmt die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit dem Alter exponentiell zu. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung sowie des wachsenden Anteils älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung muss daher davon ausgegangen werden, dass sich die Anzahl der Betroffenen in den nächsten Jahrzehnten drastisch erhöhen wird. Aus diesem Grund sind die Erforschung und Entwicklung therapeutischer Maßnahmen nicht zuletzt auch von besonderer sozialmedizinischer Relevanz.

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Zu den bekanntesten neurodegenerativen Störungen zählen die chronisch progressiv verlaufenden Krankheiten Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und die amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Aber auch durch eine vorübergehende, mangelhafte Sauerstoffversorgung des Gehirns, wie sie bei einem Schlaganfall auftritt, können neurodegenerative Prozesse in Gang gesetzt werden.

Die häufigste neurodegenerative Erkrankung, Morbus Alzheimer, wurde vor rund 100 Jahren erstmals von dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Leitsymptome der Erkrankung sind vor allem Gedächtnisverlust, zeitliche und örtliche Desorientierung sowie Sprachstörungen. Die Krankheit verschlimmert sich fortschreitend und führt nach mehr oder weniger vollständigem Verlust von Gedächtnis, Körperkontrolle und schließlich auch der Persönlichkeit zum Tod. Schätzungen zufolge leiden in Europa 0,9 % der 60-64-Jährigen, 6,0 % der 75-79-Jährigen und 24,8 % der über 85-Jährigen an Morbus Alzheimer (Ferri et al., 2005). In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten derzeit auf 650000 geschätzt (Bickel, 2001). Therapie und Pflege der Betroffenen sind äußerst kostenintensiv. So werden für die Betreuung eines einzelnen Alzheimer-Patienten jährlich etwa 45000 € benötigt (Hallauer et al., 2000). Entsprechend belaufen sich die allein durch die Alzheimersche Erkrankung verursachten volkswirtschaftlichen Kosten auf knapp 30 Milliarden € pro Jahr.

Angesichts solcher Zahlen wird deutlich, dass die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen tatsächlich von enormer gesundheitspolitischer und sozialökonomischer Be-

deutung ist. Neben diesen finanziellen Aspekten sind aber auch die extremen psychischen Belastungen von Angehörigen und Betreuern der betroffenen Patienten zu berücksichtigen. Entsprechend intensiv verläuft die Suche nach Strategien, mit deren Hilfe die Pathogenese der Krankheiten verlangsamt oder sogar aufgehalten werden kann. Bisher stehen jedoch nur begrenzte Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. So können Defizite im Neurotransmitter-Haushalt, wie sie bei Morbus Alzheimer (Acetylcholin) und Morbus Parkinson (Dopamin) auftreten, durch Hemmung Transmitter-abbauender Enzyme (Acetylcholin-Esterase) oder Gabe von Transmitter-Vorstufen (Levodopa) teilweise ausgeglichen werden. Dies kann die Krankheitssymptome mindern, das Fortschreiten der Erkrankung jedoch nicht abwenden (Cavalli et al., 2008).

Als Kausaltherapie erwogen wird beispielsweise der Ersatz verloren gegangener Zellpopulationen mittels Stammzellen. Bereits Ende der 70er Jahre gelang es erstmals, Stammzellen aus dem ventralen Mesenzephalon von Rattenembryonen in das Striatum adulter Tiere zu transplantieren, wo sie die Funktion der aufgrund einer experimentellen 6-Hydroxy-Dopamin-Behandlung abgestorbenen Zellen übernahmen (Bjorklund und Steenevi, 1979). Auch in klinischen Studien an Parkinson-Patienten gibt es bereits ermutigende Resultate mit transplantierten Stammzellen (Freed et al., 2001). Aufgrund der mit der Gewinnung embryonaler Stammzellen verbundenen ethischen Probleme bietet sich diese Form der Behandlung jedoch nicht als Standardtherapie an. Um die moralischen Streitfragen zu umgehen, wird in letzter Zeit die Forschung an adulten Stammzellen verstärkt. Diese können beispielweise aus dem Knochenmark entnommen und *in vitro* in neuronale Phänotypen transdifferenziert werden (Chen et al., 2006).

Die Behandlung mit Stammzellen zielt darauf ab, verloren gegangene Zellpopulationen in bestimmten Regionen zu ersetzen. Diese Strategie hilft jedoch nicht, wenn sich der Schaden über einen großen Bereich des Gehirns erstreckt, wie dies beispielsweise bei fortgeschrittenem Morbus Alzheimer der Fall ist. Alternativ wird daher nach Möglichkeiten gesucht, bereits das Absterben der Zellen zu verhindern. Der Zelltod wird bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington, durch die übermäßige Produktion und anschließende Aggregation körpereigener Proteine ausgelöst (siehe Übersichtsartikel in Irvine et al., 2008). Gelingt es also, die Bildung dieser Proteine zu verringern bzw. ihren Abbau zu beschleunigen, könnte dadurch der Krankheitsverlauf aufgehalten werden. Tatsächlich wurden in einem Tiermodell der Alzheimerschen Erkrankung durch Impfung gegen das ursächlich an der Pathogenese beteiligte Peptid β -Amyloid ($A\beta$) gute Erfolge erzielt (Schenk et al., 1999; Mouri et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Biosynthese der toxischen Peptide mit-

tels RNA-Interferenz (RNAi) zu unterdrücken. Der Gruppe um Singer et al. gelang es, den Krankheitsverlauf in einem transgenen Mausmodell des Morbus Alzheimer zu verzögern, in dem sie ein für die Bildung von A β benötigtes Enzym ausschalteten (2005). Auch in Tiermodellen anderer neurodegenerativer Krankheiten zeigte die Therapie mittels RNAi protektive Effekte (siehe Übersichtsartikel in Gonzalez-Alegre und Paulson, 2007).

Der durch die toxischen Peptide oder andere Stimuli ausgelöste Zelltod kann auch durch die Blockade von Zelltodkaskaden aufgehalten werden. So geht ein Teil der absterbenden Neurone durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, zugrunde. Die an sich überlebensfähigen Zellen starten aufgrund extrinsischer oder intrinsischer Stimuli – wie die Bindung von Liganden an spezielle Todesrezeptoren oder die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien – ein Suizidprogramm, das mit der Aktivierung bestimmter Proteasen, der Caspasen, beginnt (siehe Übersichtsartikel in Taylor et al., 2008). Diese Initiatorcaspasen können ihrerseits verschiedene Effektorcaspasen aktivieren, die unter anderem Strukturproteine, wie Aktin, Keratin oder Kernlamine, DNA-Reparaturproteine wie die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase oder den DNase-Inhibitor ICAD (*inhibitor of caspase-activated desoxyribonuclease*) proteolytisch spalten und damit die zelluläre Destruktion einleiten. Die für die Funktion mehrzelliger Organismen essentielle Apoptose wird bei einigen Erkrankungen übermäßig aktiviert und trägt dadurch zum Verlust von Nervenzellen bei (Kermer et al., 2004). Entsprechend können Substanzen, die die apoptotische Signalkaskade blockieren, neuroprotektiv wirken. In einem Mausmodell des Morbus Huntington konnte nachgewiesen werden, dass der Caspase-Hemmstoff Carbobenzoxy-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon (zVAD-fmk) den Krankheitsverlauf verlangsamt (Ona et al., 1999). Auch nach einem ischämischen Insult konnte das Infarktvolume durch zVAD-fmk signifikant verringert werden (Yap et al., 2008). Die Blockade der Caspasen 2, 3 und 6 schützt zudem vor A β -induziertem Zelltod (Allen et al., 2001).

Wenngleich in Tiermodellen zahlreiche Strategien zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen erfolgreich waren, so stehen diesen Erfolgen jedoch kaum Fortschritte in der Therapie erkrankter Menschen gegenüber. Während bei Methoden, die an dem Phänomen der RNAi ansetzen, gerade erst begonnen wird, ihre klinische Verträglichkeit an Probanden zu testen (DeVincenzo et al., 2008), gibt es gegen andere Behandlungsstrategien – wie die Transplantation embryonaler oder gar fetaler humaner Stammzellen – schwerwiegende ethische Einwände. Klinische Studien mit Substanzen, die den Zelltod im Tierversuch verhindern konnten, blieben bislang erfolglos (Faden und Stoica, 2007). Zudem wurden in klinischen Versuchen zum Teil schwere Nebenwirkungen beobachtet, die anhand der präklinischen Ergebnisse nicht abzusehen waren. So mussten erste klinische Einsätze einer

Immuntherapie gegen den Morbus Alzheimer aufgrund auftretender Hirnhautentzündungen abgebrochen werden (Orgogozo et al., 2003; Gilman et al., 2005). Solche Rückschläge verursachen hohe Kosten und einen enormen Verwaltungsaufwand. Zunehmend werden daher bereits zugelassene Arzneimittel auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung untersucht. Als eines der erfolgsversprechendsten Präparate erwies sich dabei das semisynthetische Tetracyclin-Derivat Minozyklin (MC).

MC wird seit mehreren Jahrzehnten als Antibiotikum zur Behandlung von Akne vulgaris sowie rheumatoider Arthritis eingesetzt (Blum et al., 2004). Es ist im Normalfall gut verträglich (Goulden et al., 1996), nur sehr selten treten schwerwiegende Nebenwirkungen wie eine autoimmune Hepatitis oder Lupus erythematodes auf (Gough et al., 1996). MC kann aufgrund seiner geringen Größe und der ausgeprägten Lipophilie zudem die Blut-Hirn-Schranke passieren (Macdonald et al., 1973) und ist somit für die Behandlung von Krankheiten des zentralen Nervensystems gut geeignet .

1.2 Minozyklin und Neuroprotektion

Den ersten Hinweis darauf, dass MC neben seiner antibiotischen Wirkung auch neuroprotektive Eigenschaften besitzt, ergab eine Studie von Yrjanheikki et al., in der nachgewiesen werden konnte, dass die Behandlung von Wüstenrennmäusen (Gerbils) mit MC gegen Ischämie-induzierten Zelltod schützt (1998). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte später zeigen, dass MC das Infarktvolume selbst dann signifikant reduziert, wenn die Behandlung erst 4 h nach dem Infarkt gestartet wird (Yrjanheikki et al., 1999). Dieses breite therapeutische Zeitfenster macht MC für eventuelle klinische Anwendungen besonders interessant.

In den folgenden Jahren wurde das protektive Potential von MC an einer Vielzahl weiterer Erkrankungen des zentralen Nervensystems untersucht. So berichteten Chen et al., dass MC den Krankheitsverlauf in einem Mausmodell der Chorea Huntington verlangsamt (2000). Die Behandlung mit MC führte bei den verwendeten R6/2-Mäusen, die ein Huntingtin-Gen mit 144 CAG-Triplett-Wiederholungen exprimieren (Mangiarini et al., 1996), zu einer deutlich höheren Überlebenszeit. Zudem traten die ersten Symptome später auf und die motorischen Fähigkeiten blieben länger erhalten. Auch in einem Parkinson-Modell konnten protektive Effekte von MC beobachtet werden (He et al., 2001). Hierbei verringerte die Behandlung mit MC den Verlust an dopaminergen (Tyrosinhydroxylase-positiven) Zellen nach Injektion von 6-Hydroxy-Dopamin in das Striatum. Des Weiteren konnte der protektive Effekt von MC auch in Tiermodellen der amyotrophen

Lateralsklerose (ALS, Zhu et al., 2002) sowie der multiplen Sklerose (Brundula et al., 2002) bestätigt werden.

Die hier aufgeführten, vielversprechenden Ergebnisse tierexperimenteller Arbeiten führten dazu, dass MC zunehmend auch in klinischen Studien eingesetzt wurde. Donovan-Wright et al. behandelten bereits 2002 eine einzelne, an fortgeschrittener Chorea Huntington erkrankte Patientin mit MC, wodurch eine deutliche Verbesserung der motorischen und kognitiven Fähigkeiten erreicht werden konnte (2002). Eine nachfolgende Studie an 14 Patienten kam zu ähnlichen Resultaten (Bonelli et al., 2004). In dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Symptomatik durch MC-Gabe über einen Zeitraum von 2 Jahren stabilisiert werden kann. Auch nach einem Schlaganfall erwies sich die Behandlung mit MC als günstig (Lampl et al., 2007). Die klinische Wirksamkeit von MC wurde zudem an ALS-Patienten getestet. Jedoch zeigte sich in einer Phase III-Studie an über 400 Patienten, dass MC den Krankheitsverlauf beschleunigt und die Mortalität erhöht (Gordon et al., 2007).

Auch in tierexperimentellen Arbeiten ist die schützende Wirkung von MC nicht unumstritten (siehe Übersichtsartikel in Diguët et al., 2004). So konnte der oben beschriebene protektive Effekt von MC im R6/2-Modell der Chorea Huntington (Mangiarini et al., 1996) von einer anderen Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden (Smith et al., 2003). In einem *in vitro*-Modell der Krankheit vermochte MC den Zelltod ebenfalls nicht zu inhibieren (Fernandez-Gomez et al., 2005). Yang et al. stellten sogar fest, dass MC die toxische Wirkung von 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) gegenüber dopaminergen Neuronen verstärkt, indem es die Wiederaufnahme von Dopamin in Vesikel hemmt (2003). Auch Diguët et al. (2004) beobachteten schädliche Effekte von MC an Tiermodellen der Chorea Huntington (Behandlung mit 3-Nitropropionsäure) sowie des Morbus Parkinson (Behandlung mit MPTP). Zudem ergab eine Studie an neugeborenen Mäusen, dass MC den durch Hypoxie/Ischämie verursachten Schaden vergrößert (Tsuji et al., 2004).

Die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Effekte von MC auf Neurotoxizitätsmodelle sind also durchaus kontrovers. Aus diesem Grunde ist die genaue Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen von besonderer Bedeutung.

1.2.1 Wirkmechanismen von Minozyklin

Auf welche Weise MC seine protektiven Effekte entfaltet, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Als gesichert kann gelten, dass ein Teil der schützenden Wirkung von MC auf sei-

ne anti-inflammatorischen Eigenschaften zurückzuführen ist (Jordan et al., 2007). Die pathologische Aktivierung von Mikroglia, speziellen Immunzellen des zentralen Nervensystems, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (siehe Übersichtsartikel in Rock und Peterson, 2006). Aktivierte Mikrogliazellen können eine Reihe pro-inflammatorischer Moleküle wie Interleukin-1 β oder *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) freisetzen (Garden und Moller, 2006) und auf diese Weise Zellen schädigen. In einer Vielzahl von Studien wurde beobachtet, dass MC die Proliferation der Mikroglia und ihre Aktivierung inhibiert (Yrjanheikki et al., 1998; Bye et al., 2007; Fan et al., 2007) und somit die Freisetzung toxischer Substanzen wie TNF- α und Interleukin-6 (Familiari et al., 2006) verhindert. MC blockiert außerdem sowohl die Expressierung (Brundula et al., 2002) als auch die Aktivität (Yao et al., 2004) von Matrix-Metalloproteasen (MMPs). MMPs sind Enzyme der extrazellulären Matrix, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielen (Parks et al., 2004).

Auch die anti-oxidativen Eigenschaften des MC sind unbestritten. Freie Radikale, wie reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (*reactive oxygen/nitrogen species*, ROS/RNS), können Proteine (Stadtman und Levine, 2000), Lipide (Rubbo et al., 1994) sowie DNA (Richter et al., 1988) schädigen. So reagiert das Superoxidradikal mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (Radi et al., 2002), das unter anderem sämtliche Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (Radi et al., 1994) sowie die Mangan-Superoxiddismutase (Yamakura et al., 1998) durch Oxidation und Nitrierung inhibieren kann. In zellfreien Systemen zeigt MC eine ähnliche Wirksamkeit als Radikalfänger wie α -Tocopherol (Vitamin E, Kraus et al., 2005). Wie Letzteres besitzt auch MC einen substituierten Phenolring (Abb. 1.1a), der freie Radikale einfangen kann, wobei ein resonanzstabilisiertes Phenolradikal entsteht (Abb. 1.1b). Entsprechend konnten zahlreiche Studien eine protektive Wirkung von MC gegenüber ROS- bzw. RNS-induziertem Zelltod feststellen (Lin et al., 2001; Zhu et al., 2002; Lin et al., 2003).

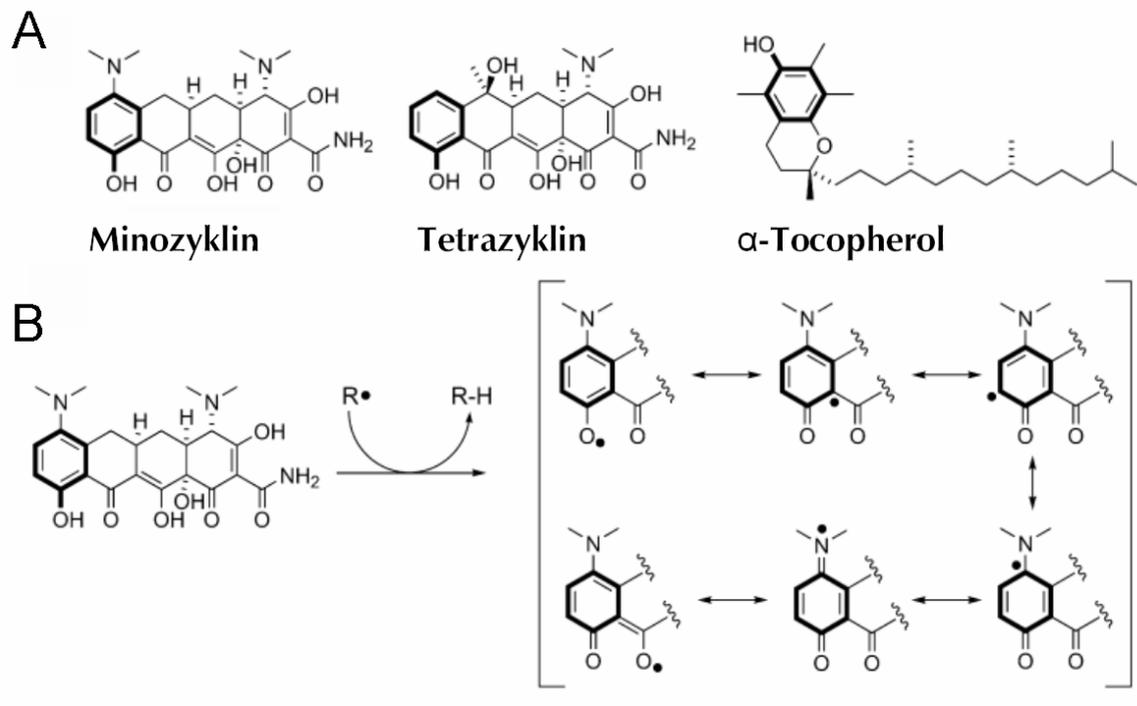


Abb. 1.1: Strukturformel und Radikalfängereigenschaften von Minozyklin

(A) Strukturformeln von Minozyklin, Tetrazyklin und α -Tocopherol. Minozyklin unterscheidet sich von Tetrazyklin in einer zusätzlichen Dimethylaminogruppe am Phenolring. (B) Diese sorgt nach Reaktion mit einem freien Radikal für zusätzliche Resonanzstabilisierung des entstehenden Phenolradikals (Abbildung modifiziert aus Kraus et al., 2005).

Neben dieser direkten anti-oxidativen Wirkung inhibiert MC auch enzymatische Prozesse innerhalb der Zelle, die zur ROS/RNS-Bildung führen. So kann MC die Expressierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) herabsetzen (Amin et al., 1996) und damit eine verringerte Bildung des Stickoxidradikals bewirken (Tikka et al., 2001). Außerdem ist bekannt, dass MC die Superoxid-Bildung an der NADPH-Oxidase blockiert (Choi et al., 2005).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien deuten ferner darauf hin, dass MC anti-apoptotisch wirkt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass MC die Aktivierung der Caspase 3 in verschiedenen Tiermodellen inhibiert (Chen et al., 2000; Wang et al., 2003; Scarabelli et al., 2004; Festoff et al., 2006). Hierbei hemmt MC nicht die Enzymaktivität selbst (Chen et al., 2000), sondern verhindert stattdessen die Inangangsetzung der apoptotischen Signalkaskade, indem es die Translokation von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol blockiert (Zhu et al., 2002; Wang et al., 2004). Die Freisetzung anderer pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien wie AIF (*apoptosis inducing factor*) oder Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) kann durch Behandlung mit MC ebenfalls inhibiert werden (Wang et al., 2003). MC erhöht außerdem die Expressierung von *inhibitor of apoptosis* (IAP)-

Proteinen (Scarabelli et al., 2004), deren Wirkung in der Blockade von Caspasen besteht (Liston et al., 2003).

Auch die Exprimierung von Proteinen der Bcl-2-Familie wird durch MC reguliert. Bcl-2-Proteine sind wichtige Regulatoren von Zelltodprozessen (Youle und Strasser, 2008) und spielen eine besonders wichtige Rolle bei der mitochondrial vermittelten Apoptose. Sie können dabei sowohl pro- (Bax, Bak) als auch anti-apoptotisch (Bcl-2, Bcl-x_L) wirken. Die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine bilden Poren innerhalb der äußeren mitochondrialen Membran aus (Antonsson et al., 1997) und vermögen auf diese Weise, die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren in das Zytosol zu bewirken (De Giorgi et al., 2002). Bcl-2 und Bcl-x_L verhindern diesen Effekt (Antonsson et al., 1997). Von MC ist bekannt, dass es die Bildung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Wang et al., 2004; Filipovic und Zecevic, 2008) verstärkt. Zudem konnte gezeigt werden, dass MC seine protektive Wirkung verliert, wenn die Bcl-2-Exprimierung durch Anwendung von *Antisense*-Nukleotiden blockiert wird (Wang et al., 2004). MC verhindert außerdem die Steigerung der Bax-Exprimierung nach Ischämie (Kelly et al., 2004) und Sauerstoff-Glukose-Entzug (Keilhoff et al., 2008).

1.2.2 Blockade der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore durch Minozyklin

Neben den bisher genannten Wirkmechanismen von MC rückte in den letzten Jahren zunehmend seine Wirkung auf die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) in den Blickpunkt der Forschung. Die Öffnung dieser Megapore bewirkt einen drastischen Anstieg der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran (IMM) für Ionen und Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1,5 kDa (Hunter et al., 1976). Dieser Vorgang wird als Permeabilitätstransition (PT) bezeichnet. Infolge der PT bricht der Protonengradient über der IMM zusammen, wodurch die Triebkraft für die mitochondriale ATP-Synthese entfällt. Der ATP-Mangel führt wegen des Ausfalls verschiedener Ionentransporter zum Verlust der Ionenhomöostase der Zelle, es kommt schließlich zur Nekrose (Crompton, 1999). Zudem bewirkt die Öffnung der mPTP ein Anschwellen der Mitochondrien sowie die Freisetzung verschiedener pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c in das Zytosol (Crompton, 1999). Bei Aufrechterhaltung der zellulären ATP-Konzentration kann eine Aktivierung der mPTP daher auch den apoptotischen Zelltod induzieren. Über den genauen Mechanismus der Translokation von Cytochrom c existieren verschiedene Hypothesen (Gogvadze et al., 2006). So ist bekannt, dass die Aktivierung der mPTP zu einem Anschwellen der Mitochondrien (Gunter und Pfeiffer, 1990) führt, wo-

durch es zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondrial membrane*, OMM) kommen kann (Feldmann et al., 2000). Dies ermöglicht den Austritt proapoptotischer Proteine und so auch von Cytochrom c, das aufgrund seiner Größe von etwa 12 kDa die OMM normalerweise nicht passieren kann (Mayer und Oberbauer, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Öffnung der mPTP zur Translokation des proapoptotischen Proteins Bax in die OMM führt, wo es multimere Komplexe bildet, durch die das Cytochrom c den Intermembranraum verlassen kann (De Giorgi et al., 2002). Daraufhin bildet sich im Zytosol ein Proteinkomplex aus dem freigesetzten Cytochrom c, ATP und Procaspase 9, das sogenannte Apoptosom. In diesem Komplex wird die Procaspase 9 autokatalytisch gespalten; die apoptotische Signalkaskade beginnt.

Der molekulare Aufbau der mPTP bleibt umstritten. Man geht jedoch zumeist davon aus, dass die mPTP aus drei Hauptkomponenten besteht (Rasola und Bernardi, 2007): dem Porin (*voltage dependent anion channel*, VDAC) der OMM, dem Adeninnukleotidtransporter (ANT) der IMM und dem Matrixprotein Cyclophilin D (CypD; Abb. 1.2). Entsprechend können Interaktionspartner dieser Proteine, wie Ro 68-3400 (VDAC, Cesura et al., 2003), Bongkrekensäure (ANT, Le Quoc und Le Quoc, 1988) sowie Cyclosporin A (CsA, bindet an CypD, Crompton et al., 1988), die Öffnung der mPTP inhibieren. Weitere Proteine, die als mPTP-Komponenten diskutiert werden, sind das zytosolische Enzym Hexokinase und die mitochondriale Kreatinkinase (mtCK, Beutner et al., 1998), mehrere Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax und Bcl-2 selbst (Brenner et al., 2000) sowie der mitochondriale Phosphatcarrier (Leung und Halestrap, 2008).

Der wichtigste Trigger für die Öffnung der mPTP ist eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration (Hunter et al., 1976). Die Sensitivität der Pore für Kalzium wird jedoch von einer Vielzahl weiterer Faktoren reguliert. So ist für die Induktion der PT die Anwesenheit von anorganischem Phosphat essentiell und mit erhöhter Phosphatkonzentration steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit der Pore (Al-Nasser und Crompton, 1986). Oxidativer Stress wurde in zahlreichen Studien ebenfalls als Auslöser für die PT nachgewiesen (Kowaltowski et al., 2001). Substanzen wie Phenylarsenoxid, die Thiolgruppen von Proteinen oxidieren können, induzieren die Öffnung der mPTP (Lenartowicz et al., 1991), während verschiedene Anti-Oxidantien, beispielsweise Melatonin (Andrabi et al., 2004), die mPTP inhibieren. Eine Studie von Costantini et al. ergab, dass die Oxidation eines kritischen Cysteinrestes des ANT die Porenöffnung induziert (2000). Es wird daher vermutet, dass dieser für die Modulierbarkeit der mPTP durch oxidativen Stress verantwortlich ist (Halestrap et al., 1997). Ein weiterer Faktor, der die mPTP-Öffnung fördert, ist die Depolarisation der Mitochondrien (Bernardi, 1992). Inhibiert wird die mPTP durch ei-

nen niedrigen pH-Wert (Halestrap, 1991), möglicherweise aufgrund einer Blockade der Interaktion verschiedener mPTP-Komponenten (Nicolli et al., 1996).

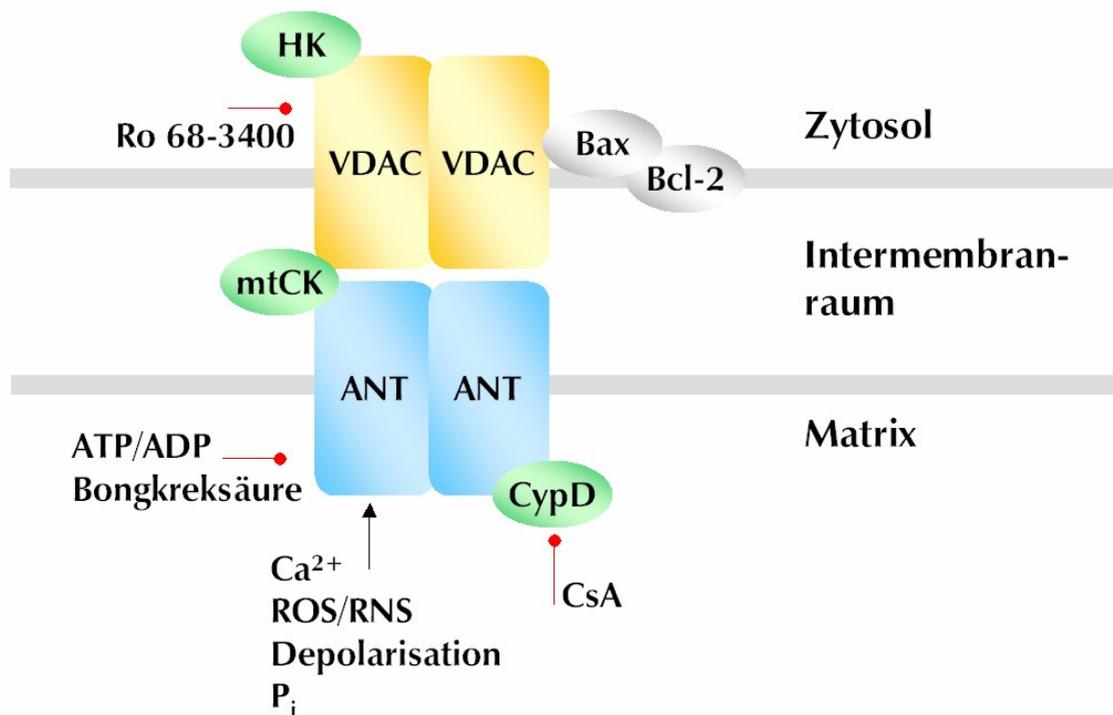


Abb. 1.2: Molekularer Aufbau der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore

Hauptkomponenten der mPTP sind der *voltage dependent anion channel* (VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran, der Adeninnukleotidtransporter (ANT) der inneren Mitochondrienmembran sowie das lösliche Matrixprotein Cyclophilin D (CypD), das Isomerase-Aktivität besitzt. Bindungspartner dieser Proteine, wie Ro 68-3400 (VDAC), Adeninnukleotide und Bongkreksäure (ANT) sowie Cyclosporin A (CypD), hemmen die Öffnung der mPTP. Ca^{2+} -Ionen, oxidativer/nitrosativer Stress, anorganisches Phosphat sowie ein geringes mitochondriales Membranpotential hingegen fördern die Porenöffnung. Weitere Proteine, die als mPTP-Komponenten diskutiert werden, sind das zytosolische Enzym Hexokinase (HK) und die mitochondriale Kreatinkinase (mtCK) sowie mehrere Mitglieder der Bcl-2-Familie.

Zhu et al. waren die Ersten, die die protektive Wirkung von MC seiner Eigenschaft als Inhibitor der mPTP zuschrieben (2002). Sie zeigten an isolierten Leber- und Hirnmitochondrien, dass MC, ähnlich wie CsA, die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung inhibiert. Die Behandlung mit MC verringerte außerdem signifikant die Cytochrom c-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung im Rückenmark transgener ALS-Mäuse, was mit einer deutlichen Verzögerung des Krankheitsverlaufes einherging. Im Folgenden konnte nachgewiesen werden, dass MC den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in Huntingtin-exprimierenden ST14A-Zellen (Wang et al., 2003) inhibiert. Denselben Effekt zeigte MC in Cybridzellen mit defektem Komplex I (Modell der Leberschen Optikusatrophie), deren zytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch Behandlung mit Thapsigargin (inhibiert die Ca^{2+} -Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum; ER) erhöht worden war (Haroon et al., 2007). MC konnte die zudem die Cytochrom c-

Freisetzung Schwann'scher Zellen nach Sauerstoff-Glukose-Entzug verhindern (Keilhoff et al., 2008). Weitere Studien bestätigten an isolierten Mitochondrien den inhibierenden Effekt von MC auf die Ca^{2+} -induzierte Schwellung (Fernandez-Gomez et al., 2005; Fuks et al., 2005; Theruvath et al., 2008). In diesen Studien wurde jedoch auch festgestellt, dass MC den Ca^{2+} -induzierten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nicht verhindern kann (Fuks et al., 2005), sondern selbst depolarisierend wirkt (Fernandez-Gomez et al., 2005) und die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme blockiert (Theruvath et al., 2008). Aufgrund dieser und eigener Ergebnisse stellten Månsson et al. die Hypothese auf, dass die beobachtete Inhibierung der Ca^{2+} -induzierten mitochondrialen Schwellung durch MC lediglich auf einer Blockade der Ca^{2+} -Aufnahme beruht und nicht auf eine inhibitorische Wirkung auf die mPTP zurückzuführen ist (2007). Zudem berichteten sie, ähnlich wie Cornet et al. (2004), dass MC selbst eine mitochondriale Schwellung verursachen kann. Aus den angegebenen Gründen gilt die Rolle der mPTP bei der neuroprotektiven Wirkung von MC weiterhin als umstritten.

1.2.3 Minozyklin bei Morbus Alzheimer

MC wurde auch in Modellen des Morbus Alzheimer auf potentiell schützende Eigenschaften getestet. Zunächst war festgestellt worden, dass MC den neuronalen Zelltod nach Applikation von A β in den Hippokampus von Ratten signifikant verringert (Ryu et al., 2004). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte später zeigen, dass MC die A β -induzierte ROS-Bildung und Schädigung der Blut-Hirn-Schranke inhibieren kann (Ryu und McLarnon, 2006). Auch in einem transgenen Mausmodell der Alzheimerschen Erkrankung wirkte MC protektiv (Seabrook et al., 2006; Choi et al., 2007; Fan et al., 2007). Mit MC behandelte Tiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verbesserte kognitive Leistungen. Es stellte sich zudem heraus, dass MC die durch A β verursachte Aktivierung von Mikroglia sowohl *in vivo* (Fan et al., 2007) als auch *in vitro* (Famalian et al., 2006) hemmen kann.

Die protektiven Effekte des MC wurden in den zitierten Studien vor allem seiner anti-inflammatorischen Wirkung zugeschrieben. Kürzlich konnten jedoch Choi et al. zeigen, dass MC neuronal differenzierte PC12-Zellen vor A β -induziertem Zelltod schützt (2007). Unter anderem blockierte MC die Aktivierung der Caspase 12. Diese Daten deuten darauf hin, dass MC Zelltodprozesse auch auf zellulärer Ebene, d.h. unabhängig von seiner inhibierenden Wirkung auf Mikroglia, aufhalten kann.

A β , ein etwa 4 kDa schweres Peptid, ist Hauptbestandteil der charakteristischen extrazellulären Proteinablagerungen (senilen Plaques), die in Gehirnen von Alzheimer-Patienten

zu finden sind. Es wird durch Spaltung eines Vorläuferproteins, des *amyloid precursor proteins* (APP), gebildet (siehe Übersichtsartikel in Swerdlow, 2007). Die physiologische Funktion dieses auf Chromosom 21 codierten Transmembranproteins (Kang et al., 1987) ist bis heute nicht geklärt. Die Lebenserwartung von APP-knockout-Mäusen ist im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht eingeschränkt, jedoch treten im Erwachsenenalter eine zerebrale Gliose sowie lokomotorische Störungen auf (Zheng et al., 1995). Bekannt ist außerdem, dass APP in der Lage ist, die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} zu katalysieren (Multhaup et al., 1996). Es wird daher vermutet, dass APP eine Rolle im physiologischen Metallionentransport spielt (Maynard et al., 2005). Außerdem interagiert APP mit dem Kollagen der extrazellulären Matrix (Beyreuther et al., 1996) und ist somit an der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt (Ghiso et al., 1992).

APP kann auf zwei Wegen gespalten werden (siehe Abb. 1.3). Die α -Sekretase, eine Metalloprotease der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain*)-Familie, spaltet das Protein inmitten der A β -Sequenz, so dass die Bildung des toxischen A β verhindert wird (nicht-amyloidogener Weg, Esch et al., 1990). Stattdessen entsteht lösliches sAPP α , das neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Mattson et al., 1993). Das C-terminale Fragment (CTF α) verbleibt in der Membran, wo es durch die γ -Sekretase nochmals geschnitten werden kann. Die γ -Sekretase-Aktivität wird dabei von einem Proteinkomplex vermittelt, der unter anderem zwei Präseniline (PS1, PS2) enthält (Edbauer et al., 2003). Auf dem amyloidogenen Spaltungsweg wird das APP im ersten Schritt durch die β -Sekretase, eine Aspartyl-Protease namens BACE1 (*β -site APP converting enzyme*), gespalten. Es bilden sich zunächst lösliches sAPP β sowie das membrangebundene CTF β . Aus letzterem entsteht durch Wirkung der γ -Sekretase das A β -Peptid sowie das membrangebundene AICD (*amyloid precursor protein intracellular domain*)-Fragment. Die Länge des gebildeten A β kann dabei zwischen 38 und 43 Aminosäuren variieren (Swerdlow, 2007).

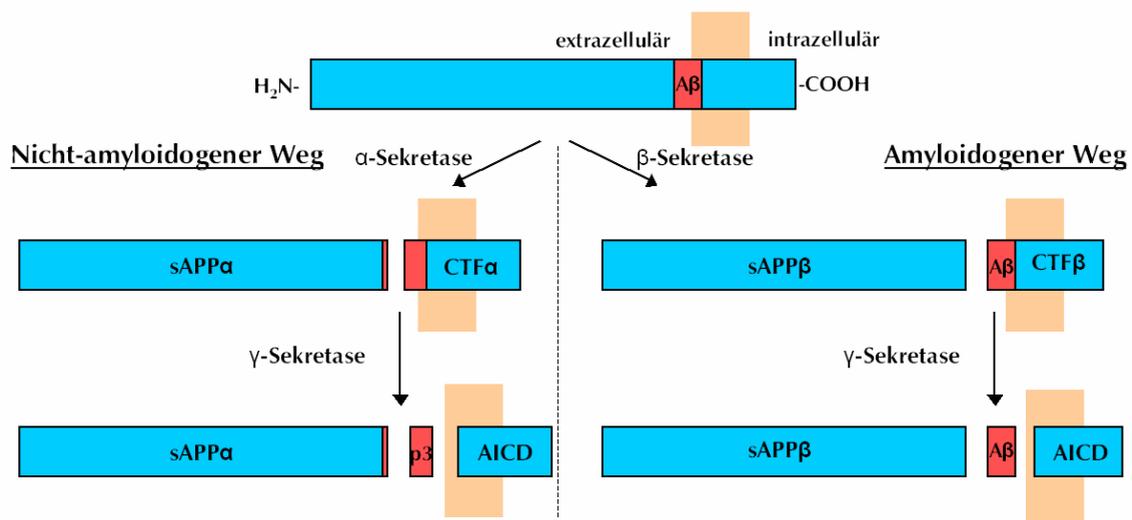


Abb. 1.3: Processing des Amyloid-Precursor-Proteins

APP, das Vorläuferprotein des A β , kann auf zwei Wegen gespalten werden. Die α -Sekretase schneidet das Protein mitten in der A β -Sequenz, somit wird die Bildung von A β verhindert (nicht amyloidegener Weg). Es entsteht lösliches sAPP α , das neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Erfolgt der erste Spaltungsschritt hingegen durch die β -Sekretase (amyloidegener Weg), so bildet sich ein membran-gebundenes C-terminales Fragment, aus dem durch Wirkung der γ -Sekretase das 4 kDa schwere Peptid A β entsteht.

Von mehreren Mutationen der Gene für APP, PS1 und PS2 ist bekannt, dass sie in den Genträgern einen frühen Ausbruch der Krankheit bewirken. So kommt es aufgrund verschiedener Defekte im APP-Gen zur verstärkten Bildung von langkettigem A β (A β 1-42/43), das eine erhöhte Neigung zur Aggregation aufweist (Irie et al., 2005). Die meisten erblichen Alzheimer-Fälle lassen sich jedoch auf eine Mutation in den Genen für PS1 oder PS2 auf Chromosom 14 bzw. 1 (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995) zurückführen. Defekte in einem dieser beiden Proteine führen zur aggressivsten Form der Alzheimer-Krankheit, die sich schon im Alter von 40 Jahren oder früher manifestieren kann (Lleo et al., 2004). Auch bei dreifach vorhandenem Chromosom 21 (Trisomie 21, Down-Syndrom), kommt es – bedingt durch die übermäßige Expressierung von APP – zu einer vermehrten Bildung von A β , was häufig einen frühen Krankheitsausbruch nach sich zieht (Wisniewski et al., 1978).

1.2.4 Die Rolle der Permeabilitätstransitionspore bei Morbus Alzheimer

Die erwähnten genetischen Defekte unterstützen die Hypothese, dass eine vermehrte Bildung von A β ursächlich an der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt ist (Hardy und Higgins, 1992). Seit langem ist bekannt, dass A β toxische Effekte auf Neurone in Kultur (Cotman et al., 1992) und *in vivo* (Kowall et al., 1992) ausübt, wobei die Aminosäuresequenz 25 bis 35 von besonderer Bedeutung ist (Pike et al., 1995). Der genaue Me-

chanismus der A β -Neurotoxizität ist bisher nicht abschließend aufgeklärt. Man weiß jedoch, dass mehrere Effekte des A β auf die Zelle im Allgemeinen und Mitochondrien im Besonderen die Öffnung der mPTP begünstigen.

So ist belegt, dass A β oxidativen Stress auf Zellen ausübt (siehe Übersichtsartikel in Reddy, 2006). Das Peptid induziert die Bildung von H₂O₂ (Huang et al., 1999) und bewirkt auch die Entstehung weiterer ROS wie auch von RNS in der Mikroglia (Meda et al., 1995; Van Muiswinkel et al., 1996). Anti-Oxidantien wie Vitamin E (Behl et al., 1992) und Resveratrol (Jang und Surh, 2003) schützen vor A β -induziertem Zelltod. Zudem konnten Mattson et al. bereits zu Beginn der 90er Jahre zeigen, dass die Anwesenheit von A β im Kulturmedium die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht (1992). Möglicherweise bewirkt A β die Freisetzung des Ions aus dem ER, einem intrazellulären Ca²⁺-Speicher (Ferreiro et al., 2004), was zur Aktivierung der mitochondrial vermittelten Apoptose führt (Ferreiro et al., 2008). Außerdem kann A β selbst Ca²⁺-durchlässige Ionenkanäle in der Zellmembran ausbilden (Arispe et al., 1993; Kagan et al., 2004). A β beeinflusst auch die Expression von Genen der Bcl-2-Familie. An primären humanen Neuronenkulturen konnte gezeigt werden, dass A β die Expression von Bcl-2 verhindert, während es die Synthese von Bax deutlich erhöht (Paradis et al., 1996). Zudem ergab eine Studie von Selznick et al., dass A β in Bax-defizienten Kulturen seine neurotoxische Wirkung verliert (2000). Auch durch Behandlung von Zellen mit Bcl-2 oder Bax-neutralisierenden Antikörpern lässt sich die A β -Toxizität blockieren (Zhang et al., 2002). A β kann zudem direkt in Mitochondrien akkumulieren (Fernandez-Vizarra et al., 2004; Manczak et al., 2006) und dort Enzyme des Krebszyklus wie die Pyruvatdehydrogenase sowie die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase inhibieren (Casley et al., 2002). Von Letzterer ist bekannt, dass ihre Hemmung sowohl in PC12-Zellen (Huang et al., 2003) als auch in isolierten Lebermitochondrien (Kristal et al., 2002) die Induktion der mPTP bewirkt. Hinzu kommt eine verringerte Expression verschiedener Proteine der Atmungskette in Patienten mit Morbus Alzheimer (Chandrasekaran et al., 1996; Manczak et al., 2004). An isolierten Mitochondrien konnte ferner gezeigt werden, dass A β mehrere Komplexe der mitochondrialen Atmungskette inhibiert (Canevari et al., 1999; Aleardi et al., 2005). Besonders anfällig für die Inhibierung durch A β ist dabei die Cytochrom-Oxidase (Komplex IV), jedoch werden auch die Komplexe I und III von A β blockiert (Aleardi et al., 2005). Die Hemmung der Atmungskette resultiert in einem Absinken der ATP-Synthese. Zudem begünstigt A β die durch Antimycin A getriggerte ROS-Produktion. Auch konnten die Autoren zeigen, dass A β direkt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren kann (Aleardi et al., 2005). Die Gruppe um Sirk beobachtete an differenzierten PC12-Zellen, dass A β den Pro-

teinimport in die Mitochondrien blockiert, was unter anderem zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials führt (2007).

Zusammengefasst können die genannten Eigenschaften die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP stark erhöhen. Dies lässt vermuten, dass deren Aktivierung bei der A β -vermittelten Neurotoxizität eine Rolle spielt. Tatsächlich konnten einige Studien die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung mit der Öffnung der mPTP in Verbindung bringen:

So zeigte sich, dass PC12-Zellen mit einer Mutation im PS1-Gen (L286V) sensitiver gegenüber Apoptose-auslösenden Faktoren sind; diese übermäßige Sensitivität ließ sich durch CsA verhindern (Keller et al., 1998). CsA inhibiert jedoch nicht nur die mPTP, sondern auch die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin. Da aber eine Behandlung der Zellen mit FK 506, einem andersartigen Calcineurin-Inhibitor, die Apoptose nicht verhindern konnte, ließ sich der schützende Effekt des CsA auf eine Blockade der mPTP zurückführen. Im selben Jahr wurde beobachtet, dass Cybridzellen, deren Mitochondrien aus Alzheimer-Patienten stammen, ein geringeres mitochondriales Membranpotential aufweisen als Kontrollcybride (Cassarino et al., 1998). Diese Depolarisation ließ sich durch CsA aufheben, was darauf hindeutet, dass in den Alzheimer-Cybriden die mPTP zumindest partiell geöffnet ist. An isolierten Leber- und Hirnmitochondrien konnte zudem gezeigt werden, dass A β die Ca²⁺-induzierte Schwellung (Parks et al., 2001) und Depolarisation (Moreira et al., 2001) fördert. Wiederum waren diese Effekte durch CsA blockierbar. A β kann außerdem die Freisetzung von Cytochrom c aus Hirnmitochondrien induzieren (Kim et al., 2002). Diese Translokation wird von CsA signifikant verringert. Des Weiteren ergaben Versuche an SH-SY5Y-Zellen, dass Coenzym Q vor A β -induziertem Zelltod schützt, indem es die mPTP blockiert (Li et al., 2005). Eine A β -induzierte Öffnung der mPTP konnte zudem kürzlich an primären Neuronen beobachtet werden (Sanz-Blasco et al., 2008). Die durch einen übermäßigen Ca²⁺-Einstrom verursachte PT hatte den Austritt von Cytochrom c zur Folge und war durch CsA blockierbar. Eine im September 2008 veröffentlichte Studie ergab außerdem, dass ein Fehlen der mPTP-Komponente CypD Lernstörungen in APP-transgenen Mäuse verhindert (Du et al.). Die CypD-defizienten Mitochondrien waren zudem weniger sensitiv gegenüber A β -induzierten Schädigungen.

1.3 Ziele der Arbeit

Die oben aufgeführten Ergebnisse lassen erwarten, dass die Öffnung der mPTP durch A β an der Toxizität dieses Peptides und somit an der Pathogenese der Alzheimerschen Erkran-

kung beteiligt ist. Auch liegt die Vermutung nahe, dass eine Blockade dieser Öffnung, beispielweise durch den potentiellen Hemmstoff MC, vor A β -induzierter Toxizität schützt. Tiermodelle liefern entsprechende Hinweise; die protektive Wirkung des MC wurde bisher jedoch hauptsächlich seiner anti-inflammatorischen Eigenschaft zugeschrieben. Ein Teilziel dieser Arbeit war es nun zu überprüfen, ob zudem die möglicherweise inhibitorische Wirkung des MC auf die mPTP zu dessen neuroprotektiven Effekten beiträgt. Diese Fragestellung sollte an einem *in vitro*-Modell (embryonale Mischkultur aus dem Rattenhippokampus) untersucht werden. Von Vorteil bei diesem Modell ist, dass in embryonalen Hippokampuskulturen kaum Mikroglia vorkommen (Boggs et al., 1996), so dass eine Beteiligung anti-inflammatorischer Eigenschaften des MC praktisch ausgeschlossen ist.

Dennoch hat MC auch auf Zellebene noch eine Vielzahl mPTP-unabhängiger Effekte, was die Interpretation der am Zellkulturmodell erhaltenen Daten erschweren könnte. Aus diesem Grunde sollten die mitochondrialen Wirkungen des MC im zweiten Teil dieser Arbeit auch an isolierten Mitochondrien charakterisiert werden. Während einige Studien eine Hemmwirkung des MC auf die mPTP beschreiben, sind von anderen Arbeitsgruppen auch Mitochondrien-schädigende Effekte beobachtet worden (siehe 1.2.2). Um diese Unstimmigkeiten aufzuklären, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von MC auf verschiedene funktionelle Parameter der Mitochondrien – Schwellungsverhalten, Cytochrom c-Freisetzung, Redoxaktivität, Membranpotential und Ca²⁺-Aufnahmekapazität – zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Geräte | Hersteller |
|---|--|
| Blotkammer (TE series) | Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA |
| Deckgläschen (Durchmesser 25 mm) | Laborfachhandel Gaudig, Sülzetal |
| Entwicklermaschine | AGFA, Köln |
| Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse) | Varian, Darmstadt |
| Gelkammern (SE 250) | Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA |
| Kanüle (23 G) | Braun, Melsungen |
| Konfokalmikroskop (AXIOVERT, LSM 510 Pascal) | Zeiss, Jena |
| Neubauer-Zählkammer | Fein-Optik, Jena |
| Nitrozellulosemembran (Hybond TM -c extra) | Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK |
| Plattenlesegerät (Titertek Plus MS212) | ICN, Frankfurt |
| Spektrophotometer (Lambda 2) | PerkinElmer, Waltham, USA |
| Spektrophotometerküvetten | Sarstedt, Nürnberg |
| Wellplatten (96-Well) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm) | Nunc, Wiesbaden-Biebrich |
| Zentrifuge (Mitochondrienpräparation; 3K 30) | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz |
| Zentrifuge (Zellkultur; Biofuge 15R) | Heraeus, Hanau |
| Zentrifugenröhrchen (Durchmesser 22 mm) | Sorvall, Langenselbold |

2.1.2 Chemikalien

| Substanz | Hersteller |
|--|-----------------------------|
| A23187 | Molecular Probes, Karlsruhe |
| Acrylamid für Sammelgel: 29:1 für Trenngel: 37,5:1 | Serva, Heidelberg |
| ADP | Sigma, Steinheim |

| Substanz | Hersteller |
|---|--|
| APS | Serva, Heidelberg |
| A β ₂₅₋₃₅ | rPeptide, Bogart, USA |
| B27 | Invitrogen, Karlsruhe |
| BCA Assay Kit | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Bonkreaksäure | Sigma, Steinheim |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| BSA | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| CaCl ₂ *2H ₂ O | Fluka, Buchs |
| Calcium Green 5N | Molecular Probes, Karlsruhe |
| Cholesterol | Sigma, Steinheim |
| Cholinchlorid | Sigma, Steinheim |
| CsA | Alexis, Grünberg |
| Cytochrom c Antikörper (7H8.2C12) | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Cytotoxicity Detection Kit | Roche, Mannheim |
| DCCD | Sigma, Steinheim |
| Digitonin | Sigma, Steinheim |
| DMEM-Medium (high glucose) | PAA, Cölbe |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| EDTA | Merck, Darmstadt |
| EGTA | Sigma, Steinheim |
| FCCP | Fluka, Buchs |
| FKS Gold | PAA, Cölbe |
| Glutamat | Sigma, Steinheim |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| Goat anti-mouse IgG + IgM (Peroxidase-konjugiert) | Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, USA |
| Größenstandard für Gelelektrophorese (PageRuler) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| HBSS | Invitrogen, Karlsruhe |
| HEPES | Boehringer, Mannheim |
| Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP-Substrate | Millipore, Schwalbach |
| Isofluran | Baxter, Unterschleißheim |
| K ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| KCl | Roth, Karlsruhe |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Magnesium Green AM | Molecular Probes, Karlsruhe |
| Malat | Sigma, Steinheim |
| Mannit | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |

| Substanz | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| MgCl ₂ *6H ₂ O | Fluka, Buchs |
| Milchpulver | Saliter, Obergünzburg |
| Minozyklin | Sigma, Steinheim |
| Mitotracker Green | Molecular Probes, Karlsruhe |
| MOPS | Calbiochem, Bad Soden |
| MTT | Sigma, Steinheim |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| NaN ₃ | Merck, Darmstadt |
| NaOH | Merck, Darmstadt |
| Neurobasal-Medium | Invitrogen, Karlsruhe |
| Oligomycin | Sigma, Steinheim |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | PAA, Cölbe |
| Percoll | Sigma, Steinheim |
| Pluronsäure | Invitrogen, Karlsruhe |
| Poly-D-Lysin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ponceau S | Fluka, Buchs |
| Protease Typ I (aus Rinderpankreas) | Sigma, Steinheim |
| Ro 68-3400 | Roche, Basel, Schweiz |
| RotiLoad 4x | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Merck, Darmstadt |
| Safranin-O | Sigma, Steinheim |
| Sanzyklin | Paratek Pharmaceuticals, Boston, USA |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| Staurosporin | Merck, Darmstadt |
| TEACl | Sigma, Steinheim |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| Tetrazyklin | Sigma, Steinheim |
| TMRM | Molecular Probes, Karlsruhe |
| Tributylzinnchlorid (TBT) | Sigma, Steinheim |
| Tris | Sigma, Steinheim |
| Tris Ultra Pure (für Gelelektrophorese) | MP Biochemicals, Eschwege |
| Triton | FERRAK, Berlin |
| Trypanblau | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypsin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween | Sigma, Steinheim |

2.1.3 Puffer und Medien

| Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| Blotpuffer | 144 mM Glycin 18 mM Tris 0,02 % SDS 20 % Methanol |
| Elektrophoresepufferpuffer | 25 mM Tris 192 mM Glycin 1 % SDS |
| Isolationsmedium für Hirnmitochondrien (Digitonin) pH 7,4 | |
| Medium A | 225 mM Mannit 75 mM Saccharose 5 mM HEPES 1 mM EGTA |
| Medium B | Medium A plus 0,1 % BSA |
| Medium C | Medium B plus 1 mg/ml Protease Typ 1 |
| Isolationsmedium für Hirnmitochondrien (nicht-synaptisch; Percoll) pH 7,4 | |
| Medium A | 225 mM Mannit 75 mM Saccharose 20 mM MOPS 1 mM EGTA |
| Medium B | 225 mM Mannit 75 mM Saccharose 20 mM MOPS 0,1 mM EGTA |

| Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| Isolationsmedium für Lebermitochondrien pH 7,4 | |
| Medium A | 250 mM Saccharose 1 mM EDTA |
| Medium B | 250 mM Saccharose |
| Medium C | 250 mM Saccharose 0,5 mM EDTA |
| KCl-basiertes Medium (bzw. NaCl-, Kaliumgluconat-, Cholin- chlorid-basiertes Medium) pH 7,2 | 125 mM KCl (bzw. NaCl, Kaliumgluconat, Cholinchlorid) 20 mM Tris 1 mM MgCl ₂ *6H ₂ O 1 μM EGTA 700 μM NaH ₂ PO ₄ 300 μM K ₂ HPO ₄ 5 mM Glutamat 5 mM Malat |
| PBS pH 7,4 | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ |
| Saccharose-basiertes Medium pH 7,2 | 200 mM Saccharose 10 mM Tris 1 mM MgCl ₂ *6H ₂ O 1 mM KH ₂ PO ₄ 10 μM EGTA 5 mM Glutamat 5 mM Malat |
| Sammelgelpuffer pH 6,8 | 0,5 M Tris 7,8 mM EDTA 0,4 % SDS |
| TBS pH 7,6 | 20 mM Tris 137 mM NaCl |
| Trenngelpuffer pH 8,8 | 1,5 M Tris 7,8 mM EDTA 0,4 % SDS |

2.1.4 Sonstige Lösungen

| Lösungen | Zusammensetzung |
|--|--|
| Bromphenolblau-Lösung | gesättigt in Trenngelpuffer |
| Ca ²⁺ -Stammlösung für Mitochondrienstimulation | 200 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES |
| MTT-Lösung | 6 mg/ml in PBS |
| PDL-Lösung (steril) | 1 mg/ml in Aqua dest. |
| Ponceau-Lösung | gesättigt in Sammelgelpuffer |
| TBS/NaN ₃ | 0,05 % NaN ₃ in TBS |
| TBS/Tween (TBST) | 0,1 % Tween in TBS |

2.1.5 Lösungsmittel

| Substanz | Verwendetes Lösungsmittel |
|----------------------------|---------------------------|
| 5-HD | Aqua dest. |
| A23187 | DMSO |
| Antimycin A | 96 % Ethanol |
| A β ₂₅₋₃₅ | Aqua dest. |
| Calcium Green | Aqua dest. |
| Chloramphenicol | Aqua dest. |
| Cholesterol | 96 % Ethanol |
| CsA | 96 % Ethanol |
| DCCD | 100 % Ethanol |
| FCCP | 96 % Ethanol |
| Magnesium Green | DMSO |
| MitoTracker Green | 10 % Pluronsäure in DMSO |
| Oligomycin | DMSO |
| Ro 68-3400 | 96 % Ethanol |
| Rutheniumrot | Aqua dest. |
| Safranin-O | Aqua dest. |
| Staurosporin | DMSO |
| Tetrazykline (MC, TC, SC) | Aqua dest. |
| TMRM | 10 % Pluronsäure in DMSO |
| Tributylzinnchlorid | DMSO |

2.1.6 Gradientengel

| | | Trenngel 25 % | 5 % | Sammelgel 5 % |
|------------------|----|--------------------------|------------|--------------------------|
| Puffer | ml | 2,75 | 2,75 | 2,70 |
| Acrylamid | ml | 6,90 | 1,40 | 1,30 |
| Glycerol | ml | 2,00 | 0,60 | 2,30 |
| TEMED | μl | 6,50 | 6,50 | 7,00 |
| APS (10 %) | μl | 26,00 | 40,00 | 57,10 |
| Bromphenolblau | μl | 100,00 | - | - |
| Ponceau | μl | - | - | 50,00 |
| Wasser (nanopur) | ml | - | 6,20 | 3,60 |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Aβ-Präparation

Aβ₂₅₋₃₅ wurde in sterilem, destilliertem Wasser so gelöst, dass sich eine Konzentration von 1 mM ergab. Die Lösung wurde aliquotiert (100 μl) und zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Beschichtung von Deckgläschen und Wellplatten

Um Neurone kultivieren zu können, müssen die verwendeten Oberflächen vorbehandelt werden. Dieser Prozess verbessert die Anheftung der Zellen und erhöht damit ihre Überlebenschancen *in vitro*. Die für die Kultivierung benutzten Deckgläschen und Wellplatten wurden daher mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. Dazu wurde sterile PDL-Lösung auf die zu behandelnden Oberflächen aufgetragen (200 μl/Deckgläschen bzw. 100 μl/Well). Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte eine gründliche Spülung der Oberflächen mit sterilem Wasser. Die beschichteten Deckgläschen (in Kulturschalen) und Wellplatten wurden bis zur Verwendung im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) aufbewahrt.

2.2.1.3 Präparation primärer Hippokampuskulturen

Für die Herstellung primärer Hippokampuskulturen dienten Rattenembryonen (Wistar, hauseigene Zucht) des 18. Embryonaltages. Der Tag der Trennung der Muttertiere vom Männchen (Verpaarungszeit 24 h) wurde als Embryonaltag 1 definiert. Die Haltung der Tiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 h, wobei die Tiere ständigen Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Die trächtigen Weibchen wurden mittels Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Nach der Öffnung des Bauchraumes wurde der Uterus entnommen und zur Desinfektion in 70 % Ethanol überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Der Uterus wurde in HBSS gewaschen und die Embryonen aus den Embryonalsäcken entfernt. Nach Dekapitation der Tiere wurden die Schädel in DMEM-Medium aufgefangen. Das Hirn wurde entnommen, die Hippokampi herauspräpariert und in Medium überführt. Nach mechanischer Dispersion des gewonnenen Gewebes mittels Trituration durch eine 23 G-Kanüle erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 300 x g. Das resultierende Pellet wurde in 2 ml DMEM resuspendiert und die Zelldichte nach Vitalfärbung mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt und dem Medium 2 % B27 sowie 0,5 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden auf sterile, PDL-beschichtete Deckgläschen in Kulturschalen (3×10^5 Zellen/Schale) oder in 96-Wellplatten (1×10^5 Zellen/Well) ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Am 3. bis 6. Tag *in vitro* (*day in vitro*, DIV) wurden die Kulturen für Experimente verwendet.

2.2.1.4 Mikroskopie

Um Bilder der Kulturen aufzunehmen, kam ein inverses, konfokales Laserscanmikroskop der Firma Zeiss (LSM Zeiss Aviovert 100M) zum Einsatz. Die Besonderheit der konfokalen Mikroskopie liegt in der Eliminierung von Streulicht mit Hilfe von Lochblenden (*pinholes*), wodurch die Qualität der aufgenommenen Bilder gesteigert wird. Bildaufnahme und -bearbeitung erfolgte mittels der Software PASCAL (Zeiss). Wurden fluoreszenzgefärbte Kulturen untersucht, wurde der Raum abgedunkelt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

2.2.1.5 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein einfach durchzuführender Vitalitätstest. Lebende Zellen nehmen das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) auf und reduzieren es zu wasserunlöslichem, violetterm Formazan.

Die in Wellplatten kultivierten Zellen wurden für die jeweils angegebene Zeit mit den zu testenden Substanzen inkubiert (8 Wells/Behandlungsgruppe). Im Anschluss daran wurde den Kulturen MTT-Lösung so zugesetzt, dass sich eine Endkonzentration von 1 mg/ml ergab. Nach 120-minütiger Inkubationszeit (37 °C) wurde das Medium entfernt. Das gebildete Formazan wurde durch Zugabe von 250 µl DMSO gelöst und im Plattenlesegerät spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt.

2.2.1.6 Bestimmung der Formazan-Exozytose

Entgegen der früheren Sichtweise, dass die *zelluläre* MTT-Umsetzung vor allem auf die mitochondrialen Redoxenzyme zurückzuführen ist, konnten Liu et al. nachweisen, dass Mitochondrien nur geringfügig zur MTT-Reduktion *von Zellen* beitragen (1997). Stattdessen beobachteten sie, dass MTT endozytotisch in Zellen aufgenommen, innerhalb der Vesikel durch eine N-Ethyl-Maleimid (NEM)-sensitive Flavinoxidase zu Formazan reduziert und anschließend exozytiert wird (Liu et al., 1997). Das exozytierte Formazan bildet an der Zelloberfläche Kristalle (siehe Abb. 2.1) und blockiert die weitere MTT-Reduktion.

Da bekannt ist, dass Aß in diesen Prozess eingreift (Liu und Schubert, 1997; Abe und Saito, 1998) und dadurch den MTT-Assay beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Verlauf der Formazan-Exozytose untersucht. Zu diesem Zwecke wurden die in Kulturschalen gewachsenen Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppe (3 Schalen/Gruppe) für 60 min mit MTT inkubiert. Im Anschluss wurden Durchlichtbilder aufgenommen (40x Objektiv) und die Anzahl der Zellen mit sichtbaren Formazankristallen an der Zelloberfläche ausgezählt. Durch Division mit der Gesamtzellzahl ergab sich daraus der Anteil der Zellen, die das gebildete Formazan bereits exozytiert hatten. Die Auszählung der Kulturen erfolgte blind, d.h. ohne Kenntnis der Behandlung.

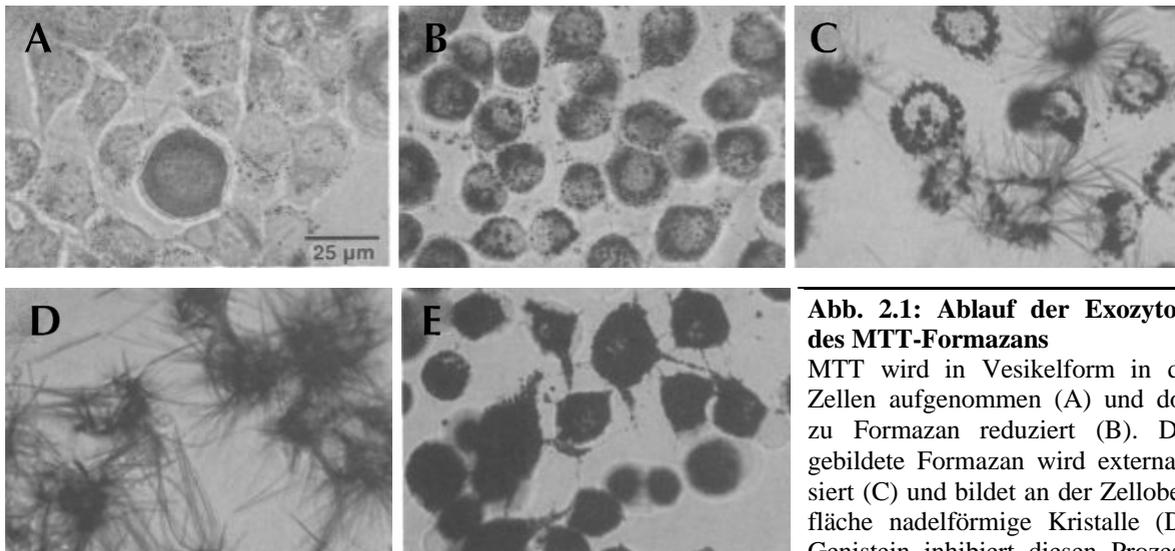


Abb. 2.1: Ablauf der Exozytose des MTT-Formazans

MTT wird in Vesikelform in die Zellen aufgenommen (A) und dort zu Formazan reduziert (B). Das gebildete Formazan wird externalisiert (C) und bildet an der Zelloberfläche nadelförmige Kristalle (D). Genistein inhibiert diesen Prozess; das Formazan verbleibt in der Zelle (E, modifiziert aus Liu et al., 1997).

2.2.1.7 Bestimmung der LDH-Freisetzung

Beim nekrotischen Zelltod kommt es zur Auflösung der Zellmembran. Dies führt u.a. zur Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Zellen ins Medium. Die LDH setzt Laktat zu Pyruvat um, wobei NADH gebildet wird.

DMEM-Medium enthält Pyruvat, was die Aktivität der LDH inhibiert. Abweichend vom oben beschriebenen Protokoll wurden die Zellkulturen für die LDH-Bestimmung daher in Neurobasal-Medium (2 % B27) kultiviert (jeweils 8 Wells/Behandlungsgruppe). Zur Bestimmung des freigesetzten LDH wurden nach Inkubation mit den zu testenden Substanzen 40 µl des Mediums abgenommen und in neue Wellplatten überführt (LDH_{Medium}). Das restliche Medium wurde entfernt und den Zellen 200 µl einer 2%igen Tween-Lösung (in Neurobasal-Medium) zugesetzt, um das in den Zellen verbliebene LDH herauszulösen (LDH_{Zellen}). Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Beiden Proben (je 40 µl Volumen) wurden je 40 µl des Reaktionsgemisches (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch enthält ein Tetrazoliumsalz, dass durch in der LDH-Reaktion (Laktat → Pyruvat) entstandenes NADH zu Formazan reduziert wird; es kommt zu einer Farbreaktion. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte die photometrische Bestimmung der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Plattenlesegerät. Die LDH-Freisetzung ergab sich durch folgende Formel:

$$LDH_{\text{frei}} = LDH_{\text{Medium}} / LDH_{\text{Gesamt}}$$

$$\text{(wobei } LDH_{\text{Gesamt}} = LDH_{\text{Medium}} + LDH_{\text{Zellen}} \text{)}$$

2.2.1.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Intakte Mitochondrien zeichnen sich durch ein hohes, innen negatives Membranpotential aus. Bei Zellschädigung, beispielweise durch apoptotische Stimuli, verringert sich das Potential über der inneren Mitochondrienmembran (Heiskanen et al., 1999). Daher können durch Bestimmung der mitochondrialen Polarisation Rückschlüsse über die Vitalität der Zellen gezogen werden.

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in den Zellkulturen wurden diese für 30 min bei 37 °C mit den Farbstoffen Mitotracker Green (MT Green, 160 nM) sowie TMRM (100 nM) inkubiert. MT Green ist ein mitochondrien-selektiver Farbstoff, der die Organellen unabhängig von ihrem Membranpotential markiert (Pendergrass et al., 2004). TMRM hingegen färbt nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotential, da es potentialabhängig in Mitochondrien akkumuliert (Scaduto und Grotyohann, 1999). Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei 488 nm (MT Green) bzw. 546 nm (TMRM). Die Emissionssignale wurden über einen Bandpassfilter (505 - 550 nm für MT Green bzw. 560 - 615 nm für TMRM) detektiert. Um die Vergleichbarkeit der Aufnahmen untereinander zu gewährleisten, blieben die Mikroskopeinstellungen (Größe des *Pinholes*, Detektorverstärkung usw.) über alle Experimente unverändert.

Als Maß für die Polarisation der Mitochondrien diene das Verhältnis von TMRM-Färbung zu MT Green-Färbung. Zu diesem Zwecke wurden von jeder Kultur 10 Bilder aufgenommen (20x/40x Objektiv) und für jedes Bild die Histogramme beider Farbkanäle mittels PASCAL-Software erstellt. Aus diesen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (\bar{m}) für beide Farbstoffe berechnet. Als Maß für das mitochondriale Membranpotential der Kulturen diene der Quotient der mittleren Fluoreszenzintensitäten für TMRM und MT Green ($\bar{m}_{\text{TMRM}}/\bar{m}_{\text{MT Green}}$).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung mittels BCA

Zur Proteinquantifizierung wurde das Nachweisverfahren nach Pierce angewendet. Dieses beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Peptidbindungen und anschließender Farbreaktion des gebildeten Cu^+ mit Bicinchoninsäure (BCA).

Die Reagenzien A und B des *BCA Assay Kit* wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. Zu 950 μl dieses Nachweisreagenz' wurden 50 μl der zu bestimmenden Proteinlösung zu-

gegeben. Die Proben wurden gut durchmischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 568 nm. Die Eichkurve wurde mittels 8 Proteinstandards (BSA, 0 – 1200 mg/l) ermittelt.

2.2.2.2 SDS-Gelelektrophorese und *Western Blotting*

Um Proteingemische ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst mit 4x RotiLoad versetzt und für 5 min bei 96 °C geschüttelt. Die auf diese Weise denaturierten Proteine wurden auf 5/25 %ige Gradientengele (Sammelgel 5 %) aufgetragen. Als Marker für das Molekulargewicht diente der Proteingrößenstandard *Page Ruler*. Der Gellauf erfolgte mit 20 mA/Gel bei konstanter Kühlung der Gelkammern.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die nun aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen (HybondTM-c extra) transferiert. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer bei 80 mA für 1,5 h bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Membranen zunächst 3x für je 15 min in TBS/Tween (TBST) gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurden die Membranen anschließend für 3 h in 5 % Milchpulver (in TBST) geblockt. Nach erneutem Waschen (TBST, 3x, 15 min) wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Wieder wurden die Membranen in TBST gewaschen und im Anschluss für 3 h mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus IgG + IgM, Peroxidasekonjugiert, 1:5000, 0,5 % Milchpulver in TBST) behandelt. Die Antikörper-markierten Proteine wurden schließlich durch Chemilumineszenz visualisiert (Immobilon WesternTM HRP substrate).

2.2.3 Analyse mitochondrialer Funktionalität

2.2.3.1 Isolation von Mitochondrien aus Lebergewebe

Männliche Ratten wurden unter Isofluran-Narkose dekapitiert, der Bauchraum wurde geöffnet, die Leber entnommen und in 0,25 M Saccharose-Lösung überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und diese in der Saccharose-Lösung gewaschen, um Blutrückstände zu entfernen. Die gewaschenen Gewebestücke wurden in EDTA-haltige Saccharose-Lösung (Medium A, ~ 30 ml) überführt und mit einem Potter

homogenisiert. Die so erhaltene Suspension wurde bei 800 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (4 min bei 5100 x g, 2 min bei 12300 x g), nach denen das Pellet jeweils in EDTA-freier Saccharose-Lösung (Medium B) resuspendiert und per Hand in einem Potter homogenisiert wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12300 x g (10 min) erfolgte die Resuspension des Pellets in 750 µl Medium C. Die Mitochondrien wurden auf Eis aufbewahrt und innerhalb von 8 Stunden für Experimente verwendet.

2.2.3.2 Isolation nicht-synaptischer Mitochondrien aus Hirngewebe mittels Percoll

Synaptische und nicht-synaptische Mitochondrien unterscheiden sich in hohem Maße in ihrer Sensitivität gegenüber mPTP-induzierenden Faktoren (Brown et al., 2006). Zur Verringerung der Heterogenität der erhaltenen Mitochondriensuspension ist es daher von Vorteil, Synaptosomen mitsamt den darin enthaltenen synaptischen Mitochondrien über einen Percoll-Gradienten zu entfernen.

Männlichen Ratten wurde unter Isoflurannarkose das Gehirn entnommen und dieses in eiskaltes Isolationsmedium A überführt. Die Hirnhäute sowie Blutgefäße wurden entfernt und das Gehirn in kleine Stücke zerschnitten. Es folgte die Homogenisation des Gewebes per Hand in einem Potter und eine 3-minütige Zentrifugation der Suspension bei 1300 x g. Der Überstand wurde auf Eis gestellt, das Pellet in Medium A resuspendiert und erneut für 3 min bei 1300 x g zentrifugiert. Die zusammengefassten Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden im Anschluss für 10 min bei 21200 x g zentrifugiert und das Pellet in 3 ml 15%igem Percoll (gelöst in Medium A) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf einen vorbereiteten Percoll-Gradienten (2,5 ml 40 % Percoll, 3,5 ml 23 % Percoll) geschichtet und für 10 min bei 31700 x g zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren der an der unteren Grenzschicht befindlichen nicht-synaptischen Mitochondrien und einer 4fach-Verdünnung mit einer BSA-Lösung (10 mg/ml in Medium A) erfolgte eine Zentrifugation bei 16700 x g (10 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in BSA-freiem Medium A gelöst. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (6700 x g, 10 min) wurde das erhaltene Pellet in 100 µl Isolationsmedium B resuspendiert. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis.

2.2.3.3 Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe mittels Digitonin

Ein großer Nachteil der oben beschriebenen Methode ist die sehr geringe Ausbeute. Um umfangreichere Untersuchungen auch an Hirnmitochondrien vornehmen zu können, wurde

daher auf die folgende Isolationsmethode zurückgegriffen, bei der eine Mischung synaptischer und nicht-synaptischer Mitochondrien erhalten wird. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass an den so gewonnenen Mitochondrien keine Schwellungsversuche durchführbar sind; die Mitochondrien schwellen nach Zugabe von Ca^{2+} oder anderen mPTP-auslösenden Substanzen nicht an.

Nach Dekapitation der Ratten wurde das Gehirn zügig entnommen und in eiskaltem Medium A gewaschen. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Meningen wurden entfernt, das Gehirn wurde in kleine Stücke geschnitten und mittels Potter in 10 ml Medium C homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde 1:3 mit Medium B verdünnt und für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die an der Oberfläche befindliche Schicht denaturierter Proteine wurde abpipettiert und der Überstand für weitere 8 min bei 12000 x g zentrifugiert. Das nun gebildete Pellet wurde in Digitonin-haltigem Medium A (6 mg auf 10 ml) homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min wurde das Pellet in 800 μl Medium A resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Die Hirnmitochondrien wurden innerhalb von 4 Stunden für Experimente verwendet. Bis auf die Schwellungsexperimente wurden für alle an Hirnmitochondrien durchgeführten Versuche die mittels Digitonin gewonnenen Mitochondrien verwendet.

2.2.3.4 Inkubationsmedien

In der Literatur werden für Untersuchungen an isolierten Mitochondrien sowohl nicht-ionische (Saccharose/Mannit-basierte) als auch ionische (KCl-basierte) Medien verwendet. Um festzustellen, inwieweit die Differenzen in den bisher publizierten Ergebnissen auf den Gebrauch unterschiedlicher Medien zurückzuführen sind, wurden die Effekte des MC auf die verschiedenen funktionellen Parameter isolierter Mitochondrien in der vorliegenden Arbeit sowohl in einem Saccharose-basierten als auch in einem KCl-basierten Inkubationsmedium untersucht.

2.2.3.5 Spektrophotometrische Bestimmung des Matrixvolumens

Aufgrund des kolloidosmotischen Drucks der Matrixproteine bewirkt die Öffnung der mPTP den Einstrom von Wasser in die mitochondriale Matrix und damit verbunden ein Anschwellen der Mitochondrien (Gunter und Pfeiffer, 1990). Durch diese Volumenänderung verringert sich der Brechungsindex einer Mitochondriensuspension und die Absorption sichtbaren Lichtes sinkt.

Zur Bestimmung der mitochondrialen Schwellung wurde mittels eines Plattenlesegerätes die Absorption der Mitochondriensuspension bei 620 nm aufgezeichnet (A_{620}). Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Messwerte wurden alle 10 s aufgenommen. Zwischen den Messungen erfolgte ein Schütteln der Wellplatte, um ein Absinken der Mitochondrien und die damit verbundene Verfälschung der Messergebnisse zu minimieren.

Die verwendete Proteinkonzentration betrug 500 µg/ml. Es wurde ein Volumen von 200 µl eingesetzt (96-Wellplatten). Alle Versuche an einer Präparation erfolgten gleichzeitig. Da die Absorption zu Beginn teils stark schwankte, wurde mit dem Start der Messung so lange gewartet, bis sich eine stabile Basislinie ergab (mindestens 5 min).

2.2.3.6 Messung von Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität

Infolge der Öffnung der mPTP kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, und daraus resultierend zu einer Freisetzung der in der Matrix angereicherten Ca^{2+} -Ionen. Über die Messung des Membranpotentials und der Ca^{2+} -Aufnahmekapazität kann daher auf den Öffnungszustand der mPTP geschlussfolgert werden.

Zur Bestimmung dienten die Fluoreszenzfarbstoffe Safranin-O und Calcium Green 5N (CaG). Safranin-O ist ein positiv geladener Farbstoff, der in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential in die Matrix aufgenommen wird. Aufgrund der Dichte des Farbstoffs in vollständig polarisierten Mitochondrien kommt es zum *Quenching*, d.h. zu einer Verminderung der Fluoreszenz. Depolarisieren Mitochondrien, so wird der Farbstoff freigegeben, der *Quenching*-Effekt aufgehoben und die Fluoreszenzintensität steigt. Safranin-O wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Die Anregung erfolgte bei 525 nm, die Intensität des emittierten Lichtes wurde bei 587 nm gemessen. Zur Bestimmung der extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration wurde CaG eingesetzt (100 nM). Dieser Farbstoff (Anregungswellenlänge 506 nm, Emissionswellenlänge 532 nm) komplexiert Ca^{2+} -Ionen, wobei sich die Intensität des emittierten Lichtes erhöht. Da CaG nicht membrangängig ist, zeigt er den Ca^{2+} -Spiegel im Inkubationsmedium an, misst also die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration.

Mitochondriales Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität wurden simultan in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Gestartet wurde das Experiment in Abwesenheit von Mitochondrien, um die Basislinie zu bestimmen. 30 s nach Beginn des Versuchs wurden Mitochondrien (500 µg/ml, 1 ml Endvolumen) dazugegeben.

Für die Auswertung des Membranpotentials wurde der erste Messwert auf 100 % normiert und alle weiteren Werte als Veränderungen relativ zu diesem Basalwert ausgedrückt. Bei der Darstellung der extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten unverändert aufgetragen.

2.2.3.7 Analyse des freigesetzten Cytochrom c

Eine weitere Konsequenz der Öffnung der mPTP ist die Freisetzung pro-apoptischer Proteine wie Cytochrom c in das Zytosol. Zur Bestimmung des freigesetzten Cytochrom c wurden Mitochondrien (500 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml) im angegebenen Inkubationsmedium suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanz. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Mitochondrien-suspension für 5 min bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand (entspricht extramitochondrialer Fraktion) vom Pellet (entspricht mitochondrialer Fraktion) getrennt. Die Pellets wurden in 250 μl 10 % SDS aufgenommen und für 10 min bei 95 °C im Thermomixer resuspendiert. Gleiche Volumina an Proben wurden auf SDS-Gradientengele aufgetragen (siehe 2.2.2.2). Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese erfolgte die Bestimmung des freigesetzten Cytochrom c über einen *Western Blot*. Als primärer Antikörper diente der 7H8.2C12 Maus-anti-Cytochrom c-Antikörper von BD Pharmingen (1:500 in TBS/ NaN_3). Zur Analyse der Daten wurde die Bandendichte der zytosolischen Fraktionen mittels der Software Quantity One (Version 4.6.3, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bestimmt. Das nach Behandlung der Mitochondrien mit 100 μM Ca^{2+} freigesetzte Cytochrom c diente dabei als Referenzwert und wurde auf 100 % normiert.

2.2.3.8 Bestimmung der Redoxaktivität

Auch durch die in den Mitochondrien befindlichen Redoxenzyme kann MTT zu Formazan reduziert werden. Vor allem die Komplexe der Atmungskette tragen zur MTT-Reduktion isolierter Mitochondrien bei (Berridge und Tan, 1993; Liu et al., 1997). Die Messung der Formazan-Bildung an isolierten Mitochondrien stellt daher eine einfach und schnell durchzuführende Methode dar, die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette und somit auch die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien abzuschätzen (Schönfeld et al., 2004).

Um die Redoxaktivität der Mitochondrien zu bestimmen, wurden diese bei Raumtemperatur für 5 min im jeweiligen Inkubationsmedium vorinkubiert (250 μg Protein/ml). Im Anschluss wurde MTT-Lösung so hinzugesetzt, dass sich eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml ergab. Nach 5-minütiger Inkubation mit MTT bei 30 °C wurde die Mitochon-

driensuspension für 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 100 % Ethanol gelöst. Die Absorption der entstandenen Lösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt und diente als Maß für die Menge des gebildeten Formazans.

2.2.3.9 Bestimmung der Intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration

Die Messung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Magnesium Green AM (MgG) vorgenommen. Der Farbstoff liegt zunächst als nicht-fluoreszierender Acetoxymethyl (AM)-Ester vor, der die mitochondrialen Membranen passieren kann. In der Matrix wird die AM-Gruppe von mitochondrialen Esterasen abgespaltet. Der so veränderte Farbstoff fluoresziert nun in Abhängigkeit von der Menge des an ihn gebundenen Mg^{2+} . Zusätzlich wird durch die Abspaltung der AM-Gruppe verhindert, dass der Farbstoff aus den Mitochondrien herausdiffundiert. Damit wird sichergestellt, dass ausschließlich das intramitochondriale Mg^{2+} gemessen wird.

Zur Beladung der Mitochondrien (10 mg/ml) mit dem Farbstoff wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit 5 μ M MgG inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation der Suspension bei 10000 x g. Das entstandene Pellet wurde in Isolationsmedium C resuspendiert (20 mg/ml). Für die Bestimmung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration wurde eine Proteinkonzentration von 200 μ g/ml verwendet (1 ml Gesamtvolumen). Die Messung erfolgte im Fluoreszenzspektrometer in Anwesenheit von 1 mM EDTA im Inkubationsmedium. Die Intensität des emittierten Lichtes wurde bei 535 nm gemessen (Anregungswellenlänge 510 nm).

2.2.4 Analyse der Daten und Statistik

Für alle Experimente gilt, dass die Versuche an mindestens 3 unabhängigen Präparationen erfolgten. Zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung der Daten diente das Programm GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen zwei Behandlungsgruppen wurden mittels t-test auf Signifikanz überprüft. Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, so wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mittels *One-way-ANOVA* und Dunnett-post-test ermittelt. Unterschiede galten als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

Folgende Symbole wurden benutzt:

n.s. = $p > 0,05$

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

2.2.4.1 Analyse der mitochondrialen Schwellung

Der erste ermittelte Extinktionswert der Mitochondriensuspension wurde auf 1 normiert (A_0) und alle weiteren Werte als Veränderungen relativ zu diesem Basalwert ausgedrückt. Für jede Behandlungsgruppe wurde für jeden Zeitpunkt der Mittelwert der relativen Absorptionen von mindestens 3 unabhängigen Präparationen berechnet und graphisch dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Zusätzlich erfolgte für alle Einzelexperimente die Berechnung der maximalen Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme, d.h. der maximale Absorptionsabnahme pro Zeiteinheit. Zu diesem Zwecke wurde mittels GraphPad Prism die erste Ableitung (dA_{620}/dt) des gemessenen Absorptionsverlaufes bestimmt (mit Glättung über 4 Nachbarwerte, Glättungspolynom 2. Ordnung). Der Extremwert der Ableitung wurde als maximale Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme definiert (siehe Abb. 2.2).

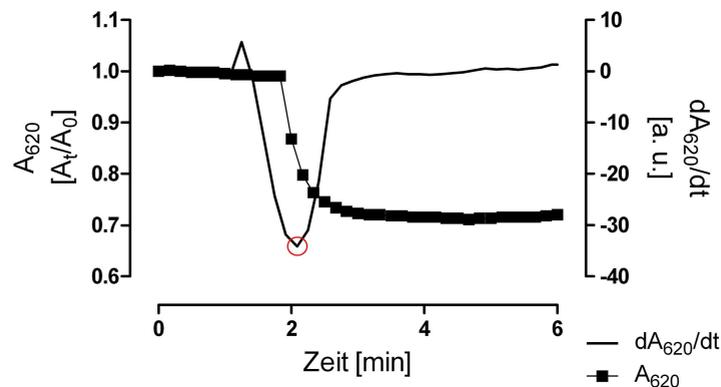


Abb. 2.2: Bestimmung der Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme

Vom Graphen des Schwellungsverlaufes (■) wurde mittels GraphPad Prism die erste Ableitung (—) bestimmt. Der Extremwert der Ableitung (Minimalwert, ○) diente als Maß für die maximale Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme.

3 ERGEBNISSE

3.1 Effekte von Minozyklin in einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer

Um eine mögliche protektive Wirkung von MC gegen den Morbus Alzheimer zu untersuchen, sollte vorab ein *in vitro*-Modell der Krankheit etabliert werden. Zu diesem Zwecke wurden primäre hippokampale Kulturen zunächst für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des neurotoxischen Peptides $A\beta_{25-35}$ inkubiert.

3.1.1 Minozyklin schützt primäre hippokampale Kulturen gegen eine $A\beta_{25-35}$ -induzierte Hemmung der MTT-Reduktion

Als erstes Indiz für die Vitalität der Zellen diene ihre Redoxaktivität, die mittels MTT-Assay bestimmt wurde. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, hemmte $A\beta_{25-35}$ ab einer Konzentration von 1 μM die MTT-Reduktion der Kulturen signifikant. Die Behandlung mit 1 bzw. 10 μM $A\beta_{25-35}$ bewirkte einen Rückgang der MTT-Umsetzung auf $88,2 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$, $n = 4$) bzw. $83,5 \pm 6,0\%$ ($p < 0,01$, $n = 4$) der Vehikel-behandelten Zellen.

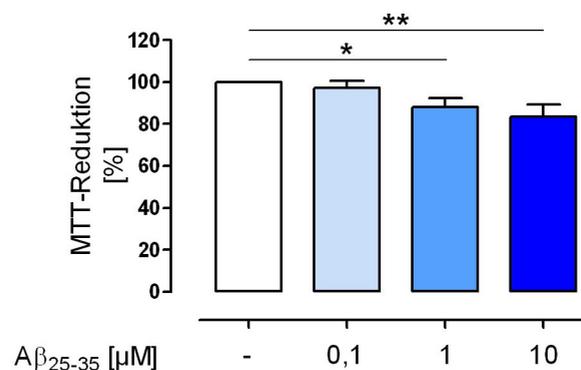


Abb. 3.1: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit $A\beta_{25-35}$ auf die MTT-Reduktion primärer hippokampaler Kulturen

$A\beta_{25-35}$ in Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ bewirkte eine signifikante Verringerung der zellulären MTT-Reduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Präparationen.

Unter Verwendung einer $A\beta_{25-35}$ -Konzentration von 10 μM wurde nun getestet, ob MC den inhibitorischen Effekt des Peptides auf die MTT-Umsetzung beeinflussen kann. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an MC ko-inkubiert und im Anschluss die MTT-Reduktion gemessen (Abb. 3.2). Es ergab sich, dass die Behandlung mit $\geq 25 \mu\text{M}$ MC die MTT-Reduktion $A\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen normalisierte (Abb. 3.2)

A). Die Formazanbildung stieg bei Verwendung von 25 bzw. 100 μM MC auf $99,9 \pm 5,3 \%$ ($p < 0,01$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$ alleine, $n = 4$) bzw. $97,5 \pm 5,0 \%$ ($p < 0,05$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$ alleine, $n = 4$) der Kontrollzellen. Hingegen hatte MC keinen signifikanten Einfluss auf die MTT-Reduktion Vehikel-behandelter Zellen (Abb. 3.2B).

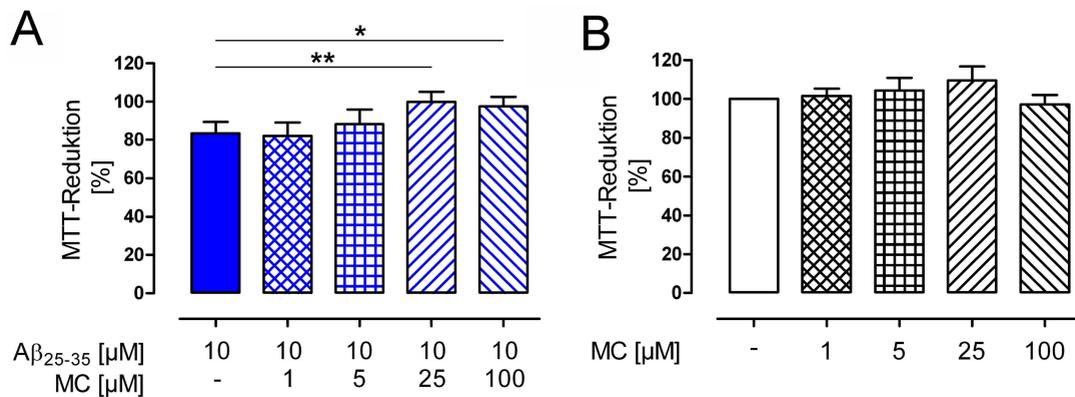


Abb. 3.2: Modulation der Wirkung von $\text{A}\beta_{25-35}$ auf die MTT-Reduktion durch Minozyklin
 (A) Ko-Inkubation $\text{A}\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen mit $\geq 25 \mu\text{M}$ MC erhöhte deren MTT-Reduktionsvermögen signifikant ($n = 4$). Die Formazanbildung wurde auf das Niveau der Vehikel-behandelten Kulturen normalisiert. (B) Im Gegensatz dazu hatte MC keinen Einfluss auf die MTT-Reduktion in Kontrollzellen ($n = 4$).

Da von $\text{A}\beta$ bereits bekannt ist, dass es die MTT-Reduktion von Zellen beeinflussen kann, ohne den Tod der Zellen zu induzieren, wurden zwei weitere Vitalitäts-Assays durchgeführt. Tatsächlich zeigte sich, dass eine 24-stündige Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ keine Freisetzung von LDH aus den Zellen in den Extrazellulärraum bewirkte (Abb. 3.3A). Zusätzlich wurde mittels Fluoreszenzfärbung das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) der Zellkulturen bestimmt (Abbn. 3.3B und C). Als Positivkontrolle diente die Inkubation der Kulturen mit dem Entkoppler Carbonylzyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP, $20 \mu\text{M}$) bzw. dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin (STS, $1 \mu\text{M}$), der in Zellen die Apoptose auslöst. Sowohl FCCP als auch STS bewirkten einen dramatischen Rückgang von $\Delta\psi_m$ (jeweils $p < 0,001$, $n = 3$). Auch durch Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ verringerte sich das Membranpotential signifikant ($p < 0,05$, $n = 3$). Die Ko-Inkubation der Zellen mit $25 \mu\text{M}$ MC konnte diese depolarisierende Wirkung des $\text{A}\beta_{25-35}$ nicht verhindern. Das Membranpotential erhöhte sich zwar geringfügig durch Behandlung mit MC, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 3$).

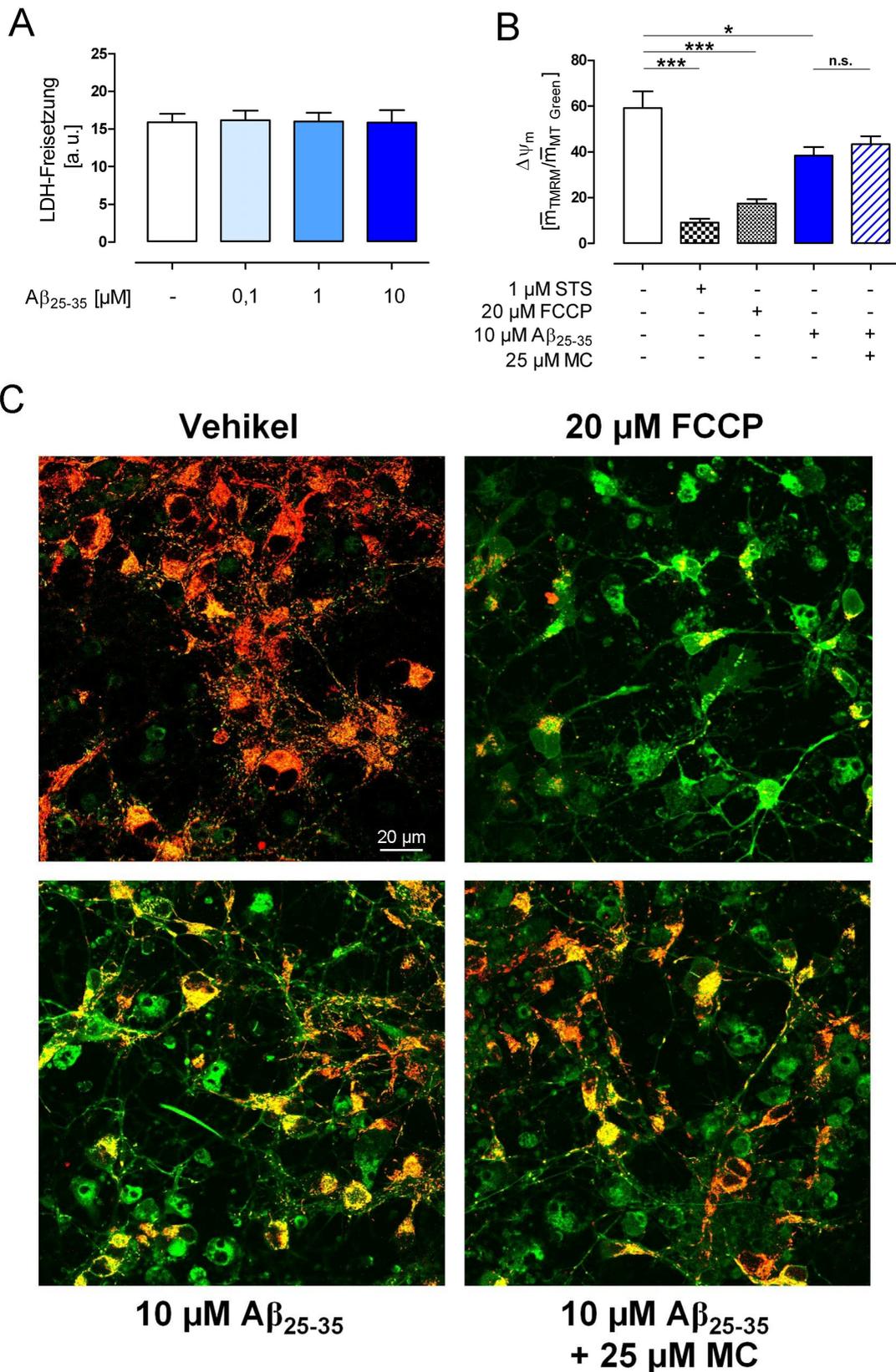


Abb. 3.3: Einfluss von Aβ₂₅₋₃₅ auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential (Δψ_m) primärer hippocampaler Kulturen

(A) Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit bis zu 10 μM Aβ₂₅₋₃₅ hatte keinen Effekt auf die LDH-Freisetzung der Kulturen (n = 3). (B) Hingegen bewirkte dieselbe Behandlung einen signifikanten Rückgang von Δψ_m, der durch MC nicht verhindert werden konnte (n = 4). (C) Fluoreszenzfärbung zur Bestimmung von Δψ_m. Dargestellt ist eine Doppelfärbung der Kulturen mit TMRM (rot) und MT Green (grün). In den Vehikel-behandelten Zellen war eine starke TMRM-Färbung zu sehen, die darauf hindeutet, dass Δψ_m in den meisten Zellen intakt war. Hingegen fiel die TMRM-Färbung in den FCCP- bzw. Aβ₂₅₋₃₅-behandelten Kulturen deutlich geringer aus. MC hatte keinen Einfluss auf Δψ_m.

Zusammengefasst lässt sich daher sagen, dass eine 24-stündige Inkubation primärer hippokampaler Kulturen mit $A\beta_{25-35}$ zwar keine Erhöhung der LDH-Freisetzung bewirkte, das mitochondriale Membranpotential der Zellen jedoch verringerte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des MTT-Assays konnte allerdings im Fall der $\Delta\psi_m$ -Bestimmung kein protektiver Effekt von MC festgestellt werden. Welche Mechanismen könnten stattdessen der normalisierenden Wirkung von MC auf das MTT-Reduktionsvermögen $A\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen zugrunde liegen?

3.1.2 Minozyklin normalisiert die durch $A\beta_{25-35}$ beschleunigte Externalisierung des MTT-Formazans

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass $A\beta$ die Externalisierung von MTT-Formazan beschleunigen und auf diese Weise die Reduktion von MTT inhibieren kann, ohne die Zellvitalität zu beeinflussen (Liu und Schubert, 1997; Abe und Saito, 1998). Daher wurde im Folgenden geprüft, ob dies auch in dem hier gewählten Modell der Fall war. Dazu wurde morphologisch die Formazan-Bildung in Vehikel- und $A\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen beobachtet. Es zeigte sich, dass in Vehikel-behandelten Kulturen selbst nach 2-stündiger Inkubation mit MTT nur wenige Zellen externalisierte Formazankristalle an ihrer Oberfläche aufwiesen (Abb. 3.4, obere Reihe, durch \star markiert). Im Gegensatz dazu lag das gebildete Formazan bei den mit $10 \mu\text{M}$ $A\beta_{25-35}$ behandelten Kulturen bereits 1 h nach Zugabe des MTT fast vollständig extrazellulär vor (Abb. 3.4, mittlere Reihe). Ko-Inkubation der Zellen mit $25 \mu\text{M}$ MC führte zu einer partiellen Normalisierung der Formazan-Externalisierung (Abb. 3.4, untere Reihe). In diesem Fall verblieb ein höherer Anteil an Formazan innerhalb der Zellen (durch \blacktriangleleft markiert).

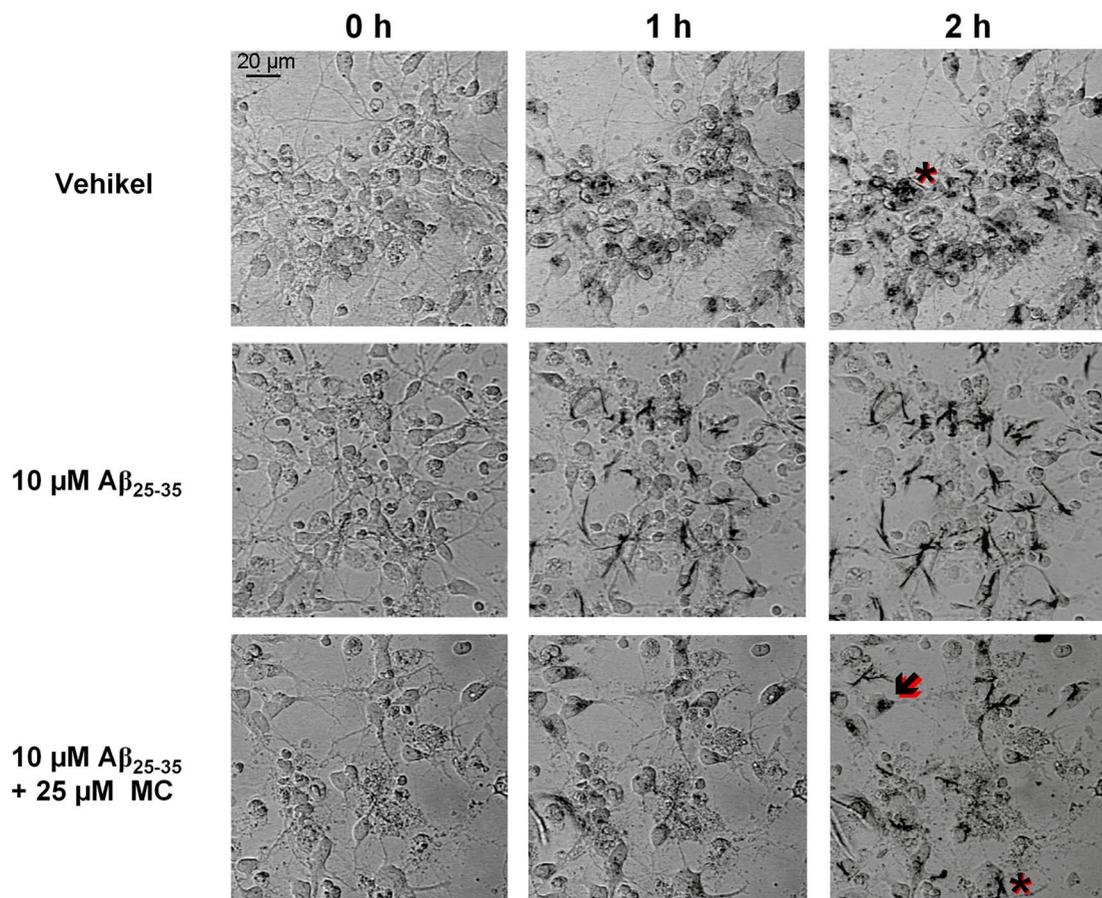


Abb. 3.4: Verlauf der MTT-Externalisierung in primären hippocampalen Kulturen

Durchlichtbilder (20x-Objektiv) MTT-behandelter Kulturen vor bzw. 1 sowie 2 h nach Zugabe des MTT. In Vehikel-behandelten Zellen (obere Reihe) verblieb das gebildete Formazan fast ausschließlich intrazellulär, nur bei wenigen Zellen ist externalisiertes Formazan zu erkennen (*). Hingegen war das in den $A\beta_{25-35}$ -behandelten Kulturen gebildete Formazan bereits nach 1 h beinahe vollständig externalisiert worden (mittlere Reihe). Ko-Inkubation mit MC verlangsamte die Formazan-Externalisierung der $A\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen (untere Reihe). 2 h nach MTT-Zugabe lag ein großer Anteil des Formazans weiterhin intrazellulär vor (↙).

Eine Quantifizierung der Formazan-Externalisierung nach 60-minütiger Inkubation mit MTT ergab, dass zu diesem Zeitpunkt bei lediglich $15,8 \pm 3,8 \%$ der Kontrollzellen Formazankristalle an der Zelloberfläche sichtbar waren (Abb. 3.5A). Behandlung der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ $A\beta_{25-35}$ erhöhte diesen Anteil auf $61,5 \pm 5,6 \%$ ($p < 0,001$, $n = 3$) bzw. $76,2 \pm 2,5 \%$ ($p < 0,001$, $n = 3$). Geringere $A\beta_{25-35}$ -Konzentrationen hatten keinen signifikanten Effekt. Ko-Inkubation der Kulturen mit $\geq 5 \mu\text{M}$ MC bewirkte eine signifikante Verlangsamung der durch $A\beta_{25-35}$ stimulierten Formazan-Externalisierung (Abb. 3.5B) und erhöhte auf diese Weise die MTT-Reduktion der $A\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen. Im Gegensatz dazu hatte MC in Kontrollkulturen keinen Einfluss auf die Externalisierung des Formazans (jeweils $p > 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.5C).

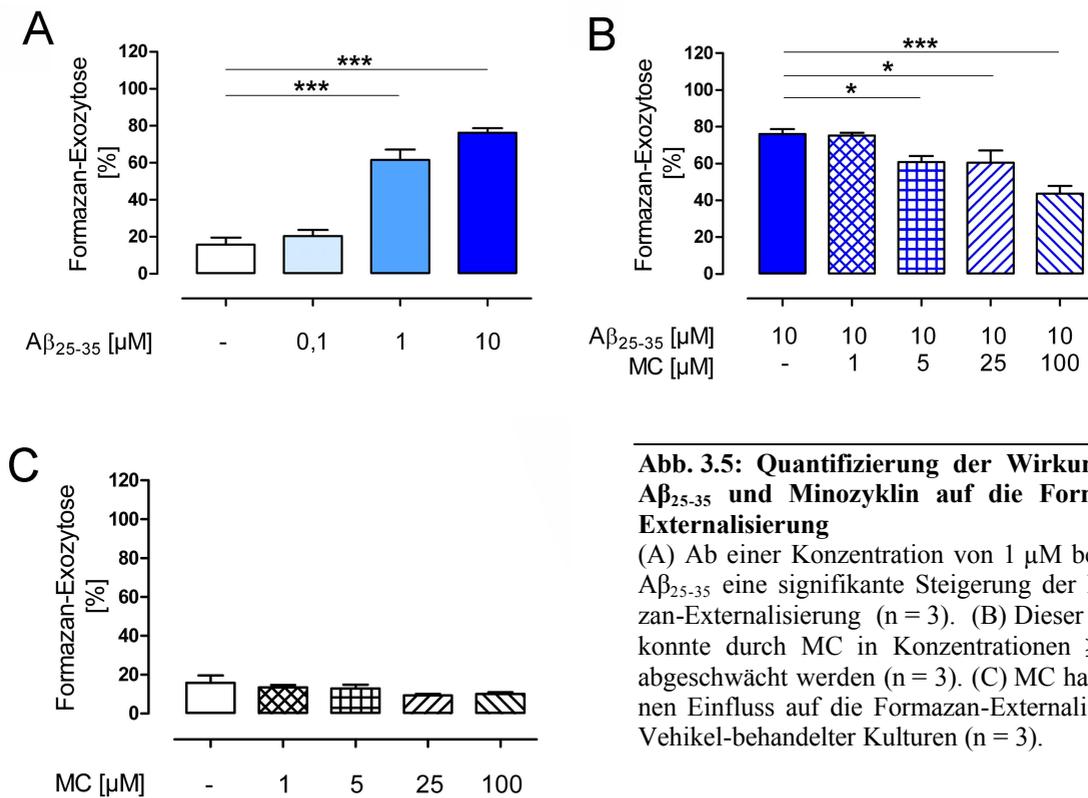


Abb. 3.5: Quantifizierung der Wirkung von Aβ₂₅₋₃₅ und Minozyklin auf die Formazan-Externalisierung

(A) Ab einer Konzentration von 1 μM bewirkte Aβ₂₅₋₃₅ eine signifikante Steigerung der Formazan-Externalisierung (n = 3). (B) Dieser Effekt konnte durch MC in Konzentrationen ≥ 5 μM abgeschwächt werden (n = 3). (C) MC hatte keinen Einfluss auf die Formazan-Externalisierung Vehikel-behandelter Kulturen (n = 3).

Von Cholesterin ist bekannt, dass es eine ähnliche Wirkung auf die MTT-Formazan-Externalisierung hat wie die hier von Aβ beobachtete (Liu et al., 1998). Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, führte eine 3-stündige Inkubation der Kulturen mit Cholesterin zu einer Verminderung der zellulären MTT-Reduktion (Abb. 3.6A). Während die Behandlung mit 10 nM Cholesterin keinen signifikanten Einfluss hatte, sank die MTT-Reduktion bei Verwendung von 0,1 bzw. 1 μM Cholesterin auf $71,3 \pm 5,2 \%$ ($p < 0,01$, $n = 4$) bzw. $77,2 \pm 2,3 \%$ ($p < 0,05$, $n = 4$). Wie im Falle des Aβ₂₅₋₃₅ zeigte sich auch hier, dass die MTT-Reduktion durch Ko-Inkubation mit MC normalisiert werden kann (Abb. 3.6B). Zellen, die mit 100 nM Cholesterin und 25 oder 100 μM MC ko-inkubiert worden waren, bildeten ähnliche Mengen an Formazan wie die Vehikel-behandelten Zellen ($99,0 \pm 5,2 \%$, $p < 0,01$ bzw. $114,1 \pm 6,2 \%$, $p < 0,001$, jeweils $n = 4$).

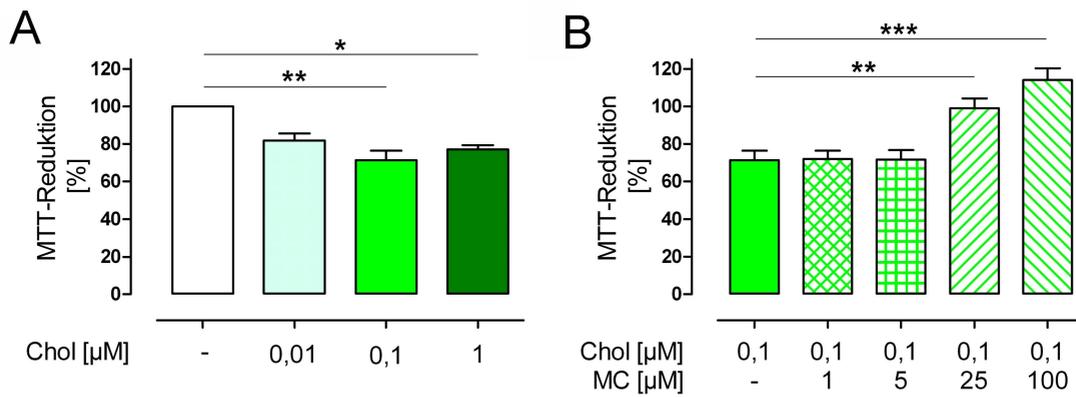


Abb. 3.6: Effekt von Cholesterol auf die MTT-Umsetzung primärer Hippokampuskulturen

(A) Die 3-stündige Inkubation der Kulturen mit $\geq 0,1 \mu\text{M}$ Cholesterol (Chol) bewirkte eine signifikante Verringerung der MTT-Reduktion ($n = 4$). (B) Die durch Cholesterol eingeschränkte Formazanbildung konnte durch MC ($\geq 25\mu\text{M}$) normalisiert werden ($n = 4$).

Ähnlich wie bei der $A\beta_{25-35}$ -vermittelten Hemmung der MTT-Reduktion ließ sich auch die Wirkung des Cholesterols auf die MTT-Umsetzung der Zellen auf eine Beschleunigung der Formazan-Externalisierung zurückführen (Abbn. 3.7A und B). Es zeigte sich zudem, dass MC auch die durch Cholesterol stimulierte Externalisierung des gebildeten Formazans zu normalisieren vermag (Abb. 3.7C).

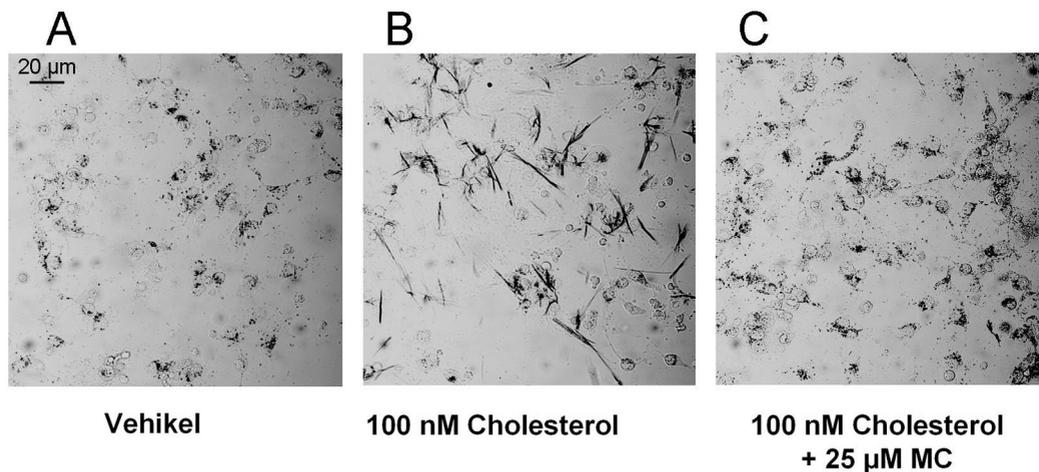


Abb. 3.7: Effekt von Cholesterol und Minozyklin auf die MTT-Formazan-Externalisierung
 Gezeigt sind Durchlichtbilder MTT-behandelter Zellen 1 h nach Zugabe des Farbstoffes. (A, B) Deutlich zu sehen sind die erhöhte Formazan-Externalisierung sowie Kristallbildung des MTT nach Inkubation der Kulturen mit 100 nM Cholesterol. (C) In mit 25 µM MC behandelten Zellen zeigte sich eine weitgehende Normalisierung des Prozesses; das gebildete Formazan verblieb, ähnlich wie in den Kontrollkulturen, fast vollständig intrazellulär.

3.1.3 Minozyklin schützt primäre hippocampale Kulturen nicht vor $A\beta_{25-35}$ -vermittelter Toxizität

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit die durch MC normalisierte Formazan-Externalisierung mit einer potentiellen Schutzwirkung des Antibiotikums gegen eine $A\beta_{25-35}$ -vermittelte Toxizität korreliert. Um diesen Sachverhalt zu klären, sollte im Folgenden überprüft werden, ob MC auch den $A\beta_{25-35}$ -induzierten Zelltod aufhalten kann.

Zu diesem Zwecke wurde die Inkubationszeit der Zellkulturen mit $A\beta_{25-35}$ verlängert und die Vitalität der Zellen in täglichem Abstand morphologisch überprüft. Es stellte sich heraus, dass eine 6-tägige Inkubation mit 10 µM $A\beta_{25-35}$ nötig war, bis klare morphologische Veränderungen auftraten (siehe auch Abb. 3.10). Zum selben Zeitpunkt konnte zudem ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung durch $A\beta_{25-35}$ beobachtet werden (Abb. 3.8A). Die Behandlung der Kulturen mit 1 bzw. 10 µM $A\beta_{25-35}$ bewirkte eine Zunahme der LDH-Freisetzung auf $110,4 \pm 1,1 \%$ ($p < 0,05$, $n = 4$) bzw. $124,3 \pm 0,8 \%$ ($p < 0,001$, $n = 4$) der Kontrolle. Auch das mitochondriale Membranpotential war nach 6-tägiger Inkubation mit 10 µM $A\beta_{25-35}$ signifikant verringert ($p < 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.8B).

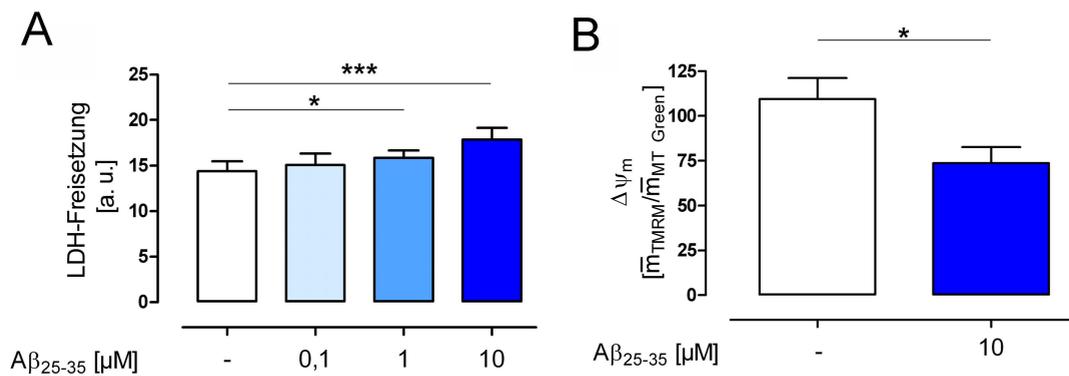


Abb. 3.8: LDH-Freisetzung und mitochondriales Membranpotential ($\Delta\psi_m$) nach Langzeitinkubation mit A β_{25-35}

(A) Die 6-tägige Behandlung der Zellen mit $\geq 1 \mu\text{M}$ A β_{25-35} führte zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung aus den Kulturen ($n = 4$). (B) Zu diesem Zeitpunkt bewirkte A β_{25-35} ($10 \mu\text{M}$) auch eine signifikante mitochondriale Depolarisation ($n = 4$).

Unter Verwendung einer A β_{25-35} -Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde nun untersucht, inwieweit LDH-Freisetzung, Morphologie und $\Delta\psi_m$ der A β_{25-35} -behandelten Kulturen durch MC beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass eine Ko-Inkubation mit MC die Zellen nicht vor den toxischen Wirkungen des Peptides schützen kann. So bewirkte MC im Langzeitmodell sogar einen minimalen Anstieg der LDH-Freisetzung ($p \gg 0,05$, $n = 4$; Abb. 3.9A). Zudem führte eine Behandlung mit MC ($25 \mu\text{M}$) zu einer geringfügig stärkeren Depolarisation der A β_{25-35} -behandelten Kulturen ($p > 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.9B).

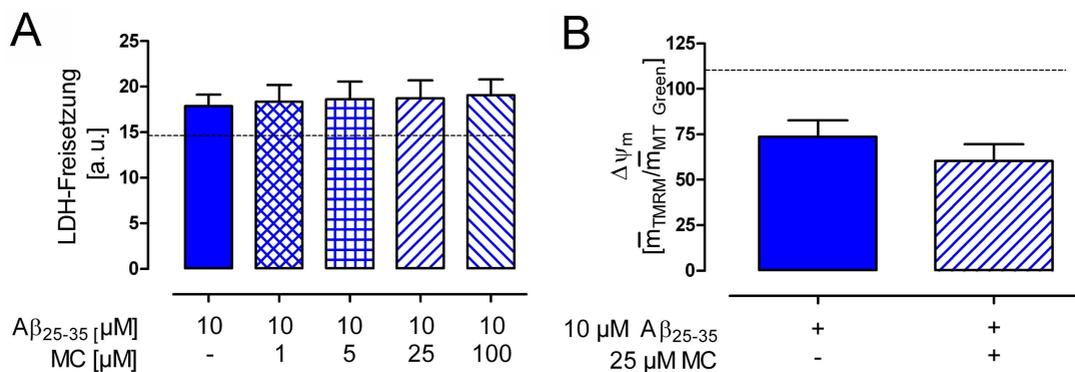


Abb. 3.9: Effekt von Minozyklin auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) A β_{25-35} -behandelter Zellen

(A) Die durch A β_{25-35} erhöhte LDH-Freisetzung konnte durch MC nicht verringert werden ($n = 4$). (B) Auch die mittels A β_{25-35} -Behandlung ausgelöste mitochondriale Depolarisation wurde durch MC nicht aufgehoben ($n = 4$). Es zeigte sich sogar, dass die Langzeitbehandlung mit $25 \mu\text{M}$ MC das mitochondriale Membranpotential A β_{25-35} -behandelter Kulturen weiter absenkt ($p > 0,05$, $n = 3$). (A, B) Gestrichelte Linien kennzeichnen die LDH-Freisetzung bzw. $\Delta\psi_m$ der Vehikel-behandelten Kontrollen.

Auch morphologisch bestätigte sich die ausbleibende Schutzwirkung von MC gegenüber der A β_{25-35} -vermittelten Toxizität. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, hatten die Vehikel-behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung (9 – 12 DIV) ein charakteristisches

dendritisches Netzwerk ausgebildet (Abb. 3.10A). Dieses war in den $A\beta_{25-35}$ -behandelten Kulturen fast vollständig aufgelöst (Abb. 3.10B). Ko-Inkubation mit 25 μM MC hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der $A\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen (Abb. 3.10C).

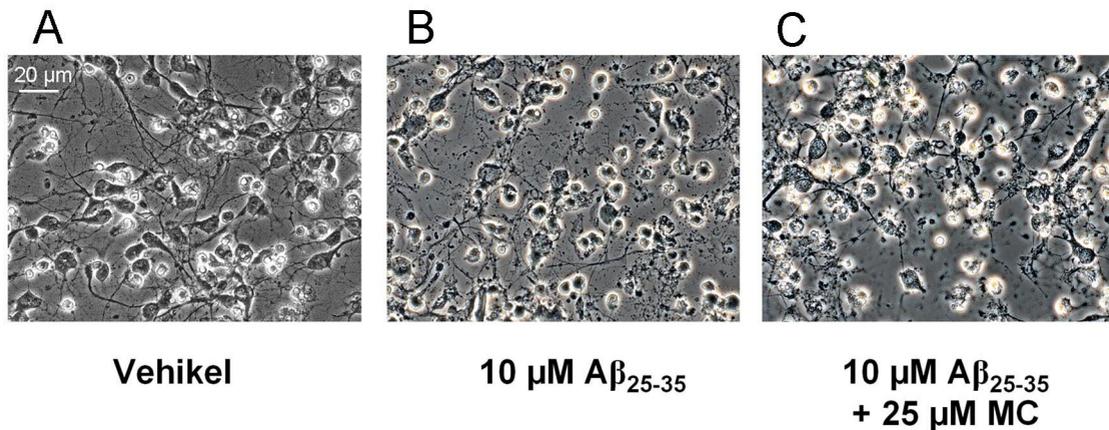


Abb. 3.10: Phasenkontrastaufnahmen $A\beta_{25-35}$ -behandelter Kulturen nach 6-tägiger Inkubationszeit

(A) Nach 9 – 12 *days in vitro* (DIV) ist in den Vehikel-behandelten Kulturen das dendritische Netzwerk gut ausgebildet. Wenige tote Zellen sind sichtbar. (B) Nach 6-tägiger Inkubation mit $A\beta_{25-35}$ ist das Netzwerk beinahe vollständig zerstört, es sind nur wenige Zellen mit langen Ausläufern verblieben. Ein großer Teil der Zellen ist abgestorben. (C) Die Ko-Inkubation mit 25 μM MC hatte keinerlei protektiven Effekt auf die Morphologie der $A\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen.

Obwohl MC die zelluläre MTT-Reduktion nach $A\beta_{25-35}$ -Behandlung wiederherzustellen vermochte, konnten also keine protektiven Effekte des Antibiotikums gegenüber der $A\beta_{25-35}$ -vermittelten Neurotoxizität beobachtet werden. Um zu klären, ob die fehlende Schutzwirkung des MC Aussagen über seinen Einfluss auf den Öffnungszustand der mPTP erlaubt, sollte zum Abschluss untersucht werden, inwieweit die Aktivierung dieser Pore an der $A\beta_{25-35}$ -vermittelten Neurotoxizität beteiligt war. Als Referenzsubstanz diente der klassische mPTP-Inhibitor Cyclosporin A (CsA).

Es wurde festgestellt, dass CsA die durch 6-tägige Behandlung mit 10 μM $A\beta_{25-35}$ bewirkte Erhöhung der LDH-Freisetzung nicht hemmen konnte ($p \gg 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.11 A). Bei der Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials ergab sich sogar, dass CsA die depolarisierende Wirkung des $A\beta_{25-35}$ auf die Mitochondrien signifikant verstärkte ($p < 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.11B).

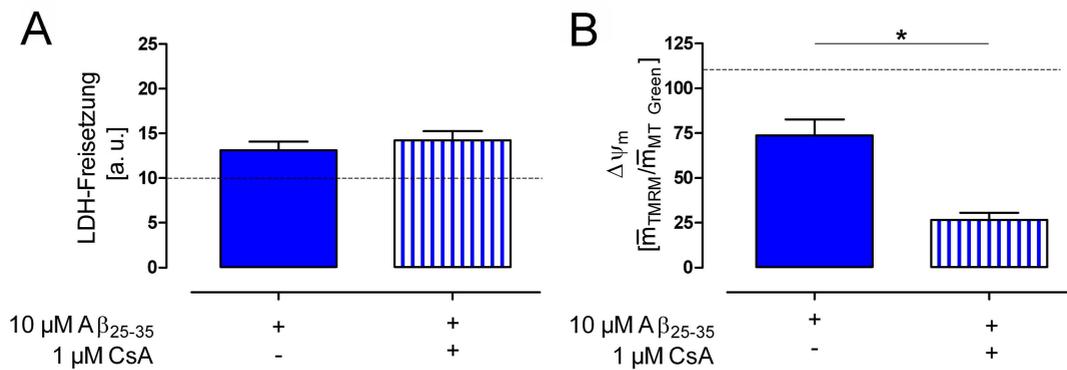


Abb. 3.11: Effekt einer Blockade der mPTP auf die LDH-Freisetzung und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) $A\beta_{25-35}$ -behandelter Zellen

(A) Behandlung der Zellen mit dem klassischen mPTP-Inhibitor CsA (1 μ M) hatte keinen Einfluss auf die $A\beta_{25-35}$ -induzierte LDH-Freisetzung (n = 4). (B) Die durch 6-tägige Behandlung mit $A\beta_{25-35}$ ausgelöste mitochondriale Depolarisation wurde durch CsA signifikant verstärkt (p < 0,05, n = 3). (A, B) Gestrichelte Linien kennzeichnen die LDH-Freisetzung bzw. $\Delta\psi_m$ der Vehikel-behandelten Kontrolle.

3.2 Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien

Die oben dargestellten Daten zeigen, dass in dem gewählten Zellkulturmodell eine Blockade der mPTP nicht protektiv wirkt. Somit kann aus den Ergebnissen keine Aussage über die Wirkung des MC auf die mPTP gezogen werden. Die Frage, inwieweit MC den Öffnungszustand der mPTP moduliert, sollte daher im Folgenden an isolierten Mitochondrien untersucht werden.

3.2.1 Untersuchungen an Lebermitochondrien

Aus Lebergewebe lassen sich Mitochondrien schnell und mit hoher Ausbeute isolieren. Zudem sind sie im Vergleich zu Hirnmitochondrien relativ lange haltbar und schwellen nach Ca^{2+} -Zugabe deutlich stärker an. Da die Arbeit mit Hirnmitochondrien recht problematisch ist, werden Lebermitochondrien häufig als Modell für neurodegenerative Prozesse benutzt. Auch in dieser Arbeit wurden daher die Wirkmechanismen von MC auf Mitochondrien zunächst an Lebermitochondrien detailliert untersucht.

3.2.1.1 In Saccharose-Medium verhindert Minozyklin die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung von Rattenlebermitochondrien

Experimente an isolierten Lebermitochondrien werden üblicherweise in Saccharose- (bzw. Mannit-) oder KCl-basierten Medien durchgeführt. Um zu überprüfen, inwieweit die kontroversen Ergebnisse bezüglich der Wirkung von MC auf Mitochondrien auf die Be-

nutzung verschiedener Inkubationsmedien zurückzuführen sind, sollte der Effekt von MC auf Rattenlebermitochondrien (RLM) in der vorliegenden Arbeit in beiden Medien untersucht werden. Im Folgenden sind zunächst die in Saccharose-Medium erzielten Ergebnisse dargestellt.

Der Einfluss von MC auf den Öffnungszustand der mPTP wurde zuerst anhand seiner Wirkung auf das Schwellungsverhalten von Mitochondrien getestet. Bei Öffnung der mPTP, bspw. durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen, kommt es zu einem Anschwellen der Mitochondrien, was sich in einer Abnahme der Absorption bemerkbar macht (Abb. 3.12A). Durch Blockade der mPTP mittels CsA lässt sich diese Schwellung verhindern. Anhand dieses Modells sollte nun untersucht werden, wie MC die Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung beeinflussen kann. Es stellte sich heraus, dass MC in hohen Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) die durch Ca^{2+} -Ionen hervorgerufene Absorptionsabnahme reduziert. Während in Kontrollmitochondrien die Absorption 10 min nach Ca^{2+} -Zugabe auf einen Wert von $56,8 \pm 4,7 \%$ des Startwertes abgesunken war, betrug dieser Endwert nach Vorinkubation mit $100 \mu\text{M}$ MC $86,7 \pm 10,2 \%$ ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 4$) und bei Verwendung von $200 \mu\text{M}$ MC $114,1 \pm 11,4 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle, $n = 4$). Die Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ MC im Inkubationsmedium beeinflusste die Ca^{2+} -induzierte Schwellung nicht signifikant ($68,4 \pm 6,3 \%$, $p > 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 4$). Wichtig ist hierbei anzumerken, dass die Zugabe von MC selbst die Absorption der Mitochondriensuspension nicht veränderte (Abb. 3.12B).

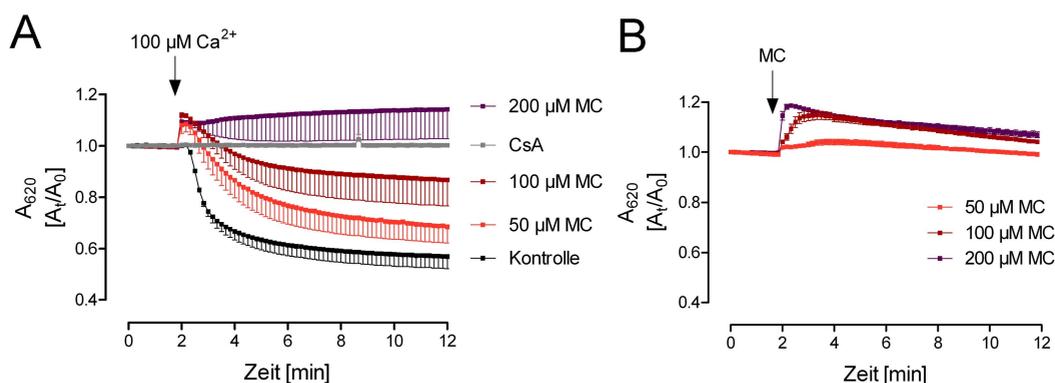


Abb. 3.12: Einfluss von Minozyklin auf die Ca^{2+} -induzierte Schwellung von Lebermitochondrien (A) Die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} zu RLM bewirkte ein starkes Anschwellen der Mitochondrien, welches sich in einer Absorptionsabnahme der Mitochondriensuspension bemerkbar machte. Die Vorbehandlung (5 min) der RLM mit dem mPTP-Inhibitor CsA verhinderte die Ca^{2+} -induzierte Schwellung vollständig. Auch MC inhibierte konzentrationsabhängig die durch Ca^{2+} verursachte Absorptionsabnahme. (B) MC selbst hatte in Konzentrationen bis $200 \mu\text{M}$ keinen Einfluss auf die Absorption der Mitochondriensuspension. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 Präparationen.

Es ist bekannt, dass die Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung neben einer Schwellung der Mitochondrien auch die Freisetzung des pro-apoptotischen Proteins Cytochrom c aus dem In-

termembranraum in das Zytosol bewirkt. Um zu überprüfen, ob MC diese Translokation verhindern kann, wurde mittels *Western Blot* der Cytochrom c-Gehalt innerhalb der Mitochondrien und im Inkubationsmedium bestimmt. Wie in Abbildung 3.13A dargestellt, wurde aus Kontrollmitochondrien im Laufe der 30-minütigen Inkubationszeit kein Cytochrom c freigesetzt; das gesamte Cytochrom c verblieb im Pellet (mitochondriale Fraktion). Die Translokation des pro-apoptotischen Faktors konnte jedoch durch Behandlung mit 100 μM Ca^{2+} stimuliert werden. Es zeigte sich nun eine deutliche Bande in der extramitochondrialen Fraktion (Überstand), während im Pellet kaum Cytochrom c nachzuweisen war. Die Ca^{2+} -induzierte Freisetzung war durch 1 μM CsA inhibierbar ($p < 0,001$, $n = 4$). MC hatte in hohen Konzentrationen einen ähnlichen Effekt: Die 5-minütige Vorbehandlung mit 100 bzw. 200 μM MC bewirkte eine signifikante Verringerung der Cytochrom c-Freisetzung auf $34,0 \pm 11,0\%$ bzw. $39,9 \pm 6,3\%$ der Kontrolle (nur Ca^{2+} , jeweils $p < 0,001$, $n = 4$; Abb. 3.13B).

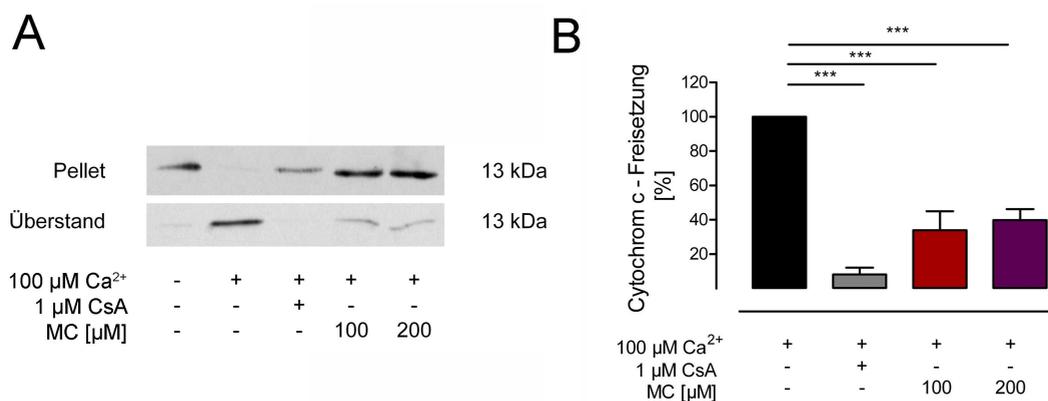


Abb. 3.13: Modulation der Ca^{2+} -induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus isolierten Lebermitochondrien durch Minozyklin

(A) Nachweis von Cytochrom c im Pellet sowie Überstand einer Mitochondriensuspension nach Behandlung mit Ca^{2+} . Deutlich zu sehen ist, dass das Cytochrom c in Kontrollmitochondrien (keine Ca^{2+} -Zugabe) beinahe vollständig im Pellet, d.h. innerhalb der Mitochondrien, verblieben ist. Ca^{2+} -Zugabe bewirkte eine Translokation in den Überstand, d.h. in den extramitochondrialen Raum. Diese Freisetzung des pro-apoptotischen Proteins konnte durch Vorbehandlung mit CsA oder MC verhindert werden (repräsentativer *Western Blot*, gesamt: 4 Präparationen). (B) Die Quantifizierung ergab, dass eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit CsA oder MC die Ca^{2+} -induzierte Cytochrom c-Freisetzung signifikant reduzierte ($n = 4$).

Die Untersuchung von Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität (Ca^{2+} -retention capacity, CRC) der Mitochondrien erfolgte simultan mit Hilfe der Farbstoffe Safranin-O ($\Delta\psi_m$) sowie Calcium Green (CaG). Abbildung 3.14A soll zunächst das Versuchsprinzip verdeutlichen. 30 s nach Versuchsbeginn wurden dem Medium Mitochondrien zugesetzt. Diese nahmen aufgrund ihres Membranpotentials sowohl Ca^{2+} -Ionen als auch einen Teil des Safranin-O auf. Es kam daher wegen der Abnahme der extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration sowie der Akkumulation des Safranin-O innerhalb der Mitochondrien

(*Quenching*) zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe. Die Zugabe von $25 \mu\text{M Ca}^{2+}$ führte nun zu einem Anstieg der extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration, die sich jedoch aufgrund der Akkumulation überschüssiger Ca^{2+} -Ionen durch die Mitochondrien anschließend wieder verringerte. Im Zuge dieser Ca^{2+} -Aufnahme stieg transient auch die Safranin-O-Fluoreszenz, da die Aufnahme positiver Ladung zu einer partiellen Depolarisation der Mitochondrien führt. Durch Wirkung der Atmungskette konnte die überschüssige positive Ladung wieder hertransportiert werden und die Mitochondrien repolarisierten. Die vierte Zugabe von $25 \mu\text{M Ca}^{2+}$ führte dann zu einem Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ sowie zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den Mitochondrien. Dass dieser Effekt mPTP-vermittelt war, wird in Abb. 3.14B verdeutlicht: CsA-behandelte Mitochondrien konnten mehr als $250 \mu\text{M Ca}^{2+}$ aufnehmen, das Membranpotential blieb intakt.

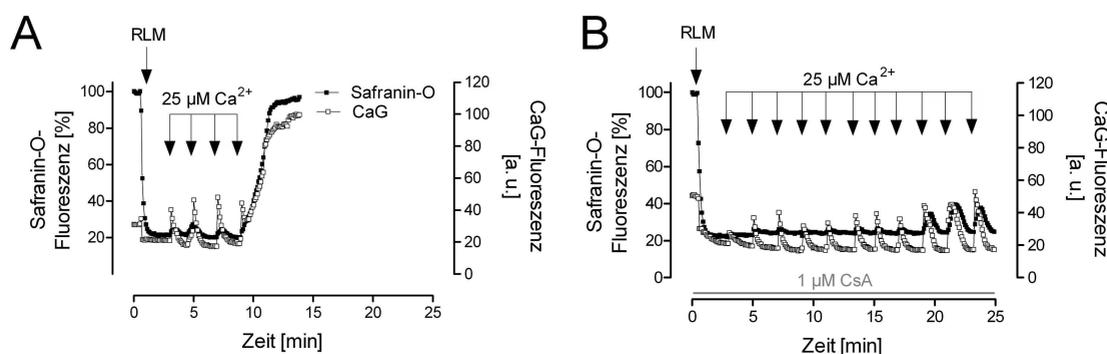


Abb. 3.14: Fluorometrische Bestimmung von Membranpotential und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität – Versuchsprinzip

Die Bestimmung von $\Delta\psi_m$ (geschlossene Symbole) und Ca^{2+} -Aufnahmekapazität (offene Symbole) erfolgte simultan. (A) Zugabe von RLM bewirkte zunächst aufgrund der $\Delta\psi_m$ -abhängigen Aufnahme des Farbstoffes in die Mitochondrien eine drastische Abnahme der Safranin-O-Fluoreszenz. Durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen erhöhte sich die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration (CaG-Fluoreszenz) transient. Mit Aufnahme der überschüssigen Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien kam es zu einer vorübergehenden Depolarisation der Mitochondrien (Erhöhung der Safranin-O-Fluoreszenz) und der extramitochondriale Ca^{2+} -Spiegel sank wieder auf den Ausgangswert. Nach der vierten Zugabe von $25 \mu\text{M Ca}^{2+}$ brach $\Delta\psi_m$ jedoch zusammen und das in den Mitochondrien gespeicherte Ca^{2+} wurde freigesetzt. (B) Der Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ und die damit verbundene Ca^{2+} -Freisetzung ließ sich durch CsA inhibieren. Nach Vorbehandlung mit dem mPTP-Hemmstoff konnten die Mitochondrien mehr als $250 \mu\text{M Ca}^{2+}$ aufnehmen, ohne dass dies eine anhaltende Depolarisation der RLM bewirkte.

Im Folgenden wurde nun der Effekt von MC auf das Membranpotential und die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität der Lebermitochondrien überprüft. Wie in Abb. 3.15A dargestellt, bewirkte die Zugabe von MC zunächst eine transiente Abnahme der Safranin-O-Fluoreszenz. Bei Verwendung hoher MC-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) folgte ein geringer Anstieg des Signals. Die initiale Verminderung der Fluoreszenzintensität war auch in Antimycin A-behandelten Mitochondrien zu beobachten (Abb. 3.15B), also in nicht-atmenden und somit vollständig depolarisierten Mitochondrien. Der bei hohen MC-Konzentrationen beobachte-

te Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz konnte durch solch unspezifische Wirkungen des MC jedoch nicht erklärt werden, sondern deutet auf eine geringfügige, durch MC induzierte Depolarisation der Mitochondrien hin.

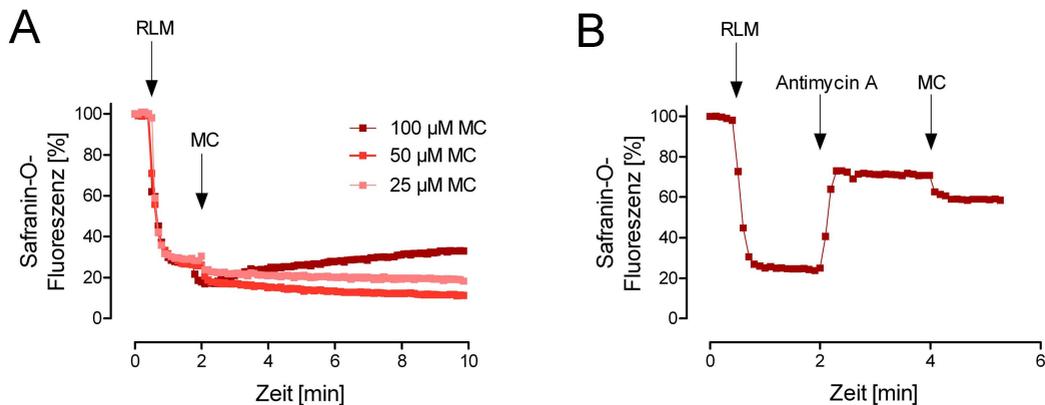


Abb. 3.15: Effekt einer Minozyklin-Behandlung auf das Membranpotential von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium

(A) Die Zugabe von MC bewirkte zunächst eine geringfügige Abnahme der Safranin-O-Fluoreszenz. Bei hohen MC-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) folgte anschließend eine langsame Erhöhung des Safranin-O-Signals. (B) Die initial beobachtete Reduktion der Fluoreszenzintensität durch MC trat auch in Antimycin A-behandelten, d.h. vollständig depolarisierten, Mitochondrien auf. Es lässt sich daher ausschließen, dass die Abnahme der Safranin-O-Fluoreszenz auf einer Hyperpolarisation der Mitochondrien beruhte. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Präparation (gesamt: 4 Präparationen).

Die Analyse der CaG-Fluoreszenz ergab, dass eine Vorbehandlung der RLM mit MC die Ca^{2+} -Aufnahme drastisch reduzierte (Abb. 3.16). Bei Verwendung von 50 bzw. 100 μM bewirkte MC einen kompletten Zusammenbruch der Ca^{2+} -Retention, es wurden keine Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien aufgenommen. Nach Vorbehandlung mit niedrigeren Konzentrationen des Antibiotikums konnten die Mitochondrien einen Teil der zugegebenen Ca^{2+} -Ionen akkumulieren, aber in deutlich geringerem Ausmaß als unbehandelte RLM.

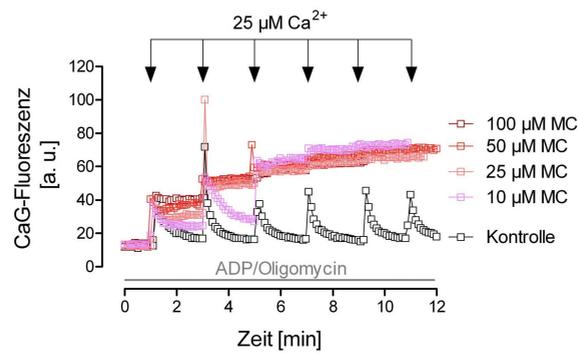


Abb. 3.16: Einfluss von Minozyklin auf die Ca²⁺-Aufnahmekapazität von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium

Eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit MC verringerte die CRC in starkem Maße. Selbst bei Verwendung einer MC-Konzentration von 10 µM konnten die Mitochondrien nur noch einen geringen Anteil der zugegebenen Ca²⁺-Ionen aufnehmen. Die Versuche erfolgten in Anwesenheit von 200 µM ADP und 1 µg/ml Oligomycin im Medium, um eine Öffnung der mPTP zu verhindern. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Präparation (gesamt: 4 Präparationen).

Diese Daten zeigen, dass MC das Membranpotential zwar nur geringfügig beeinflusst, aber dennoch die Ca²⁺-Aufnahme der Mitochondrien stark verlangsamt. Diese Blockade der Ca²⁺-Aufnahme könnte auf eine Hemmung des mitochondrialen Ca²⁺-Uniporters zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde im Folgenden untersucht, wie sich Membranpotential und extramitochondriale Ca²⁺-Konzentration verhalten, wenn MC-behandelten Mitochondrien externes Ca²⁺ zugegeben wird. Wie in Abbildung 3.17A dargestellt, brach das mitochondriale Membranpotential isolierter RLM nach Vorbehandlung mit 25 µM MC zusammen, sobald 25 µM Ca²⁺ zugegeben wurden. Im Gegensatz dazu wurde $\Delta\psi_m$ durch Ca²⁺-Ionen nicht beeinflusst, wenn die Mitochondrien vorab mit Rutheniumrot (RuR), einem Hemmstoff des mitochondrialen Ca²⁺-Uniporters, behandelt worden waren (Abb. 3.17B). Zudem zeigte sich, dass mit 25 µM Ca²⁺ vorbeladene Mitochondrien sofort depolarisierten, sobald MC (25 µM) zugegeben wurde (Abb. 3.17C). Überdies induzierte die MC-Gabe in diesem Fall die Freisetzung des in den Mitochondrien akkumulierten Ca²⁺. Der mPTP-Inhibitor CsA beeinflusste diese Wirkung des MC nicht (Abb. 3.17D).

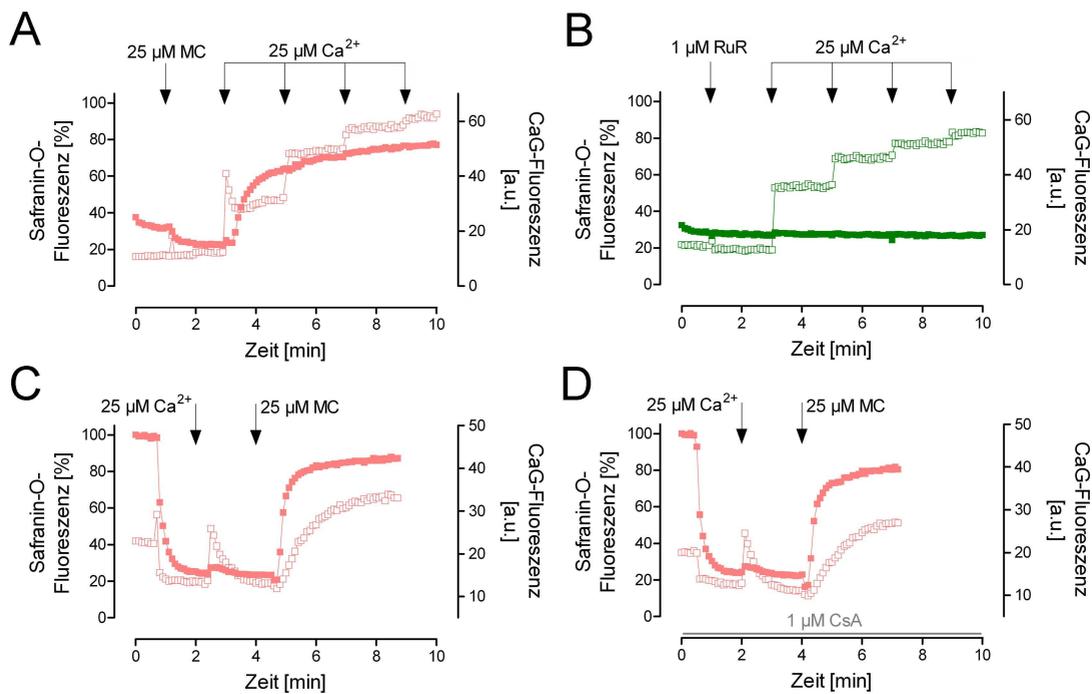


Abb. 3.17: Wechselwirkung von Minoxidil und Ca²⁺-Ionen auf das Membranpotential und die Ca²⁺-Homöostase von Lebermitochondrien in Saccharose-basiertem Medium

Dargestellt sind die Ergebnisse an einer repräsentativen Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen). Geschlossene Symbole kennzeichnen die Safranin-O-Fluoreszenz, offene Symbole die extramitochondriale Ca²⁺-Konzentration. (A) Nach Behandlung der RLM mit 25 μM MC konnte durch Ca²⁺-Ionen weiterhin eine mitochondriale Depolarisation ausgelöst werden. Bereits die erste Zugabe von 25 μM Ca²⁺ bewirkte einen vollständigen Zusammenbruch von Δψ_m; diese Depolarisation trat in unbehandelten RLM erst bei sehr viel höheren Ca²⁺-Konzentrationen auf (vergleiche Abb. 3.14A). (B) Hingegen bewirkte eine Behandlung mit Rutheniumrot (RuR), dass Δψ_m trotz mehrfacher Zugabe von Ca²⁺-Ionen stabil blieb. (C) Mit 25 μM Ca²⁺ vorbeladene Mitochondrien depolarisierten, sobald ihnen MC (25 μM) zugegeben wurde. Zudem induzierte MC die Freisetzung des bereits in den RLM akkumulierten Ca²⁺. (D) Die Wirkung von MC auf Ca²⁺-beladene RLM war nicht durch CsA modulierbar.

3.2.1.2 In KCl-basiertem Medium induziert Minoxidil eine mitochondriale Schwellung, Depolarisation und Cytochrom c-Freisetzung

Nach Charakterisierung der Effekte von MC auf in Saccharose-Medium inkubierte RLM sollte die Wirkung des MC nun auch in KCl-basiertem Medium untersucht werden. Wiederum wurde zunächst überprüft, ob MC das Schwellungsverhalten der Mitochondrien beeinflusst. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Saccharose-Medium bewirkte die Zugabe von MC selbst bereits eine deutliche Schwellung von Lebermitochondrien, wenn diese in KCl-Medium suspendiert waren (Abb. 3.18A). Dieser Effekt war dosisabhängig und trat ab einer Konzentration von ≥ 25 μM auf. Um zu testen, ob die MC-induzierte mitochondriale Schwellung auf eine Öffnung der mPTP zurückzuführen war, wurden die Experimente in Anwesenheit des mPTP-Inhibitors CsA (1 μM) wiederholt (Abb. 3.18B). Es zeigte sich, dass CsA die durch 100 μM MC induzierte Schwellung nicht verhindern konnte. Während

in Abwesenheit des mPTP-Inhibitors die Zugabe von 100 μM MC eine Absorptionsabnahme auf $72,0 \pm 4,8 \%$ bewirkte, betrug dieser Endwert nach Vorinkubation mit CsA $82,7 \pm 8,7 \%$ ($p > 0,05$, $n = 3$). Auch die beiden weiteren getesteten mPTP-Inhibitoren Bongkreksäure (BA; $76,9 \pm 13,4 \%$; $p > 0,05$, $n = 3$) und Ro 68-3400 ($60,1 \pm 1,5 \%$; $p > 0,05$, $n = 3$) inhibierten die durch MC hervorgerufene Schwellung nicht (Abb. 3.18B). Zum Vergleich zeigen die Abbildungen 3.18C und D die Ca^{2+} -induzierte, d.h. mPTP-vermittelte, Schwellung von Lebermitochondrien. Diese war durch 1 μM CsA komplett blockierbar (Abb. 3.18D), ebenso durch 1 μM Ro 68-3400 (mPTP-Inhibitor, der an den VDAC angreift). Die Vorbehandlung der Mitochondrien mit 20 μM BA (inhibiert die mPTP durch Stabilisierung des ANT) konnte die Ca^{2+} -induzierte Schwellung nicht vollständig blockieren, verlangsamte sie aber deutlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MC-induzierte Schwellung der Lebermitochondrien im Gegensatz zur Ca^{2+} -induzierten nicht auf eine Öffnung der mPTP zurückzuführen war.

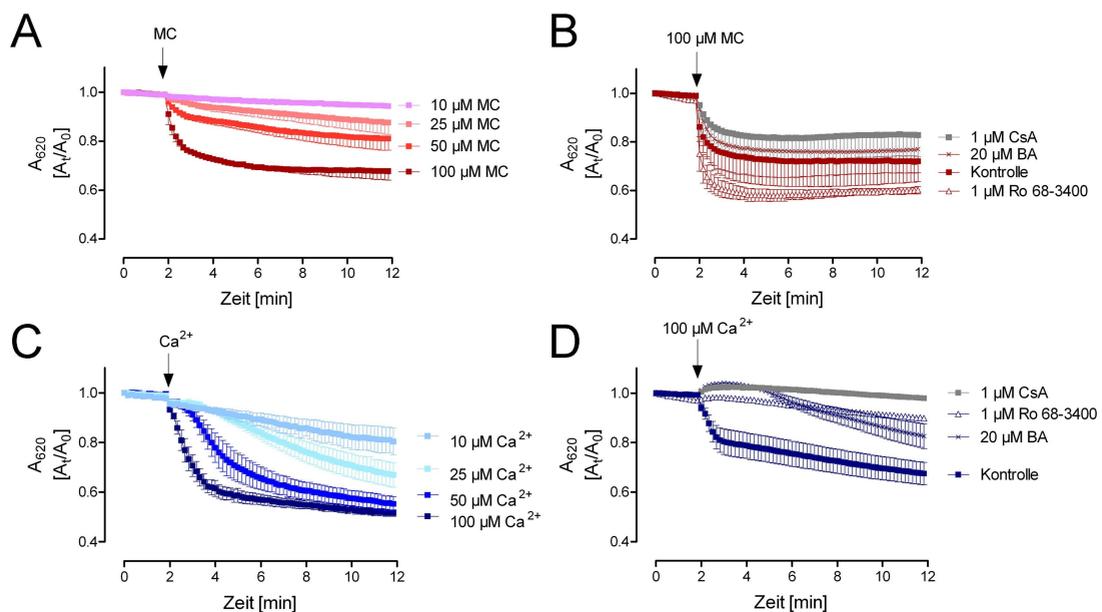


Abb. 3.18: Vergleich von Minozyklin- und Ca^{2+} -induzierter Schwellung und Wirksamkeit verschiedener mPTP-Inhibitoren

(A) In KCl-basiertem Medium bewirkte die Zugabe von MC zu RLM eine konzentrationsabhängige Absorptionsabnahme ($n = 5$). (B) Diese war durch die mPTP-Hemmstoffe CsA, Bongkreksäure (BA) sowie Ro 68-3400 nicht inhibierbar ($n = 5$). (C, D) Im Gegensatz zur MC-induzierten Schwellung war die durch Ca^{2+} -Ionen verursachte Absorptionsabnahme durch alle drei Inhibitoren zu blockieren ($n = 3$).

Auch die Phosphatabhängigkeit der MC-induzierten Schwellung unterstützt diese Annahme: Wie in Abbildung 3.19A zu sehen, war die MC-induzierte Absorptionsabnahme maximal in Abwesenheit von Phosphat und verringerte sich mit steigender Phosphatkonzentration. Hingegen ergab sich bei Untersuchung der Ca^{2+} -induzierten Schwellung, dass diese bei höheren Phosphatkonzentrationen ausgeprägter war. In Abwesenheit an-

organischen Phosphates bewirkte die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen hingegen nur eine geringe Absorptionsabnahme (Abb. 3.19B).

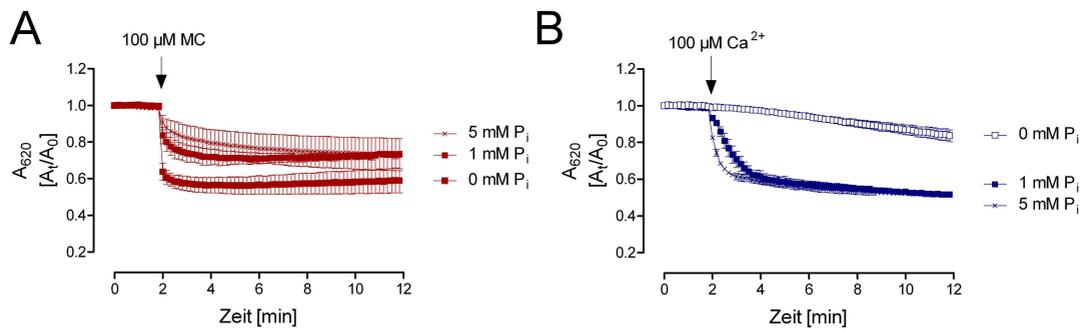


Abb. 3.19: Vergleich der Phosphatabhängigkeit von Minozyklin- und Ca^{2+} -induzierter Schwellung von Lebermitochondrien

(A) Die MC-induzierte Schwellung war maximal in Abwesenheit von Phosphat und verringerte sich mit steigender Phosphatkonzentration im Medium ($n = 3$). (B) Im Gegensatz dazu steigerte sich das Ausmaß der durch $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} verursachten Schwellung mit steigender Phosphatkonzentration ($n = 5$). Die Abwesenheit von Phosphationen im Medium blockierte die Ca^{2+} -induzierte Schwellung fast vollständig.

Von Interesse war nun die Frage, ob die Verursachung mPTP-unabhängiger mitochondrialer Schwellung eine spezifische Eigenschaft des MC ist oder ob andere Tetrazykline dieselbe Wirkung haben. Es zeigte sich, dass Tetrazyklin selbst in Konzentrationen bis 1 mM die Absorption einer Mitochondriensuspension nicht änderte (Abb. 3.20). Hingegen induzierte Sanzyklin, das dem MC strukturell näher verwandt ist, ebenfalls eine mitochondriale Schwellung. Chloramphenicol, ein Antibiotikum einer anderen Wirkstoffklasse, verursachte keine Absorptionsabnahme.

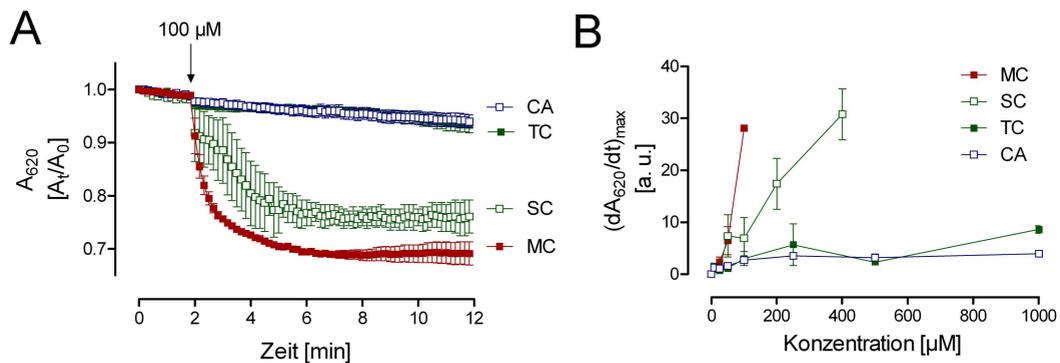


Abb. 3.20: Einfluss verschiedener Antibiotika auf das Schwellungsverhalten isolierter Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium

(A) In einer Konzentration von 100 μM veränderten Chloramphenicol (CA) und Tetrazyklin (TC) die Absorption einer Mitochondriensuspension nicht. Im Gegensatz dazu zeigte Sanzyklin (SC) ein ähnliches Verhalten wie MC: Es induzierte eine starke mitochondriale Schwellung (jeweils $n = 4$). (B) Die Konzentrationsreihe zeigt, dass CA und TC bis zu einer Konzentration von 1 mM keine Absorptionsabnahme bewirkten. Im Gegensatz dazu glich die Konzentrationsabhängigkeit der SC-induzierten Schwellung der des MC (jeweils $n = 4$).

Um zu überprüfen, inwieweit die MC-induzierte Schwellung mit einer Translokation von Cytochrom c verbunden ist, wurde im Folgenden der Effekt von Ca^{2+} -Ionen sowie MC auf die Freisetzung dieses pro-apoptotischen Proteins aus isolierten Mitochondrien untersucht. Ähnlich wie in Saccharose-basiertem Medium (Abb. 3.13A) zeigte sich auch hier, dass das Cytochrom c in unbehandelten Mitochondrien fast vollständig in der mitochondrialen Fraktion (Pellet) verbleibt (Abb. 3.21). Durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen konnte die Translokation des Proteins in den Überstand induziert werden; CsA blockierte diesen Prozess. Inkubation der Mitochondrien mit 100 μM MC verursachte ebenfalls eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. In Übereinstimmung mit der MC-induzierten Schwellung war dieser Effekt jedoch nicht durch CsA blockierbar.

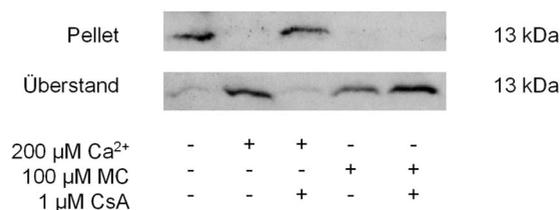


Abb. 3.21: Cytochrom c-Freisetzung durch Ca²⁺-Ionen und Minozyklin in KCl-basiertem Medium

In Kontrollmitochondrien (keine Ca²⁺-Zugabe) verblieb das Cytochrom c beinahe vollständig im Pellet, also intramitochondrial. Ca²⁺-Zugabe bewirkte eine Translokation in die extramitochondriale Fraktion. Diese Freisetzung des pro-apoptischen Proteins konnte durch Vorbehandlung mit CsA verhindert werden und war demnach mPTP-vermittelt. Auch durch Behandlung der RLM mit 100 μM MC wurde eine Translokation von Cytochrom c induziert. Im Gegensatz zur Ca²⁺-abhängigen Cytochrom c-Freisetzung war diese jedoch nicht durch CsA blockierbar (repräsentative Daten aus einer Mitochondrienpräparation, gesamt: 5 Präparationen)

Der Verlust von Cytochrom c aus MC-behandelten RLM könnte dazu führen, dass auch die Funktion der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigt wird. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde das MTT-Reduktionsvermögen der isolierten Mitochondrien untersucht. Es zeigte sich, dass MC konzentrationsabhängig die MTT-Reduktion isolierter RLM inhibiert (Abb. 3.22). Die Formazanbildung sank durch Behandlung mit 10, 25, 50 bzw. 100 μM MC auf 89,6 ± 3,4 % (p < 0,05, n = 5), 70,9 ± 10,6 % (p > 0,05, n = 5), 53,0 ± 6,7 % (p < 0,01, n = 5) bzw. 47,3 ± 6,5 % (p < 0,01, n = 5) der Kontrolle. Interessanterweise hatte MC keinen Effekt auf die MTT-Reduktion, wenn die Mitochondrien in Saccharose-basiertem Medium inkubiert worden waren (Abb. 3.22).

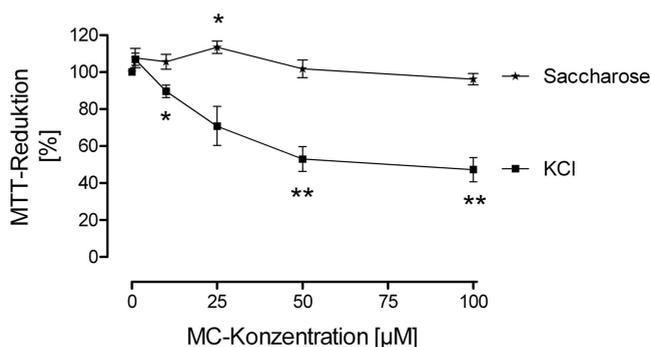


Abb. 3.22: Effekt von Minozyklin auf die MTT-Reduktion isolierter Lebermitochondrien in KCl- und Saccharose-basiertem Medium

MC verringerte die Fähigkeit der RLM, MTT zu Formazan zu reduzieren, wenn diese in KCl-basiertem Medium suspendiert worden waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein solcher Effekt bei Inkubation der Mitochondrien in Saccharose-basiertem Medium (n = 5).

Die bisher erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass MC eine toxische Wirkung auf Mitochondrien hat, insbesondere, wenn diese in einem ionischen, also physiologischeren Medium inkubiert werden. Der schädliche Effekt ließ sich jedoch nicht durch eine Öffnung der mPTP erklären. Um Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten,

wurde im Folgenden der Einfluss von MC auf $\Delta\psi_m$ sowie die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahmekapazität untersucht.

Wie in Abbildung 3.23A dargestellt, kam es nach Zugabe von 100 μM MC zu einem starken Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz. Diese MC-induzierte Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials war deutlich ausgeprägter als die in Saccharose-Medium beobachtete Depolarisation (vergl. Abb. 3.15). So genügte eine MC-Konzentration von 10 μM , um einen (verzögerten) Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz zu bewirken. Wiederum hatte die Vorbehandlung der Mitochondrien mit dem mPTP-Inhibitor CsA keinen Einfluss auf die MC-induzierte Depolarisation (Abb. 3.23B).

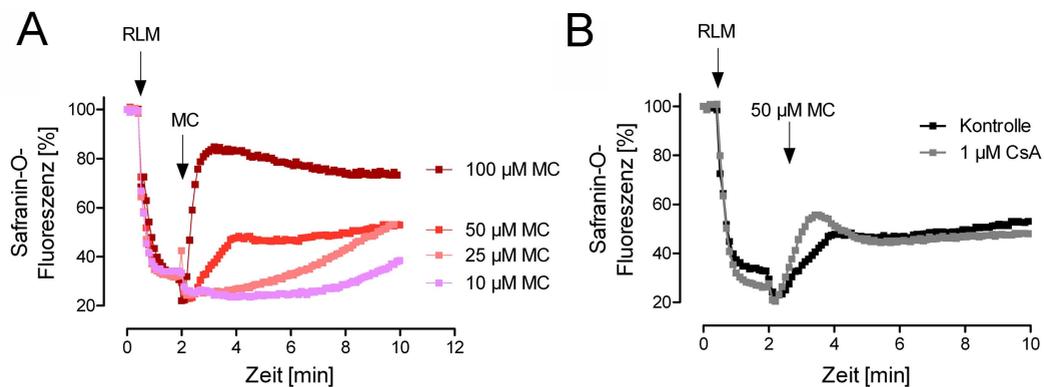


Abb. 3.23: Einfluss von Minozyklin auf das Membranpotential von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium

(A) In KCl-basiertem Medium bewirkte die Zugabe von MC eine deutliche Steigerung der Safranin-O-Fluoreszenz, was auf eine Depolarisation der RLM hindeutet. Dieser Effekt des MC trat bereits – wenn auch verzögert – ab einer Konzentration von 10 μM auf. (B) Die durch MC hervorgerufene Absenkung von $\Delta\psi_m$ war durch CsA nicht blockierbar. Dargestellt sind repräsentative Daten an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen).

Im Anschluss wurde überprüft, ob MC die Ca^{2+} -Homöostase der Mitochondrien moduliert. Es zeigte sich, dass MC die mitochondriale Aufnahme extern zugegebener Ca^{2+} -Ionen in starkem Maße beeinträchtigt. Kontrollmitochondrien konnten mehr als 150 μM Ca^{2+} aufnehmen (Abb. 3.24). Hingegen führte bei mit ≥ 10 μM MC behandelten Mitochondrien schon die erste Zugabe von 25 μM Ca^{2+} zu einem starken Anstieg der extramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration. Bereits die Anwesenheit geringer Konzentrationen an MC bewirkte demnach, dass die Mitochondrien nicht mehr in der Lage waren, externes Ca^{2+} zu akkumulieren.

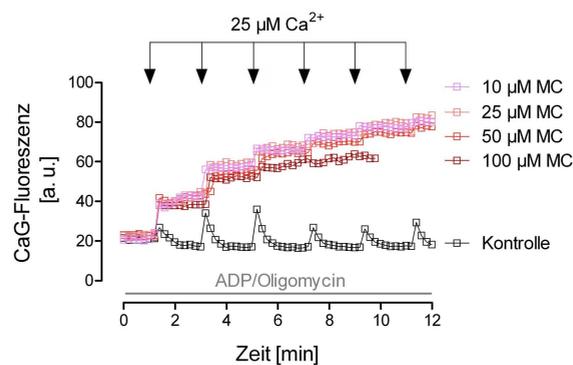


Abb. 3.24: Effekt von Minozyklin auf die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium

Nach Vorinkubation mit MC ($\geq 10 \mu\text{M}$) waren die Mitochondrien nicht mehr in der Lage, zugegebene Ca^{2+} -Ionen aufzunehmen. Hingegen konnten die unbehandelten Kontrollmitochondrien mehr als $150 \mu\text{M Ca}^{2+}$ aufnehmen, ohne dass es zu einer Freisetzung der akkumulierten Ca^{2+} -Ionen kam. Die Versuche erfolgten in Anwesenheit von $200 \mu\text{M ADP}$ und $1 \mu\text{g/ml Oligomycin}$ im Medium, um eine Öffnung der mPTP zu verhindern. Dargestellt sind repräsentative Daten an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen).

3.2.1.3 Minozyklin erhöht die Leitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran für Na^+ -, K^+ - sowie Cl^- -Ionen

Zusammengefasst ergaben die bisherigen Experimente, dass MC die Ca^{2+} -Aufnahme in Mitochondrien unabhängig vom benutzten Inkubationsmedium hemmt. In Saccharose-Medium verhinderte dies die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien. Wurden die Mitochondrien hingegen in KCl-basiertem Medium inkubiert, so traten diese vermeintlich protektiven Wirkungen des MC nicht auf. In diesem Falle war eine starke MC-induzierte Schwellung, Depolarisation und Cytochrom c-Freisetzung zu beobachten. Eine Öffnung der mPTP spielte bei der MC-induzierten Schädigung jedoch keine Rolle. Es stellte sich nun die Frage, wie die unterschiedliche Wirkung von MC auf Lebermitochondrien in den beiden verwendeten Inkubationsmedien zu erklären ist.

Problematisch im Hinblick auf die Interpretation der Daten war dabei zunächst, dass die beiden verwendeten Medien sich in Tris- und EGTA-Konzentrationen unterschieden. Es sollte daher vorab anhand des Schwellungsverhaltens überprüft werden, ob einer dieser Parameter für die ungleiche Wirkung des MC in den beiden Medien verantwortlich ist. Zu diesem Zwecke wurde ein Medium hergestellt, welches mit dem KCl-Medium identisch war, in dem aber 125 mM KCl durch $250 \text{ mM Saccharose}$ ersetzt worden war (siehe 2.1.3). Es zeigte sich, dass MC auch in diesem Medium keine Schwellung verursachte (Abb. 3.25).

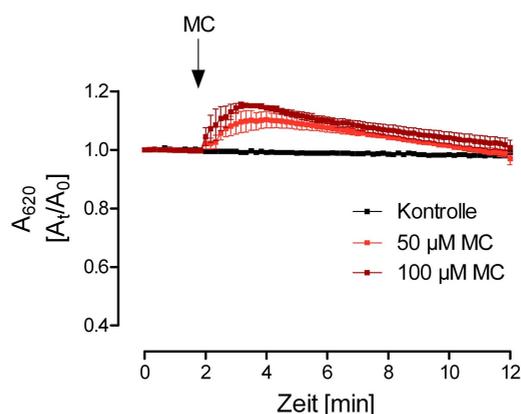


Abb. 3.25: Einfluss von Minozyklin auf das Schwellungsverhalten von Lebermitochondrien in modifiziertem Saccharose-basierten Medium

RLM wurden in einem modifizierten Saccharose-basierten Medium inkubiert. Dieses entsprach in seiner Zusammensetzung dem KCl-basierten Medium, allerdings waren 125 mM KCl durch 250 mM Saccharose ersetzt worden. In diesem modifizierten Saccharose-Medium induzierte MC in Konzentrationen bis 100 μM keine Schwellung der RLM ($n = 4$).

Tatsächlich schien also die Anwesenheit von K^+ - und Cl^- -Ionen für die verstärkt toxischen Effekte des MC in KCl-basiertem Medium verantwortlich zu sein. Die in diesem Medium beobachtete Schwellung der Mitochondrien nach MC-Gabe deutet darauf hin, dass MC die Leitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran für K^+ - und Cl^- -Ionen erhöht. Es stellte sich daher nun die Frage, ob diese Wirkung des MC spezifisch für diese beiden Ionen ist oder ob MC auch die Leitfähigkeit für andere Ionen erhöhen kann. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden die Mitochondrien in verschiedenen Medien inkubiert und das Schwellungsverhalten nach MC-Zugabe beobachtet (Abb. 3.26). Es zeigte sich, dass MC in NaCl-basiertem Medium eine ähnliche Schwellung der Mitochondrien bewirkte wie in KCl-basiertem Medium. Im Gegensatz dazu war die durch MC ausgelöste Schwellung in Cholinchlorid- oder Kaliumgluconat-basiertem Medium deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 3.26A). Die statistische Auswertung der Maximalgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme ergab, dass diese in Cholinchlorid- und Kaliumgluconat-basiertem Medium signifikant verringert war (jeweils $p < 0,001$, $n = 3$; Abb. 3.26B).

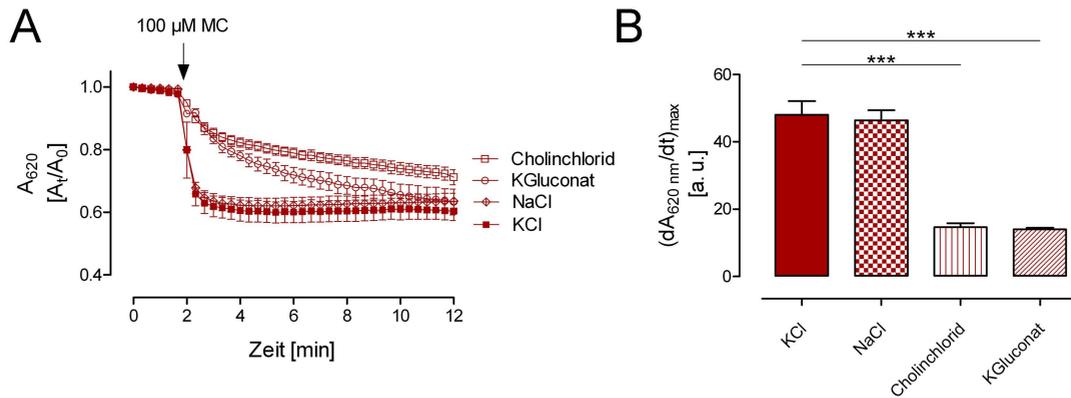


Abb. 3.26: Abhängigkeit der Minozyklin-induzierten Schwellung von der Ionenzusammensetzung des Mediums

(A) In NaCl-basiertem Medium zeigte sich eine MC-induzierte Schwellung, die mit der in KCl-basiertem Medium beobachteten identisch war. Hingegen war die durch MC ausgelöste Absorptionsabnahme deutlich geringer ausgeprägt, wenn die RLM in Cholinchlorid- oder Kaliumgluconat- (KGluconat-) basiertem Medium suspendiert worden waren ($n = 3$). (B) Die statistische Auswertung ergab, dass die MC-induzierte Schwellung in Cholinchlorid- sowie KGluconat-Medium signifikant langsamer erfolgte als in KCl-basiertem Medium. Zwischen KCl- und NaCl-basiertem Medium war hingegen kein Unterschied festzustellen ($n = 3$).

3.2.1.4 Minozyklin induziert eine drastische Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration

Wie lässt sich die aktivierende Wirkung des MC auf die verschiedenen Ionenleitfähigkeiten erklären? Tetrazykline sind in der Lage, Mg^{2+} -Ionen zu komplexieren (Durckheimer, 1975). Mg^{2+} wirkt in der mitochondrialen Matrix als Inhibitor zahlreicher Ionentransportmechanismen; eine Verringerung der endogenen Mg^{2+} -Konzentration wirkt daher aktivierend auf diese Kanäle. Könnte eine Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration auch der in der vorliegenden Arbeit beobachteten MC-induzierten Schwellung zugrunde liegen?

Der Einfluss von MC auf die endogene Mg^{2+} -Konzentration wurde fluorometrisch mit Hilfe des Mg^{2+} -sensitiven Farbstoffes Magnesium Green (MgG) untersucht. Der Farbstoff wurde als membrangängiger Acetoxymethylester verwendet und zeigt daher die Mg^{2+} -Konzentration innerhalb der Mitochondrien an. Wurden RLM in KCl-basiertem Medium inkubiert, so zeigte sich nach MC-Gabe eine konzentrationsabhängige Verringerung des intramitochondrialen Mg^{2+} -Gehaltes (Abb. 3.27). Bei einer Konzentration von 200 μ M hatte MC einen ähnlichen Effekt wie 1 μ M A23187, ein Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionophor (Reed und Lardy, 1972).

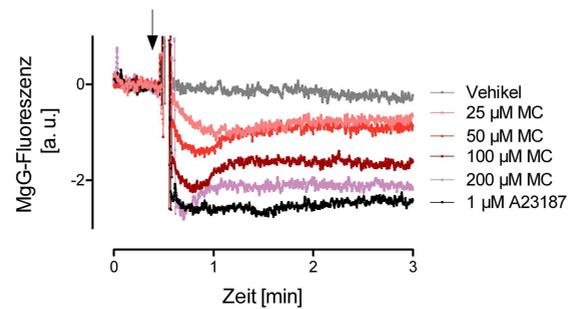


Abb. 3.27: Einfluss von Minozyklin auf die intramitochondriale Mg^{2+} -Konzentration in KCl-basiertem Medium

MC induzierte konzentrationsabhängig eine deutliche Abnahme der MgG-Fluoreszenz von in KCl-basiertem Medium suspendierten RLM. Dies weist auf eine Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration durch MC hin. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen).

Da MC in KCl-basiertem Medium eine mitochondriale Schwellung verursachte, bestand die Möglichkeit, dass die beobachtete Abnahme der endogenen Mg^{2+} -Konzentration lediglich auf eine Vergrößerung des mitochondrialen Volumens zurückzuführen war. Daher wurde der Einfluss von MC auf die MgG-Fluoreszenz auch in Saccharose-basiertem Medium untersucht. Obwohl in diesem Fall keine Schwellung zu beobachten war (siehe Abb. 3.12B oben), hatte die MC-Gabe eine Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration zur Folge (Abb. 3.28A). Der Effekt war dem in KCl-basiertem Medium beobachteten ähnlich, es traten keine signifikanten Unterschiede auf (jeweils $p > 0,05$, $n = 4$, t-Test; Abb. 3.28B). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die MC-induzierte Verringerung der endogenen Mg^{2+} -Konzentration nicht nur eine Folge der mitochondrialen Schwellung und einer damit verbundenen Verdünnung des intramitochondrialen Mg^{2+} sein kann.

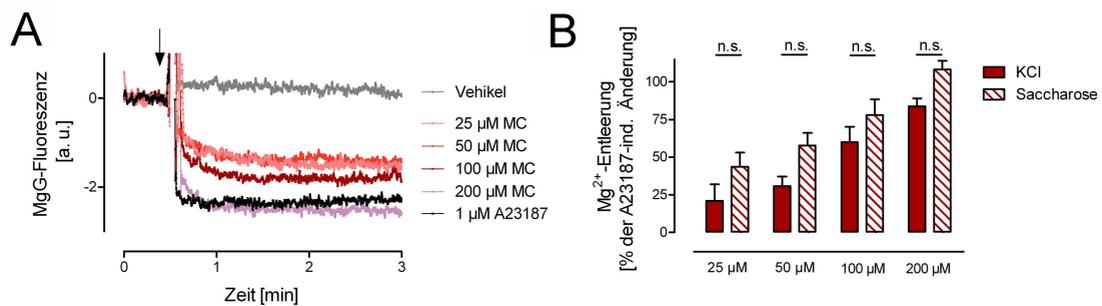


Abb. 3.28: Einfluss von Minozocin auf die intramitochondriale Mg²⁺-Konzentration in Saccharose-basiertem Medium

(A) Auch in Saccharose-basiertem Medium verursachte die Zugabe von MC zu RLM eine deutliche Abnahme der intramitochondrialen Mg²⁺-Konzentration. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen). (B) Die statistische Analyse ergab, dass die Effekte von MC auf die MgG-Fluoreszenz in beiden Medien vergleichbar waren; es traten keine signifikanten Unterschiede auf. Dargestellt ist die MgG-Fluoreszenz 3 min nach Zugabe des MC (n = 4).

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Verringerung der endogenen Mg²⁺-Konzentration kausal mit der MC-induzierten Schwellung verbunden war, ergab sich aus Experimenten mit Tetrazyklin (TC), das sich vom MC durch eine fehlende Dimethylaminogruppe unterscheidet (siehe Abb. 1.1). Wie bereits oben dargestellt (siehe Abb. 3.20), induzierte TC keine Schwellung von RLM in KCl-basiertem Medium. Entsprechend ergab sich bei der Untersuchung der MgG-Fluoreszenz, dass TC im Vergleich zum MC eine deutlich geringere Wirkung auf den intramitochondrialen Mg²⁺-Gehalt ausübt (Abb. 3.29A). So bewirkte MC in einer Konzentration von 100 µM eine Verringerung der MgG-Fluoreszenz um 60,0 ± 10,2 % der A23187-induzierten Abnahme, während die gleiche Konzentration an TC die Fluoreszenz nur um 13,4 ± 11,5 % reduzierte (p < 0,05, n = 4, t-Test; Abb. 3.29B).

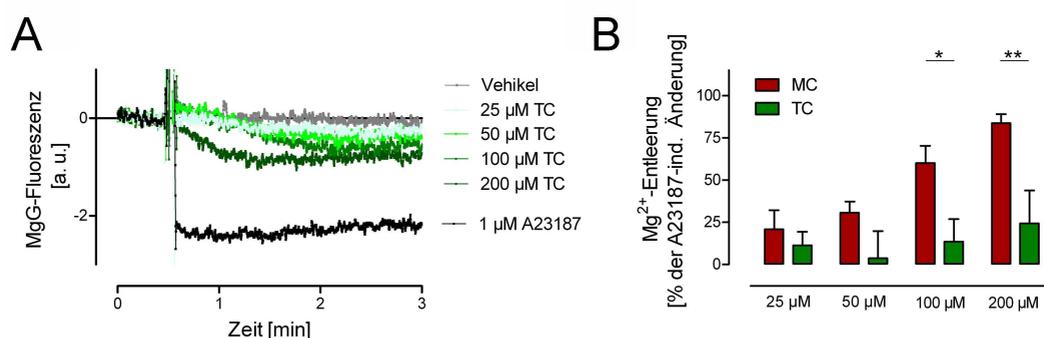


Abb. 3.29: Einfluss von Tetrazyklin auf die intramitochondriale Mg²⁺-Konzentration von Lebermitochondrien in KCl-basiertem Medium

(A) Tetrazyklin (TC) bewirkte nur eine geringe Abnahme der MgG-Fluoreszenz. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen). (B) Die quantitative Bestimmung (3 min nach Zugabe des MC/TC) ergab, dass die durch TC induzierte Verringerung der intramitochondrialen Mg²⁺-Konzentration deutlich geringer ausgeprägt war als die durch MC verursachte Abnahme.

Getestet wurde zudem, ob eine Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration im Medium die MC-induzierte Schwellung und Depolarisation zu modulieren vermag. Es zeigte sich, dass eine

Verzehnfachung der extramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration die MC-vermittelte Absorptionsabnahme zumindest deutlich verlangsamt (Abb. 3.30A). Auch die von MC verursachte Depolarisation wurde durch Mg^{2+} aufgehalten (Abb. 3.30B).

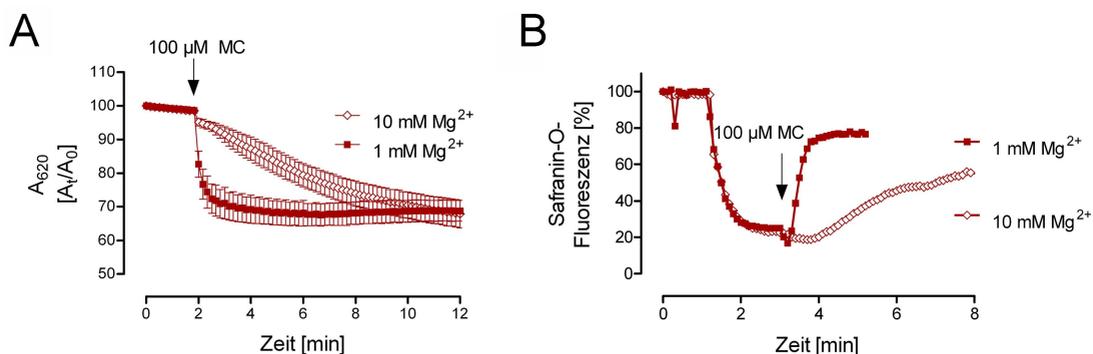


Abb. 3.30: Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration im Medium auf die Minozyklin-induzierte Schwellung und Depolarisation von Rattenlebermitochondrien

(A) Eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration im Medium bewirkte eine deutliche Verlangsamung der durch MC induzierten Schwellung ($n = 4$). (B) Ebenso wurde die MC-vermittelte Depolarisation durch Mg^{2+} moduliert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 4 Präparationen).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die durch MC induzierte Abnahme der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration das Anschwellen der Mitochondrien verursachte. Es sollte daher im Folgenden überprüft werden, ob eine pharmakologische Blockade der durch Mg^{2+} regulierten Ionentransporter (IMAC, K^+ -Uniporter) Einfluss auf die durch MC-Behandlung hervorgerufene Schwellung in KCl-basiertem Medium hat.

3.2.1.5 Die Blockade des mitochondrialen K^+ -Uniporters oder des *inner membrane anion channel* verringert die MC-induzierte Schwellung in KCl-basiertem Medium

Die Inhibierung des IMAC durch Tributylzinnchlorid (TBT, $1 \mu M$) verursachte zunächst selbst eine mitochondriale Schwellung (Abb. 3.31A). Die anschließende Zugabe von MC ($100 \mu M$) induzierte jedoch keine weitere Absorptionsabnahme. Im Vergleich zu unbehandelten RLM sank die Maximalgeschwindigkeit der durch MC induzierten Schwellung durch TBT von $28,2 \pm 3,6$ auf $13,5 \pm 0,5$ ($p < 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.31B). Auch durch Dicyklohexylcarbodiimid (DCCD, $1 \mu M$), einen (unspezifischen) Hemmstoff des mitochondrialen K^+ -Uniporters, konnte die MC-induzierte Schwellung reduziert werden (Abb. 3.31C). Die Maximalgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme sank hierbei von $28,0 \pm 3,6$ auf $16,6 \pm 2,0$ ($p < 0,05$, $n = 3$; Abb. 3.31D). Diese Daten lassen darauf schlie-

ßen, dass die MC-induzierte Schwellung zumindest teilweise auf eine Öffnung von K^+ -Uniporter und IMAC zurückzuführen war.

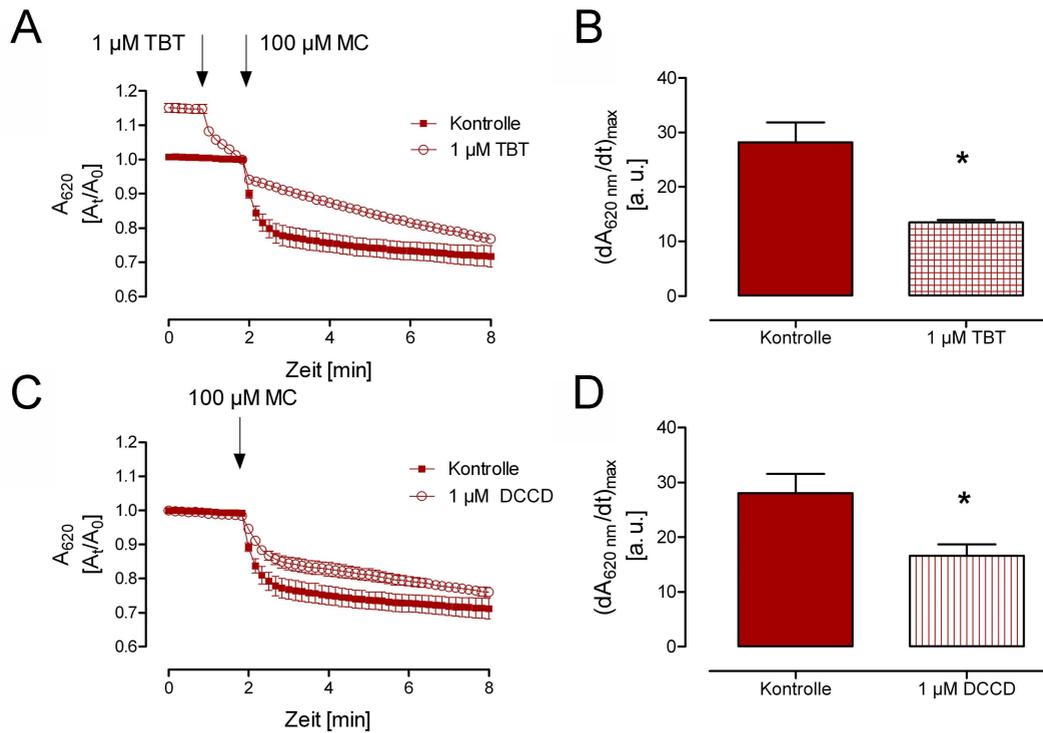


Abb. 3.31: Einfluss einer Blockade von mitochondrialem K^+ -Uniporter bzw. des IMAC auf die Minozyklin-induzierte Schwellung von Lebermitochondrien

(A) Der IMAC-Hemmstoff Tributylzinnchlorid (TBT, 1 μ M) bewirkte bereits selbst eine rapide Absorptionsabnahme. Wurde den so behandelten RLM im Anschluss MC zugegeben (100 μ M), induzierte dies kein weiteres Anschwellen der Mitochondrien (n = 4). (B) In Anwesenheit von TBT war die Maximalgeschwindigkeit der Schwellung signifikant reduziert (n = 4). (C, D) Vorbehandlung der RLM mit 1 μ M DCCD (inhibiert u.a. den mitochondrialen K^+ -Uniporter) verringerte die MC-induzierte Schwellung signifikant (n = 3).

Der mitochondriale K^+ -Uniport wird unter anderem vom ATP-abhängigen K^+ -Kanal (mito K_{ATP} -Kanal) vermittelt. Um zu testen, ob der mito K_{ATP} -Kanal an der MC-induzierten Schwellung beteiligt ist, wurde der Effekt des mito K_{ATP} -Kanal-Inhibitors 5-Hydroxydekanooat (5-HD) überprüft. Wie in Abbildung 3.32 dargestellt, bewirkte die Vorbehandlung der Mitochondrien mit 50 oder 500 μ M des Hemmstoffes keine Modulation der MC-induzierten Schwellung.

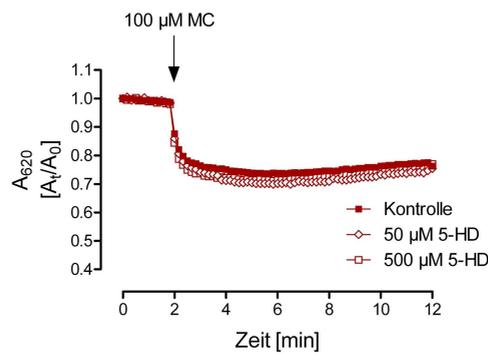


Abb. 3.32: Einfluss einer Inhibierung des mitoK_{ATP}-Kanals auf die Minozyklin-induzierte Schwellung

Eine Blockade des mitoK_{ATP}-Kanals durch 5-HD hatte keine modulatorische Wirkung auf die durch MC verursachte Absorptionsabnahme (n = 3).

3.2.2 Untersuchungen an Hirnmitochondrien

Zum Abschluss galt es nun zu überprüfen, inwieweit sich die an Lebermitochondrien gewonnenen Ergebnisse auf Hirnmitochondrien (*rat brain mitochondria*, RBM) übertragen lassen. Die Gewinnung von RBM ist bei geringer Ausbeute sehr zeitaufwendig. Daher beschränkten sich die Untersuchungen an RBM auf das Schwellungsverhalten, das Membranpotential sowie die Ca²⁺-Aufnahmekapazität nach Behandlung mit MC.

Zugabe von Ca²⁺-Ionen zu nicht-synaptischen RBM bewirkte eine rapide Abnahme der Absorption (Abb. 3.33). Im Vergleich zu RLM (siehe Abb. 3.12) war diese jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Ein weiterer Unterschied zu RLM zeigte sich in der CsA-Sensitivität der Ca²⁺-induzierten Schwellung. Während die Absorptionsabnahme von RLM durch 1 µM CsA komplett blockierbar war, wurde die Schwellung der RBM durch CsA nur verzögert. Die Maximalgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme reduzierte sich in Anwesenheit von CsA von $14,5 \pm 0,7$ auf $5,3 \pm 0,2$ ($p < 0,001$, n = 12, t-Test).

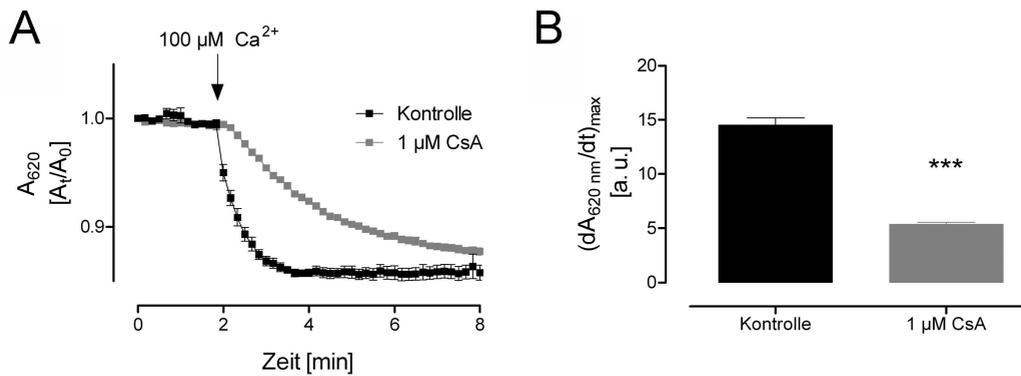


Abb. 3.33: Schwellungsverhalten isolierter Rattenhirnmitochondrien in KCl-basiertem Medium
 (A) Durch Ca^{2+} -Zugabe zu einer Suspension isolierter RBM ließ sich eine Absorptionsabnahme induzieren. Diese Schwellung war durch $1 \mu\text{M}$ CsA nicht komplett blockierbar, verlangsamte sich aber in Anwesenheit des mPTP-Inhibitors deutlich ($n = 12$). (B) Statistische Auswertung der Maximalgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme ($n = 12$).

Im Folgenden sollte die Wirkung von MC auf das Schwellungsverhalten der RBM untersucht werden. In KCl-basiertem Medium zeigte sich, dass MC selbst die Absorption der RBM kaum verändert. Erst ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ induzierte MC ein langsames Anschwellen der Mitochondrien (Abb. 3.34A). Die Vorbehandlung der RBM mit MC bewirkte zudem eine partielle Hemmung der Ca^{2+} -induzierten Schwellung (Abb. 3.34B). Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Die Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ MC im Medium verringerte die Maximalgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme von $13,5 \pm 1,7$ auf $7,8 \pm 0,3$ ($p > 0,05$, $n = 4$).

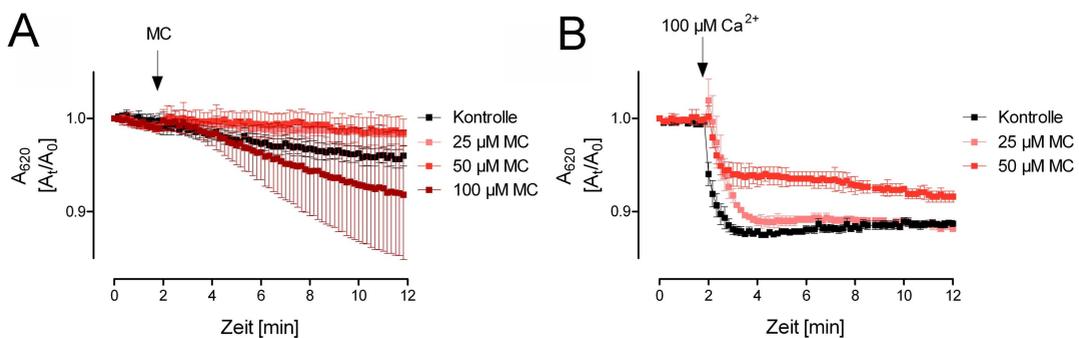


Abb. 3.34: Wirkung von Minozyklin auf das Schwellungsverhalten isolierter Hirnmitochondrien in KCl-basiertem Medium

(A) Die Zugabe von MC in Konzentrationen $\leq 50 \mu\text{M}$ induzierte keine Schwellung von in KCl-basiertem Medium inkubierten RBM. Bei höheren Konzentrationen bewirkte MC eine langsame Absorptionsabnahme ($n = 6$). (B) MC verringerte geringfügig die durch Ca^{2+} -Zugabe induzierte Schwellung von RBM. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant ($n = 4$).

Auch das Membranpotential und die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität von RBM wurden untersucht. Abbildung 3.35 zeigt zunächst den Effekt von Ca^{2+} -Ionen auf $\Delta\psi_m$ und die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration. In KCl-basiertem Medium inkubierte, unbehandelte RBM konnten $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} aufnehmen, ohne dass es zu einem Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ kam (Abb. 3.35A). Nach Vorbehandlung der Mitochondrien mit $1 \mu\text{M}$ CsA kam es erst

nach der vierten Zugabe von 25 μM Ca^{2+} zu einer Depolarisation (Abb. 3.35B). In Saccharose-basiertem Medium konnten die Mitochondrien geringfügig mehr Ca^{2+} -Ionen aufnehmen (Abb. 3.35C, D).

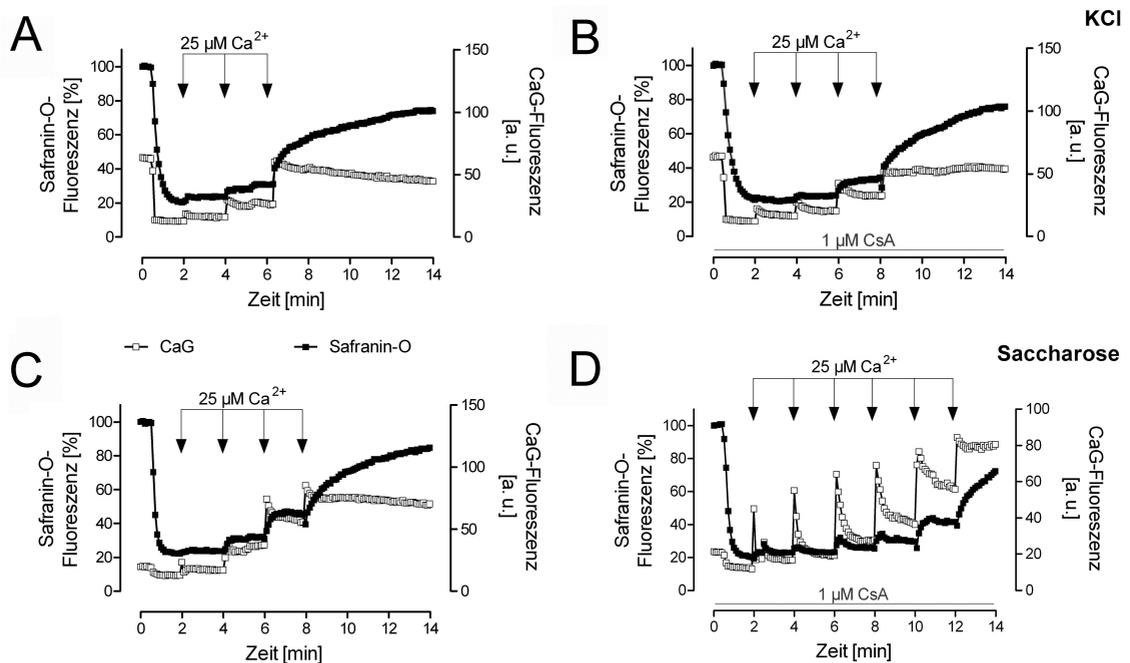


Abb. 3.35: Messung von Ca^{2+} -Aufnahmekapazität und Membranpotential an Hirnmitochondrien

Dargestellt sind repräsentative Daten an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 3 Präparationen). Geschlossene Symbole kennzeichnen die Safranin-O-Fluoreszenz, offene Symbole stellen die extramitochondriale Ca^{2+} -Konzentration dar. (A) In KCl-basiertem Medium inkubierte RBM konnten 50 μM Ca^{2+} aufnehmen, ohne dass es zu einer Depolarisation kam. Die dritte Zugabe von 25 μM Ca^{2+} führte zu einem Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$. (B) Die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität konnte durch CsA geringfügig gesteigert werden. (C) Bei in Saccharose-Medium suspendierten RBM waren 100 μM Ca^{2+} nötig, um eine komplette Depolarisation auszulösen. (D) Auch in Saccharose-basiertem Medium erhöhte CsA die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität.

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit MC das Membranpotential und die Ca^{2+} -Aufnahme der RBM beeinflusst. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an RLM stellte sich hierbei heraus, dass MC selbst in Konzentrationen bis 100 μM weder in KCl- noch in Saccharose-basiertem Medium eine Depolarisation verursacht (Abb. 3.36). Jedoch konnte in beiden Fällen eine drastische Reduzierung der Ca^{2+} -Aufnahmekapazität durch MC beobachtet werden: Eine Konzentration von 10 μM MC war ausreichend, um die Aufnahme zugegebener Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien vollständig zu hemmen. Zudem bewirkte Ca^{2+} (25 μM) in MC-behandelten Mitochondrien einen vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Dieser Effekt war im Saccharose-Medium geringfügig weniger stark ausgeprägt; die Depolarisation verlief langsamer (Abb. 3.36C).

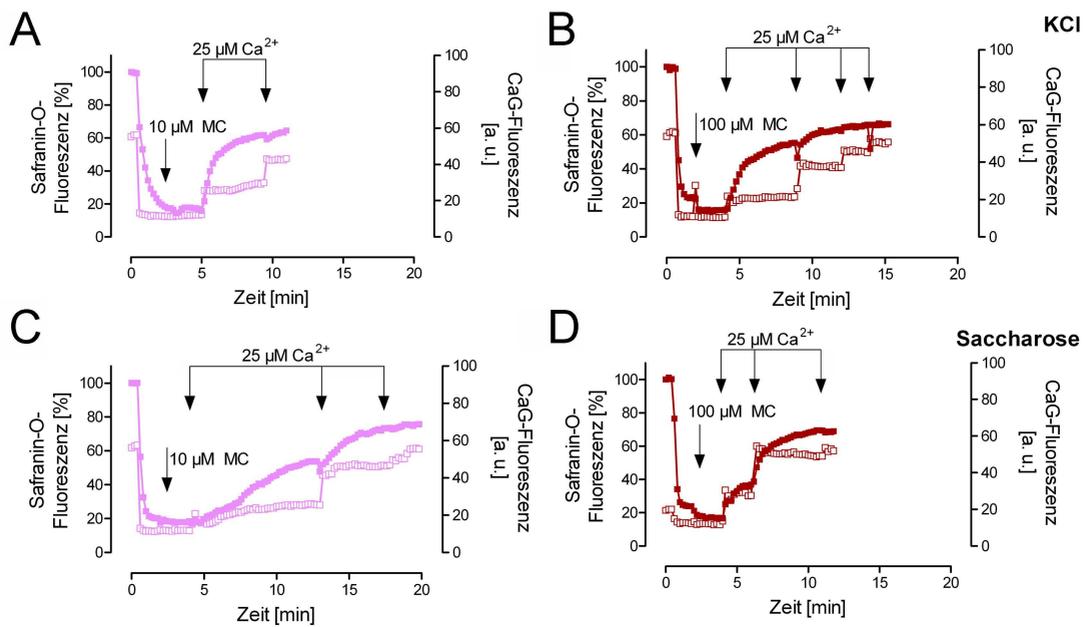


Abb. 3.36: Effekt von Minozyklin auf die Ca²⁺-Aufnahmekapazität und das Membranpotential isolierter Hirnmitochondrien in KCl- und Saccharose-basiertem Medium

Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse an einer Mitochondrienpräparation (gesamt: 3 Präparationen). Geschlossene Symbole kennzeichnen die Safranin-O-Fluoreszenz, offene Symbole stellen die extramitochondriale Ca²⁺-Konzentration dar. (A) Die Zugabe von 10 μM MC zu in KCl-basiertem Medium inkubierten RBM hatte keinen Effekt auf Δψ_m. Anschließend zugegebene Ca²⁺-Ionen konnten von den Mitochondrien nicht mehr aufgenommen werden; das Membranpotential brach zusammen. (B) 100 μM MC bewirkte zunächst eine starke Abnahme der Safranin-O-Fluoreszenz. Dieser Effekt trat jedoch auch in deenergetisierten Mitochondrien auf (siehe Abb. 3.15B) und war demzufolge nicht auf einer Hyperpolarisation der RBM zurückzuführen. (C, D) In Saccharose-basiertem Medium bewirkte MC ebenfalls eine drastische Einschränkung der Ca²⁺-Aufnahmekapazität. Wiederum kam es nach Zugabe von Ca²⁺-Ionen zu einem Zusammenbruch von Δψ_m, der jedoch (bei Verwendung von 10 μM MC) geringfügig langsamer verlief als in KCl-basiertem Medium.

4 DISKUSSION

In Tiermodellen zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen hat sich das semisynthetische Tetrazyklinderivat Minozyklin (MC) als protektiv erwiesen (siehe Übersichtsartikel in Jordan et al., 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Die Ergebnisse einiger Studien deuten darauf hin, dass MC ein Hemmstoff der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) ist und als solcher den Zelltod verhindern kann (Zhu et al., 2002; Haroon et al., 2007). Die Rolle der mPTP bei der MC-vermittelten Neuroprotektion wird jedoch bis heute kontrovers diskutiert, da auch negative Wirkungen des Antibiotikums auf die mitochondriale Physiologie beschrieben worden sind (Fernandez-Gomez et al., 2005; Mansson et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit sollten die mitochondrialen Effekte des MC und deren Rolle bei der MC-vermittelten Neuroprotektion anhand isolierter Mitochondrien sowie in einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer charakterisiert werden.

4.1 Effekte von Minozyklin in einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer

Eine 24-stündige Behandlung der Zellkulturen mit 10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ bewirkte eine signifikante Beeinträchtigung der MTT-Reduktion. Die Formazan-Bildung der $\text{A}\beta_{25-35}$ -behandelten Zellen konnte mittels MC auf das Niveau der Kontrollzellen angehoben werden. Dieses Resultat schien zunächst die bisher publizierten Studien zu unterstützen, in denen protektive Effekte des MC in Tier- sowie Zellkulturmodellen des Morbus Alzheimer beschrieben wurden (Ryu et al., 2004; Familian et al., 2006; Seabrook et al., 2006; Choi et al., 2007; Fan et al., 2007). Allerdings fiel bei morphologischer Betrachtung der Kulturen auf, dass diese trotz des eingeschränkten MTT-Reduktionsvermögens keinerlei Anzeichen von apoptotischem oder nekrotischem Zelltod aufwiesen: Das Zellvolumen blieb unverändert, das dendritische Netzwerk intakt. Zur weiteren Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden daher zwei weitere Toxizitätsassays durchgeführt. Nach 24-stündiger Behandlung mit $\text{A}\beta_{25-35}$ konnte keine erhöhte extrazelluläre Konzentration des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) festgestellt werden. Die Freisetzung der LDH erfolgt allerdings erst recht spät im Verlauf der (primären oder sekundären, d.h. der Apoptose nachfolgenden) Nekrose nach Lyse der Zellen. Hingegen stellt eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) vermutlich ein frühes Anzeichen einer eingeschränkten Zellviabilität dar (Ly et al., 2003; Iijima, 2006). Tatsächlich ergab die Messung von $\Delta\psi_m$ eine

signifikante mitochondriale Depolarisation nach 24-stündiger Behandlung der Kulturen mit A β ₂₅₋₃₅. Im Gegensatz zur MTT-Reduktion konnte MC das Membranpotential der A β ₂₅₋₃₅-behandelten Zellen jedoch nicht normalisieren. Dies steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen, dass MC beispielweise die Thapsigargin-induzierte Depolarisation von Mitochondrien hemmen kann (Haroon et al., 2007). Dabei ist allerdings zu beachten, dass MC ein Inhibitor des p-Glykoproteins (*multi drug resistance pump*, MDR) ist (Milane et al., 2007), welches verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe aus der Zelle herauszutransportieren vermag (Diaz et al., 2001). Mit Hilfe dieser Farbstoffe erhaltene Ergebnisse könnten daher auch auf eine Hemmung der MDR zurückzuführen sein statt auf einen MC-vermittelten Schutz des mitochondrialen Membranpotentials.

Die unterschiedliche Wirkung von MC auf das MTT-Reduktionsvermögen und $\Delta\psi_m$ der A β ₂₅₋₃₅-behandelten Kulturen deutet in starkem Maße darauf hin, dass den beiden Effekten zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde lagen. Mitochondrien enthalten zahlreiche Redoxenzyme, die in der Lage sind, MTT zu Formazan zu reduzieren (Liu et al., 1997). Entgegen der früheren Sichtweise konnten allerdings Liu et al. nachweisen, dass Mitochondrien *im Zellsystem* nicht zur MTT-Reduktion beitragen (1997). MTT kann die Zellmembran nicht passieren, sondern wird endozytotisch in Zellen aufgenommen und intravesikulär reduziert. Die Formazan-enthaltenden Vesikel kolokalisieren mit Acridin-Orange, einem Farbstoff für Endo- und Lysosomen, nicht jedoch mit mitochondrialen Markern (Liu et al., 1997). Das gebildete Formazan wird externalisiert und bildet an der Zelloberfläche nadelartige Kristalle, die die weitere MTT-Reduktion hemmen (Liu und Schubert, 1997). Der Freisetzungsmechanismus wird aufgrund seiner vesikel-gebundenen Form als Exozytose interpretiert. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass A β diesen Prozess beschleunigen und auf diese Weise die MTT-Reduktion verringern kann, ohne dabei Zelltod auszulösen (Liu und Schubert, 1997; Abe und Saito, 1998; Kerokoski et al., 2001). Auch in der hier vorliegenden Arbeit war die durch A β ₂₅₋₃₅ ausgelöste Verringerung der MTT-Reduktion auf eine Beschleunigung der Formazan-Exozytose zurückzuführen: Nach Behandlung mit A β ₂₅₋₃₅ fanden sich deutlich mehr Zellen mit Formazan-Kristallen an der Oberfläche als dies in Kontrollkulturen der Fall war. MC verlangsamte die Formazan-Freisetzung und zugleich die MTT-Reduktion. Dieser MC-Effekt war auch zu beobachten, wenn die Formazan-Externalisierung durch Cholesterol stimuliert worden war (Abe und Saito, 1999). Dies deutet darauf hin, dass MC stromabwärts von A β ₂₅₋₃₅ und Cholesterol in Signalwege eingreift, die die Formazan-Exozytose modulieren.

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit die durch A β ausgelöste Veränderung der Formazan-Externalisierung mit der Toxizität des Peptides korreliert. Es ließe sich spekulieren,

dass A β durch einen Eingriff in den Vesikeltransport beispielsweise die Neurotransmitter-Freisetzung stören kann, wie es insbesondere für das cholinerge System seit langem bekannt ist (Kar et al., 1996). In einer Studie von Liu und Schubert zeigte sich jedoch, dass A β die Noradrenalin-Freisetzung trotz Beeinträchtigung der Formazan-Externalisierung nicht beeinflusst (Liu und Schubert, 1997). Zudem kann der MTT-/Formazan-Transport bisher keiner der bekannten Zytoseformen (Pinozytose, Rezeptor-vermittelte Endo-/Exozytose) zugeordnet werden (Liu und Schubert, 1997). Ob die durch A β beeinflusste Formazan-Externalisierung pathologische Folgen haben kann, war daher zunächst ungewiss. Ein auffälliges Charakteristikum dieses Prozesses ist allerdings, dass er nur von *toxischen* A β -Peptiden wie A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ oder A β ₂₅₋₃₅ moduliert wird. Nicht-toxische Peptide (A β ₁₋₂₈, A β ₄₀₋₁ oder A β ₁₂₋₂₈) bewirken keine Beschleunigung der Formazan-Exozytose (Liu und Schubert, 1997). Insulin und Glucagon erlangen in fibrillierter Form sowohl Toxizität als auch eine beschleunigende Wirkung auf die Formazan-Externalisierung. Beide Effekte entfallen in der nativen Form der Peptide (Liu und Schubert, 1998). Aufgrund dieser Daten wurde spekuliert, dass Toxizität und Beeinflussung der Formazan-Freisetzung durch A β eng miteinander verbunden sind. Die Autoren der zitierten Studien zeigten jedoch auch, dass es durchaus Substanzen gibt, die die Formazan-Exozytose hemmen (Genistein, Monensin, Nigericin, Östrogen), ohne damit den A β -induzierten Zelltod verhindern zu können. Die genannten Pharmaka beeinflussen jedoch auch die physiologische, d.h. nicht durch A β modulierte, Formazan-Externalisierung (Liu und Schubert, 1997; Liu und Schubert, 1998). Es ist daher die Vermutung aufgestellt worden, dass nur diejenigen Substanzen die toxischen Effekte der A β -Peptide inhibieren, welche spezifisch die durch das Peptid verursachte Beschleunigung der Formazan-Exozytose hemmen, den physiologischen Transport der Formazan-Vesikel jedoch nicht beeinträchtigen (Liu und Schubert, 1998). Tatsächlich gelang es kürzlich Hong et al., zwei solcher Verbindungen zu identifizieren und den Nachweis zu erbringen, dass diese auch die A β -vermittelte Toxizität verhindern können (2007).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass auch MC zur Reihe der Substanzen mit den geforderten Eigenschaften gehört: MC inhibierte die durch A β ₂₅₋₃₅ stimulierte Formazan-Externalisierung, ohne den Vesikeltransport in Kontrollkulturen zu beeinflussen. Bereits die Tatsache, dass MC nicht in der Lage war, die nach 24-stündiger Behandlung mit A β ₂₅₋₃₅ aufgetretene mitochondriale Depolarisation zu inhibieren, ließ jedoch Zweifel an der genannten Hypothese aufkommen. Stattdessen deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass MC trotz seiner spezifischen Wirkung auf die A β ₂₅₋₃₅-induzierte Beschleunigung der Formazan-Exozytose keine schützende Wirkung gegenüber

der A β ₂₅₋₃₅-vermittelten Toxizität ausübt. Zudem zeigte sich nach Langzeitinkubation mit A β ₂₅₋₃₅, dass MC auch die durch A β ₂₅₋₃₅ bewirkten morphologischen Änderungen sowie die A β ₂₅₋₃₅-induzierte LDH-Freisetzung nicht aufzuhalten vermochte. Ein Zerfall des MC im Laufe der 6-tägigen Inkubation ist als Grund für die fehlende Schutzwirkung im Langzeitmodell unwahrscheinlich. Zwar haben Tetrazykline *in vivo* eine sehr geringe Halbwertszeit, die Stabilität des MC in wässriger Lösung ist allerdings recht hoch: Bei 37 °C reduziert sich die MC-Konzentration über einen Zeitraum von 3 Tagen um weniger als 10 % (Honorat-Benabbou et al., 2001). Es kann daher geschlussfolgert werden, dass zumindest im gewählten Modell kein Zusammenhang zwischen der durch A β ₂₅₋₃₅ verursachten Beschleunigung der MTT-Formazan-Exozytose und der Toxizität des Peptides besteht.

Da Cholesterol einen ähnlichen Einfluss auf die MTT-Formazan-Exozytose hat wie A β und das Peptid zudem den Membrangehalt an freiem Cholesterol erhöht, ist eine Beteiligung der Formazan-transportierenden Vesikel an der zellulären Cholesterol-Homöostase vermutet worden (Liu et al., 1998). Es ließe sich daher spekulieren, dass die hier beobachtete Normalisierung der MTT-Formazan-Exozytose durch MC auch Auswirkungen auf den durch A β ₂₅₋₃₅ beeinflussten Cholesterol-Haushalt hat. Es ist seit langem bekannt, dass ein hoher Cholesterol-Spiegel das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, erhöht (siehe Übersichtsartikel in Canevari und Clark, 2007). Dieser Zusammenhang ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Cholesterol die Entstehung von A β -Peptiden begünstigt (Sparks et al., 1994). Es ist nicht auszuschließen, dass MC diesen Prozess durch Normalisierung der Cholesterol-Homöostase hemmt und auf diese Weise seine neuroprotektive Wirkung in transgenen Tiermodellen des Morbus Alzheimer (Seabrook et al., 2006; Fan et al., 2007) ausübt. Andererseits konnte kürzlich gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von A β auf die MTT-Reduktion lediglich in Einzelzellkulturen auftritt (Ronicke et al., 2008). In organotypischen Hippokampuskulturen, akuten Hippokampusschnitten sowie *in vivo* ist hingegen kein solcher Effekt zu beobachten. In der genannten Studie wurde die Externalisierung von MTT-Formazan nicht untersucht; die Daten lassen jedoch vermuten, dass sich auch die A β -vermittelte Beschleunigung der Formazan-Exozytose auf die Einzelzellkultur beschränkt. Die Relevanz der mittels MTT-Assay erhaltenen Daten für die *in vivo*-Situation bleibt daher fraglich. An dieser Stelle sollte zudem eine Studie von Diaz et al. erwähnt werden, in der festgestellt wurde, dass die Aggregation von MTT-Formazan zu Kristallen auch in zellfreien Systemen von A β und Cholesterol gefördert wird (2007), dieser Kristallbildung also möglicherweise ein rein physikochemischer Prozess zugrunde liegt. Zusammen mit den hier präsentierten Daten machen diese Ergebnisse deutlich, dass der MTT-Assay nicht als Vitalitätsassay für die Abschätzung der A β -vermittelten Toxizität

geeignet ist. Da sich der Effekt von A β auf die Formazan-Exozytose auf das MTT-Formazan beschränkt (Shearman et al., 1995), sollten für solche Zwecke möglichst andere Tetrazoliumsalze, beispielweise 2-(2-Methoxy-4-Nitrophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2, 4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium (*water soluble tetrazolium*, WST-8), verwendet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MC im verwendeten Zellkulturmodell zwar den Effekt von A β_{25-35} auf die Formazan-Exozytose zu inhibieren vermochte, ein neuroprotektiver Effekt des MC hingegen nicht festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis beobachteten andere Arbeitsgruppen eine deutliche Schutzwirkung des MC in Alzheimer-Modellen (Ryu et al., 2004; Familian et al., 2006; Seabrook et al., 2006; Choi et al., 2007; Fan et al., 2007). Der Großteil dieser Studien ist jedoch an Tiermodellen durchgeführt worden; der protektive Einfluss des MC wurde hauptsächlich seiner Eigenschaft als anti-inflammatorisches Agens zugeschrieben. In embryonalen Mischkulturen aus dem Hippokampus, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, treten hingegen kaum aktive Mikroglia auf (Kim et al., 2000). Entsprechend wenig Einfluss sollte eine Hemmung der Mikroglia durch MC auf die A β_{25-35} -vermittelte Toxizität haben. Andererseits beobachteten Choi et al., dass MC neuronal differenzierte PC12-Zellen vor A β -induziertem Zelltod schützen kann: Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit MC die durch A β verursachte Caspase-Aktivierung sowie LDH-Freisetzung inhibiert (2007). Allerdings ist die Wirkung des MC in der genannten Studie nur über einen Zeitraum von 24 h überprüft worden; Effekte einer länger andauernden Behandlung mit A β und MC wurden nicht untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Inkubationsdauer von 6 d könnte die abweichenden Ergebnisse erklären, zumal bereits bekannt ist, dass MC in einigen Modellen nur eine transiente Schutzwirkung ausübt (Fox et al., 2005; Bye et al., 2007). Zudem zeichnen sich die hier verwendeten Zellkulturen durch einen recht hohen Anteil an Astrozyten aus, die die A β -vermittelte Toxizität in starkem Maße beeinflussen können (Abramov et al., 2003; Abramov et al., 2004). Daher ist es denkbar, dass sich die Toxizitätsmechanismen in den verschiedenen Kulturen (Mischkultur vs. neuronal differenzierte Zelllinie) unterscheiden.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine Inhibierung der mPTP durch CsA nicht vor A β_{25-35} -vermitteltem Zelltod schützen. Daher kann für das gewählte Modell eine Beteiligung der mPTP an der A β_{25-35} -induzierten Toxizität ausgeschlossen werden. Im Widerspruch zu bisher publizierten Studien (siehe 1.2.4) lässt dieses Resultat auch eine Mitwirkung der mPTP-Öffnung am Morbus Alzheimer fraglich erscheinen. Folgerichtig kann aus den hier gewonnenen Ergebnissen keine Aussage über die Wirkung von

MC auf die mPTP getroffen werden. Die mitochondrialen Effekte des MC sollten daher im zweiten Teil der Arbeit anhand isolierter Mitochondrien detailliert charakterisiert werden.

4.2 Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien

Die Sensibilität isolierter Mitochondrien gegenüber Faktoren, die die Permeabilitäts-transition auslösen oder hemmen, wird von der Zusammensetzung und insbesondere der Ionenstärke des verwendeten Inkubationsmediums beeinflusst (Chavez et al., 1991; Chavez et al., 2003). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des MC auf die verschiedenen funktionellen Parameter der Mitochondrien sowohl in einem weitgehend nicht-ionischen, Saccharose-basierten Medium als auch in einem physiologischeren, KCl-basierten Medium untersucht.

In Saccharose-basiertem Medium reduzierte MC die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Dieser Befund bestätigt die Resultate früherer Studien (Zhu et al., 2002; Wang et al., 2003; Fuks et al., 2005; Theruvath et al., 2008) und deutet auf einen inhibitorischen Effekt von MC auf die mPTP hin. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass in einigen der genannten Studien keine Erhöhung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahmekapazität beobachtet wurde (Fuks et al., 2005; Theruvath et al., 2008), wie dies bei einer Hemmung der mPTP zu erwarten ist. Månsson et al. beobachteten zudem, dass MC die Ca^{2+} -induzierte Schwellung in depolarisierten Mitochondrien nicht zu verhindern vermag (2007). Auch ist MC im Gegensatz zu CsA nicht in der Lage, die durch Superoxid induzierte mPTP-Öffnung isolierter Hirnmitochondrien zu blockieren (Fernandez-Gomez et al., 2005). Diese Befunde führten Månsson et al. zu der Hypothese, dass die Inhibierung der Ca^{2+} -induzierten Schwellung durch MC nicht auf einer direkten Hemmung der mPTP beruht, sondern auf eine Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran zurückzuführen ist (2007). Der Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ verhindert eine Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in das mitochondriale Matrixkompartiment, da die über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter vermittelte Akkumulation von Ca^{2+} ATP-unabhängig und somit streng potential-abhängig erfolgt (siehe Übersichtsartikel in Hajnoczky et al., 2006). Alternativ ist vorgeschlagen worden, dass MC eine dem Rutheniumrot (RuR, Moore, 1971) ähnliche Hemmwirkung auf den Ca^{2+} -Uniporter ausübt und auf diese Weise die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme direkt verhindert (Theruvath et al., 2008). In beiden Fällen fehlt der Trigger für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der mPTP. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass MC-behandelte Lebermitochondrien deutlich weniger extern zugegebene Ca^{2+} -Ionen aufnehmen als unbehandelte Kontrollmitochon-

drien. Um zu untersuchen, ob eine direkte Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters dafür verantwortlich ist, wurde die Wirkung von Ca^{2+} -Ionen auf MC- bzw. RuR-behandelte Mitochondrien verglichen. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen (bis 100 μM) keine Veränderung von $\Delta\psi_m$ induzierte, wenn der Ca^{2+} -Uniporter durch RuR blockiert worden war. Hingegen genügte eine Ca^{2+} -Konzentration von lediglich 25 μM , um eine komplette Depolarisation der MC-behandelten Mitochondrien auszulösen. Diese Daten zeigen, dass MC den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter nicht blockiert.

Umgekehrt bewirkte MC in mit Ca^{2+} vorbeladenen Mitochondrien einen kompletten Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ sowie die Freisetzung der akkumulierten Ca^{2+} -Ionen. Diese Effekte sind charakteristische Folgen einer Öffnung der mPTP (Wieloch et al., 2007), ließen sich jedoch durch den mPTP-Hemmstoff Cyclosporin A (CsA) nicht inhibieren. Unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (Griffiths und Halestrap, 1995; Halestrap et al., 1997; Basso et al., 2005), verliert die mPTP allerdings ihre Sensitivität gegenüber CsA (siehe Übersichtsartikel in Zoratti et al., 2005). Diese Art der Permeabilitätstransition findet sich auch in Mitochondrien aus Cyclophilin D-defizienten Mäusen (Basso et al., 2005). Es ist daher denkbar, dass die beobachtete MC-induzierte Depolarisation Ca^{2+} -beladener Mitochondrien die Folge einer CsA-insensitiven Öffnung der mPTP ist. Diese nicht-klassische Form der mPTP-Öffnung wird durch die Abwesenheit von Mg^{2+} gefördert (Novgorodov et al., 1994). Da MC Komplexe mit Mg^{2+} -Ionen bildet (Durckheimer, 1975), liegt die Vermutung nahe, dass die damit verbundene Absenkung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration die CsA-insensitive mPTP aktivierte und die Ca^{2+} -Aufnahmekapazität auf diese Weise eingeschränkt wurde.

Zusammengefasst bestätigen die in Saccharose-basiertem Medium erhaltenen Ergebnisse, dass MC die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung isolierter Mitochondrien hemmen kann (siehe Abb. 3.12 sowie Abb. 3.13). Eine Blockade der mPTP durch MC war jedoch nicht ursächlich für diesen Effekt. Stattdessen hemmte MC die Aufnahme zugegebener Ca^{2+} -Ionen durch die Mitochondrien und verhinderte somit auf indirekte Weise die Aktivierung der mPTP sowie die damit verbundene Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung. Welche Auswirkungen könnte die Blockade der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme für die Zelle haben? In einem Zellkulturmodell des Morbus Alzheimer wurde beobachtet, dass eine partielle Entkopplung den durch A β verursachten Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration hemmt (Sanz-Blasco et al., 2008). Gleichzeitig wird durch die Entkopplung die A β -induzierte Cytochrom c-Freisetzung sowie der A β -vermittelter Zelltod blockiert. Die Autoren beobachteten außerdem, dass nicht-steroidale Antiphlogistika (*non-steroid anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), von denen eine protektive

Wirkung in Alzheimer-Modellen bereits länger bekannt ist (Rich et al., 1995), gleichermaßen eine Verminderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme bewirken. Eine Hemmung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters durch RuR wirkt ebenfalls anti-apoptotisch (Anderson et al., 2005). In einer kürzlich erschienenen Publikation schrieben Theruvath et al. auch die protektive Wirkung von MC dessen Funktion als Inhibitor der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme zu (2008). Andererseits wurde wiederholt beobachtet, dass eine Entkopplung der Mitochondrien den Zelltod auslösen oder zumindest begünstigen kann (Gautier et al., 2000; Dejean et al., 2004; Han et al., 2008). Zudem stellt intramitochondriales Ca^{2+} ein wichtiges Stimulans für die oxidative Phosphorylierung und somit die ATP-Synthese dar (McCormack und Denton, 1993; Jouaville et al., 1999). Mitochondrien sind außerdem an der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligt (Saris und Carafoli, 2005). Darüber hinaus zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass eine MC-Behandlung Ca^{2+} -beladener Mitochondrien einen Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ und damit eine Freisetzung des akkumulierten Ca^{2+} aus den Mitochondrien nach sich zieht. Die naheliegende Erklärung für dieses Verhalten ist, dass MC im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -Beladung die Öffnung der CsA-insensitiven mPTP induziert. Im Zellsystem ließe sich daher erwarten, dass eine Behandlung mit MC im Zusammenhang mit einer erhöhten intramitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration den Zelltod auslöst. Unabhängig von diesen Überlegungen sind die in Saccharose-basiertem Medium gewonnenen Ergebnisse für die Situation *in situ* nur bedingt relevant, da Mitochondrien innerhalb der Zelle in ein ionisches Milieu eingebettet sind. Daher wurde der Effekt von MC auch in einem physiologischeren, KCl-basierten Medium untersucht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Saccharose-basiertem Medium ergab sich in KCl-basiertem Medium, dass MC selbst eine deutliche Schwellung von Rattenlebermitochondrien (RLM) verursacht. Dabei ist aus zwei Gründen unwahrscheinlich, dass diese Schwellung auf einer Inhibierung der mitochondrialen Proteinsynthese durch MC basiert: Zum Einen bewirkten andere Hemmstoffe der mitochondrialen Translation, wie Tetrazyklin und Chloramphenicol (Galper und Darnell, 1971; Zhang et al., 2005), keine Schwellung. Zum Anderen war der rapide Verlauf der MC-induzierten Schwellung nicht mit einer Hemmung der Proteinsynthese zu vereinbaren. Die durch MC verursachte Absorptionsabnahme der Mitochondriensuspension war durch CsA nicht blockierbar, was darauf hindeutet, dass die Schwellung mPTP-unabhängig erfolgte. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass MC lediglich die Sensitivität der mPTP für CsA herabsetzte, z.B. durch Blockade der Bindungsstelle von CsA an der mPTP-Komponente Cyclophilin D, wurden zusätzlich weitere mPTP-Inhibitoren getestet. Die MC-induzierte Schwellung konnte jedoch auch durch

Ro 68-3400 sowie Bongkrekensäure nicht gehemmt werden. Diese Inhibitoren setzen an anderen Komponenten der mPTP an, nämlich dem Porin (*voltage-dependent anion channel*, VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran (Ro68-3400, Cesura et al., 2003) bzw. dem Adeninnukleotidtransporter der inneren Mitochondrienmembran (Bongkrekensäure, Le Quoc und Le Quoc, 1988). Es erscheint unwahrscheinlich, dass MC die Bindung aller drei Hemmstoffe an ihre jeweiligen Bindungspartner verhindert. Nicht auszuschließen war aber zunächst, dass es sich bei der MC-induzierten Schwellung um eine Ca^{2+} -unabhängige und CsA-insensitive Form der mPTP-Öffnung handelt (siehe Übersichtsartikel in Zoratti et al., 2005). Bei der weiteren Charakterisierung der durch MC ausgelösten Schwellung zeigte sich jedoch, dass diese von anorganischem Phosphat (P_i) gehemmt wird. Eine Hemmung durch P_i steht jedoch in starkem Widerspruch zum Verhalten der mPTP, deren Aktivierung durch Phosphat gefördert wird (Al-Nasser und Crompton, 1986, siehe auch Abb. 3.19), vermutlich aufgrund einer P_i -induzierten Verringerung der ADP-Konzentration im Matrixkompartiment (Lapidus und Sokolove, 1994). Zudem tritt eine mPTP-vermittelte Schwellung auch in Saccharose-Medium auf, da die geöffnete mPTP Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kDa passieren lässt (Hunter et al., 1976, siehe auch Abb. 3.12). Eine durch MC verursachte Schwellung in Saccharose-basiertem Medium konnte in der vorliegenden Arbeit hingegen nicht beobachtet werden. Insgesamt scheint daher eine Öffnung der mPTP als Ursache für die MC-induzierte Schwellung ausgeschlossen.

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit die durch MC ausgelöste Schwellung der Mitochondrien Zelltodprozesse beeinflussen kann. Es ist bekannt, dass auch eine mPTP-unabhängige Schwellung die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert (Gogvadze et al., 2004), möglicherweise in Folge einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran (Gogvadze et al., 2006; Lawen, 2007). Auch hier bestätigte sich diese Beobachtung: Die durch MC induzierte Schwellung war mit einer CsA-insensitiven Freisetzung von Cytochrom c verbunden. Neben der möglichen pro-apoptotischen Wirkung des freigesetzten Cytochrom c im Zellsystem hat der Verlust dieses Proteins auch eine eingeschränkte Funktionstüchtigkeit der mitochondrialen Atmungskette zur Folge (Kushnareva et al., 2002), da Cytochrom c innerhalb der Atmungskette Elektronen von Komplex III zu Komplex IV überträgt (Ow et al., 2008). Tatsächlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die in isolierten Mitochondrien maßgeblich von den Enzymen der Atmungskette vermittelte Reduktion von MTT zu Formazan (Berridge und Tan, 1993; Liu et al., 1997) durch MC gehemmt wird. Interessanterweise wurde in der Literatur beschrieben, dass ein Verlust von Cytochrom c auch einen Anstieg der ROS-Produktion bewirkt

(Kushnareva et al., 2002), wodurch die negative Wirkung des MC auf die mitochondriale Physiologie weiter verstärkt wird.

Im Unterschied zum Saccharose-basierten Medium verursachte MC bei in KCl-basiertem Medium suspendierten RLM eine starke Depolarisation (siehe Abb. 3.23). Infolgedessen waren die MC-behandelten Mitochondrien nicht mehr in der Lage, Ca^{2+} -Ionen zu akkumulieren. Wie kann der Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ erklärt werden? Da die MC-induzierte Depolarisation nur in KCl-basiertem Medium zu beobachten war, liegt die Vermutung nahe, dass MC K^+ - und Cl^- -Kanäle in der IMM aktiviert und diese dadurch für K^+ - und Cl^- -Ionen permeabilisiert. Aufgrund der Nettoaufnahme von KCl in die Mitochondrien kommt es zu Schwellung und damit einhergehend zu einer Verringerung von $\Delta\psi_m$. Es stellte sich nun die Frage, ob MC neben der Permeabilisierung der IMM für K^+ - und Cl^- -Ionen auch die Durchlässigkeit der IMM für andere Ionen erhöhte. Es zeigte sich, dass die MC-induzierte Schwellung in NaCl-basiertem Medium der in KCl-basiertem Medium beobachteten ähnelte. Hingegen löste MC in Cholinchlorid- sowie Kaliumgluconat-basierten Medien eine deutlich geringere Schwellung der Mitochondrien aus. Somit erhöhte MC die Permeabilität der IMM für Na^+ und K^+ , beeinflusste die Leitfähigkeit für das Cholin-Kation aber nicht. Andererseits permeabilisierte MC die IMM für Cl^- , nicht aber für das Gluconat-Anion. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die MC-induzierte Schwellung nicht auf eine Öffnung der mPTP oder eine andere unspezifische Permeabilisierung der IMM zurückzuführen war. Welcher Mechanismus lag stattdessen der durch Behandlung mit MC verursachten Erhöhung der K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten der IMM zugrunde?

Von Tetrazyklinen ist bekannt, dass sie mehrwertige Kationen, also auch Ca^{2+} und Mg^{2+} , komplexieren (Durckheimer, 1975). Mg^{2+} kommt in hohen Konzentrationen in der mitochondrialen Matrix vor (Jung et al., 1997) und reguliert die Aktivität verschiedener Ionen-Transporter der IMM: So werden die Uniporter für Na^+ (Bernardi et al., 1990) und K^+ (Bernardi et al., 1989), der K^+/H^+ -Antiporter (Duszynski und Wojtczak, 1977) sowie der IMAC (Garlid und Beavis, 1986) durch Mg^{2+} inhibiert. Entsprechend bewirkt ein Entzug des mitochondrialen Mg^{2+} , beispielsweise durch das Mg^{2+} - bzw. Ca^{2+} -Ionophor A23187, ein Anschwellen von Mitochondrien in KCl-basiertem, aber nicht in Saccharose-basiertem Medium (Bernardi et al., 1989). Ein ähnlicher Effekt ist von langkettigen Fettsäuren bekannt (Schönfeld et al., 2003), die ebenfalls eine Verringerung der endogenen Mg^{2+} -Konzentration bewirken. Dies legt nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete MC-induzierte Schwellung über die Verringerung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration zu erklären ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Effekt von MC auf

den Mg^{2+} -Gehalt der Mitochondrien getestet. Es zeigte sich, dass MC sowohl in KCl- als auch in Saccharose-basiertem Medium die endogene Mg^{2+} -Konzentration verringert. Dieser Befund schließt die Möglichkeit aus, dass die durch MC verursachte Abnahme der Mg^{2+} -Konzentration lediglich auf der MC-induzierten Schwellung, also einem Verdünnungseffekt, beruhte. Tetrazyklin (TC), das in KCl-basiertem Medium keine mitochondriale Schwellung induzierte, bewirkte eine im Vergleich zu MC deutlich geringere Änderung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration. Dieses Ergebnis könnte durch die geringere Lipophilie des TC erklärt werden: So hat der Verteilungskoeffizient von MC in einem Chloroform-Wasser-Gemisch einen Wert von 30, während der des TC lediglich 0,09 beträgt (Barza et al., 1975). Demzufolge sollte MC deutlich leichter die mitochondrialen Membranen passieren können, als dies für TC der Fall ist.

Wenn die MC-induzierte Schwellung tatsächlich auf eine Verringerung der endogenen Mg^{2+} -Konzentration und die nachfolgende Aktivierung von K^+ -Uniporter und IMAC zurückzuführen ist, so sollte sich diese durch eine Anhebung der extramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentrationen inhibieren lassen. In der Tat verlief die durch MC verursachte Schwellung in Medium mit erhöhtem Mg^{2+} -Gehalt deutlich langsamer (Abb. 3.30). Dieser Befund deutet darauf hin, dass der durch MC verursachte Mg^{2+} -Entzug ursächlich für die mitochondriale Schwellung war. Demzufolge sollte auch eine Blockade der durch den Mg^{2+} -Entzug aktivierten Kanäle die MC-induzierte Schwellung hemmen. In der Tat zeigte sich, dass MC nach Hemmung des *inner membrane anion channel* (IMAC) bzw. nach Blockade des mitochondrialen K^+ -Uniporters nur noch eine geringe Absorptionsabnahme der Mitochondriensuspension bewirkte:

Eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit dem IMAC-Inhibitor Tributylzinnchlorid (TBT, Powers und Beavis, 1991) verursachte zunächst selbst ein starkes Anschwellen der Mitochondrien. Die TBT-induzierte mitochondriale Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung wurde, allerdings unter Verwendung höherer Konzentrationen, bereits beschrieben (Nishikimi et al., 2001; Gogvadze et al., 2002). Die durch TBT bewirkte Translokation von Cytochrom c ist durch CsA inhibierbar, was darauf hindeutet, dass TBT die mPTP öffnet, möglicherweise durch die Modifikation kritischer Thiolreste des ANT (Nishikimi et al., 2001). Jedoch kann TBT auch eine unspezifische, mPTP-unabhängige Schwellung bewirken (Gogvadze et al., 2002), z.T. wegen der Aktivierung des Cl^-/OH^- -Austauschers (Selwyn et al., 1970). Es ergab sich nun, dass der Zusatz von MC in den mit TBT vorbehandelten RLM keine weitere Absorptionsabnahme induzieren konnte (Abb. 3.31). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Aktivierung des IMAC an der MC-induzierten Schwellung beteiligt ist. Aufgrund der eigenen toxischen Effekte des TBT

auf die Mitochondrien konnte jedoch zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die durch TBT verursachte Hemmung der MC-induzierten Schwellung auf anderen Mechanismen als der Blockade des IMAC beruhte. Ein Mitwirken des IMAC an der durch MC ausgelösten Absorptionsabnahme wird jedoch zusätzlich durch den Befund gestützt, dass MC in Kaliumgluconat-basiertem Medium kaum Schwellung induzierte. Es ist bekannt, dass das Gluconat-Anion den IMAC nicht passieren kann (Beavis und Garlid, 1987); eine Öffnung des Anionenkanals kann demnach keinen Nettoeinstrom von Kaliumgluconat und die damit verbundene Veränderung des mitochondrialen Volumens zur Folge haben.

Auch N,N'-Dizyklohexylcarbodiimid (DCCD), ein nicht-spezifischer Hemmstoff des K⁺-Uniporters (Gauthier und Diwan, 1979), war in der Lage, die MC-induzierte Schwellung der Mitochondrien zumindest partiell zu inhibieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der K⁺-Uniporter tatsächlich zur MC-induzierten Schwellung beiträgt. Wiederum wird jedoch die Interpretation der Daten durch die zahlreichen Nebenwirkungen des Inhibitors erschwert: Als Carbodiimid reagiert DCCD unspezifisch mit Carboxyl- und Thiolgruppen (Azzi et al., 1984) und kann daher an eine Reihe von Proteinen binden (siehe Übersichtsartikel in Hassinen und Vuokila, 1993). So blockiert es neben dem K⁺-Uniporter auch den IMAC (Beavis und Garlid, 1988) und den K⁺/H⁺-Antiporter der IMM (Martin et al., 1986) sowie die Komplexe I (NADH-Dehydrogenase, Vuokila und Hassinen, 1988) und V (F₁F₀-ATPase, Hermolin und Fillingame, 1989) der Atmungskette. Andererseits spricht die verringerte MC-induzierte Schwellung in Cholinchlorid-basiertem Medium in starkem Maße für eine Beteiligung des K⁺-Uniporters an der MC-induzierten Schwellung. Das Cholin-Kation wird nicht über den K⁺-Uniporter transportiert (Porter et al., 1992).

Der mitochondriale K⁺-Uniport wird von mindestens drei verschiedenen K⁺-Kanälen vermittelt (O'Rourke, 2007), (i) dem ATP-abhängigen K⁺-Kanal (mitoK_{ATP}), (ii) dem Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal (mitoBK_{Ca}) sowie (iii) dem spannungsabhängigen K⁺-Kanal (mitoKv1.3). Innerhalb der Gruppe dieser Kanäle ist eine Modulierbarkeit durch Mg²⁺ bisher nur für den mitoK_{ATP}-Kanal beschrieben (Bednarczyk et al., 2005). Jedoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass 5-Hydroxydekanoat (5-HD) – ein Hemmstoff des mitoK_{ATP}-Kanals (Jaburek et al., 1998) – die MC-induzierte Schwellung nicht modulieren kann. Welcher der genannten Kanäle für den durch MC-Behandlung induzierten K⁺-Einstrom verantwortlich ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit daher nicht geklärt werden. Aufgrund unspezifischer Nebenwirkungen der verfügbaren pharmakologischen Inhibitoren wäre es zur Beantwortung dieser Frage hilfreich, die Kanäle hochspezifisch mittels siRNA deaktivieren zu können. Jedoch ist der molekulare Aufbau der meisten mitochondrialen

Ionenporter sowie der mPTP (Leung und Halestrap, 2008) bis heute nicht abschließend geklärt (siehe Übersichtsartikel in O'Rourke, 2007).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild über die Wirkung von MC auf isolierte RLM (Abb. 4.1): MC verursacht eine Abnahme der endogenen Mg^{2+} -Konzentration. Dadurch wird die von Mg^{2+} bewirkte Hemmung von mitochondrialem K^+ -Uniporter und IMAC aufgehoben. In der Folge kommt es zum Einstrom von K^+ - und Cl^- -Ionen in die Matrix. Mit den Ionen strömt auch Wasser in die Mitochondrien, wodurch sich das Matrixvolumen vergrößert. Vermutlich aufgrund der dadurch bedingten Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran verursacht dies den Verlust von Cytochrom c, was eine Beeinträchtigung der Atmungskettenfunktion nach sich zieht. Darüber hinaus bewirkt die Hemmung der Atmung sowie die erhöhte Ionenpermeabilität der IMM einen Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ und damit der Ca^{2+} -Aufnahmekapazität der Mitochondrien. In Saccharose-basiertem Medium entzieht MC den Mitochondrien ebenfalls Mg^{2+} ; die nachfolgende Aktivierung der Ionenleitfähigkeiten innerhalb der IMM zieht aufgrund der weitgehenden Abwesenheit von Ionen im Inkubationsmedium jedoch kein Anschwellen der Mitochondrien nach sich. Folgerichtig verbleibt Cytochrom c in den Mitochondrien, die Funktion der Atmungskette bleibt intakt. Die beobachtete geringfügige Depolarisation der Mitochondrien lässt sich vermutlich auf ein durch MC verursachtes Protonenleck zurückführen, wie es von Månsson et al. beschrieben wurde (2007). Trotz des Ausbleibens drastischer Effekte des MC auf die genannten Parameter bewirkt MC auch in Saccharose-Medium eine starke Reduzierung der Ca^{2+} -Aufnahmekapazität der Mitochondrien, möglicherweise infolge einer im Zusammenspiel mit Ca^{2+} -Ionen ausgelösten Aktivierung einer CsA-insensitiven Form der mPTP.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass Cornet et al. eine MC-induzierte Schwellung von Lebermitochondrien in einem nicht-ionischen (gemischt Mannit-/Saccharose-basierten) Medium beobachteten (2004). Diese Schwellung setzte bereits ab einer Konzentration von 25 μM MC ein. Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit selbst bei sehr hohen Konzentrationen an MC (400 μM) keine Schwellung der Mitochondrien in Saccharose-basiertem Medium beobachtet werden. Die Gründe für diesen drastischen Unterschied bleiben unklar. Möglicherweise spielt die Phosphatkonzentration eine Rolle: In der zitierten Studie wurde Phosphat-freies Medium verwendet, während in der vorliegenden Arbeit eine Phosphatkonzentration von 1 mM eingesetzt wurde. Wie oben dargestellt, ist die MC-induzierte Schwellung in Abwesenheit von Phosphat maximal. Es ist daher nicht auszuschließen, dass MC auch in Saccharose-basiertem Medium eventuell eine Schwellung ver-

ursachen kann, wenn das Medium keinerlei Phosphat enthält, was jedoch in keinsten Weise der physiologischen Situation entspräche.

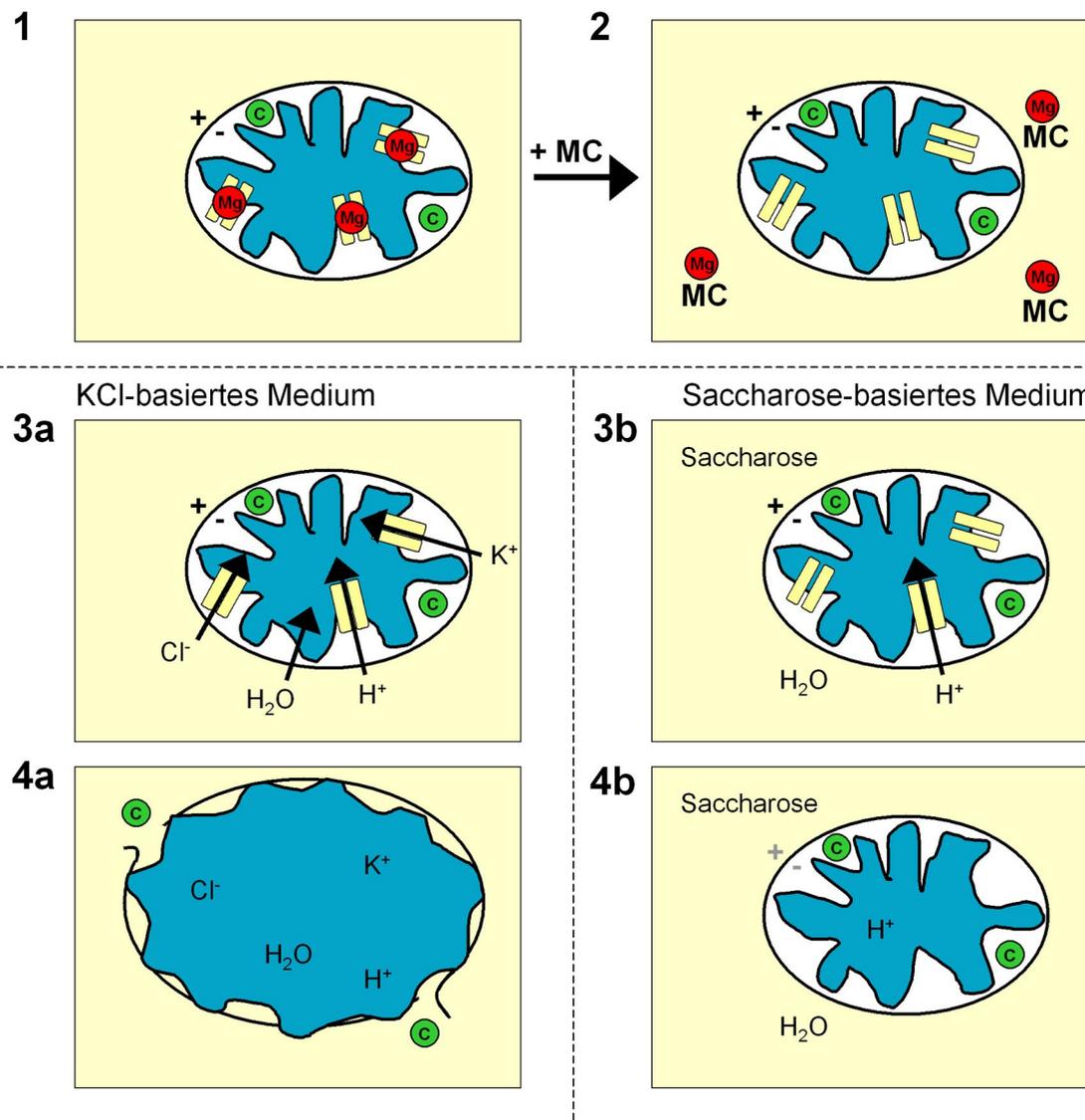


Abb. 4.1: Effekte von Minozyklin auf isolierte Mitochondrien

(1) In unbehandelten Mitochondrien sind die Ionenkanäle der inneren Mitochondrienmembran aufgrund der Inhibition durch Mg^{2+} (rot) inaktiv, das Membranpotential ist intakt, das gesamte Cytochrom c (grün) befindet sich im Intermembranspalt. (2) Zugabe von MC bewirkt eine Komplexbildung der Mg^{2+} -Ionen, diese können die verschiedenen Ionenporter nicht mehr blockieren. (3a) In KCl-basiertem Medium führt die Erhöhung der Ionenleitfähigkeiten u.a. zu einem Nettoeinstrom von KCl; osmotisch folgt Wasser. (4a) Dies bewirkt den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ sowie ein Anschwellen der Mitochondrien, die äußere Mitochondrienmembran reißt und Cytochrom c kann den Intermembranspalt verlassen. (3b) Saccharose hingegen kann die durch Mg^{2+} -Entzug aktivierten Ionenkanäle nicht passieren. (4b) Entsprechend führt die Behandlung mit MC in Saccharose-Medium nicht zu einem Anschwellen der Mitochondrien. In hohen Konzentrationen bewirkt MC allerdings eine geringfügige Depolarisation, die sich durch die Aktivierung eines H^+ -Lecks in der inneren Mitochondrienmembran erklären lässt.

Wegen der einfacheren Präparation von Lebermitochondrien werden diese häufig anstelle von Hirnmitochondrien als Modell für neurodegenerative Erkrankungen gewählt. Jedoch unterscheiden sich die Mitochondrien der beiden Gewebe in zahlreichen Aspekten: So ist die mPTP neuraler Mitochondrien im Vergleich zu Lebermitochondrien weniger sensitiv

gegenüber Ca^{2+} , P_i oder anderen auslösenden Faktoren (Andreyev und Fiskum, 1999; Berman et al., 2000). Zudem existieren beträchtliche gewebespezifische Unterschiede in den mitochondrialen Enzymaktivitäten (Jacobus und Lehninger, 1973; Kunz und Gellerich, 1993; Benard et al., 2006) sowie im Cardiolipingehalt der IMM (Daum, 1985). Entsprechend heterogen reagieren Mitochondrien aus Leber und Hirn auf verschiedene Stimuli (Marin-Garcia et al., 1995; Panov et al., 2006; Kupsch et al., 2007). Um beurteilen zu können, inwieweit sich das oben dargestellte Schema (Abb. 4.1) auf Hirnmitochondrien übertragen lässt, wurden daher einige der an RLM durchgeführten Experimente an isolierten Rattenhirnmitochondrien (*rat brain mitochondria*, RBM) wiederholt. Bei der Untersuchung der RBM fiel zunächst die relative Insensitivität der durch Ca^{2+} verursachten Schwellung gegenüber CsA auf. So konnte CsA das Ausmaß der Ca^{2+} -induzierten Absorptionsabnahme nicht verringern, verlangsamte die Schwellungsgeschwindigkeit allerdings signifikant (Abb. 3.33). Daher kann für die vorliegende Arbeit auch im Falle der RBM davon ausgegangen werden, dass die Ca^{2+} -abhängige Schwellung mPTP-vermittelt war. Die im Vergleich zu RLM verringerte Modulierbarkeit der mPTP neuraler Mitochondrien durch CsA ist bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben worden (Kristal und Dubinsky, 1997; Berman et al., 2000; Chinopoulos et al., 2003). Hingegen berichteten Hansson et al., dass sich die Ca^{2+} -induzierte Schwellung von RBM durch CsA komplett inhibieren lässt (2003).

Im Gegensatz zu Lebermitochondrien induzierte MC in KCl-basiertem Medium keine Schwellung von RBM. Zudem zeigte sich auch kein Effekt von MC auf das Membranpotential von in KCl-basiertem Medium suspendierten RBM. Wie kann dieser enorme Unterschied im Verhalten von Hirn- und Lebermitochondrien gedeutet werden? Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Präparation von Hirnmitochondrien wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht experimentell überprüft, ob MC auch in RBM die endogene Mg^{2+} -Konzentration abzusenken vermag. In Anbetracht seiner hohen Lipophilie sowie seiner Komplexbildungseigenschaften ist jedoch zu erwarten, dass MC unabhängig von der Art der verwendeten Mitochondrien in der Lage ist, Mg^{2+} zu komplexieren und somit die intramitochondriale Mg^{2+} -Konzentration zu verringern. Auch konnte bereits vor über 30 Jahren gezeigt werden, dass Mg^{2+} -Ionen die Na^+ - und K^+ -Uniporter von RBM ebenso inhibieren (Nicklas et al., 1971; Bernard und Cockrell, 1979), wie dies bei RLM der Fall ist. Für den IMAC von RBM ist nichts über seine Regulierbarkeit durch Mg^{2+} bekannt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass MC auch in RBM eine Erhöhung der genannten Ionenleitfähigkeiten bewirken kann. Allerdings ist bereits beschrieben worden, dass sich das Schwellungsverhalten von RBM deutlich von dem der RLM unterscheidet:

So ändert sich das Matrixvolumen von RBM nach Aktivierung der mPTP in einem im Vergleich zu RLM wesentlich geringeren Ausmaß (Kobayashi et al., 2003). Auch in der hier vorliegenden Arbeit fiel die Ca^{2+} -induzierte Schwellung in RBM deutlich geringer aus als in RLM. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in dem unterschiedlichen Aufbau der Kontaktstellen zwischen IMM und OMM in Hirn- und Lebermitochondrien. Für diese Annahme spricht, dass die mitochondriale Kreatinkinase (mtCK), ein wichtiger Bestandteil dieser Kontaktstellen (siehe Übersichtsartikel in Brdiczka et al., 2006), in Lebermitochondrien im Gegensatz zu Hirn- und Herzmitochondrien nicht exprimiert wird (Rojo et al., 1991). Speer et al. konnten zeigen, dass mtCK-enthaltende Lebermitochondrien aus transgenen Mäusen deutlich weniger anschwellen als solche aus Wildtyp-Tieren (2005). Möglicherweise wird also die Struktur der hier verwendeten RBM durch die mtCK derart stabilisiert, dass diese im Vergleich zu den RLM resistenter gegenüber der MC-induzierten Schwellung waren. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei Einsatz höherer Konzentrationen an MC ($\geq 100 \mu\text{M}$) eine leichte Schwellung von RBM induziert werden kann. Wie aber erklärt sich die fehlende depolarisierende Wirkung von MC auf RBM?

Zunächst ist zu erwähnen, dass kleine Änderungen des $\Delta\psi_m$ von Safranin-O nicht registriert werden; erst ab einer Depolarisation um etwa 50 mV treten Änderungen in der Fluoreszenzintensität auf (Waldmeier et al., 2002). Deshalb kann trotz der fehlenden Erhöhung der Safranin-O-Fluoreszenz nach MC-Gabe eine geringfügige Depolarisation nicht ausgeschlossen werden. Der Unterschied zu den RLM erklärt sich möglicherweise durch die in RBM nicht aufgetretene Schwellung: Eine Steigerung der Safranin-O-Fluoreszenz zeigt zunächst ein *Unquenching* an, also eine Verdünnung des Farbstoffes innerhalb der Mitochondrien. Dies kann jedoch nicht nur durch eine Depolarisation erreicht werden, also ein potentialabhängiges Herausdiffundieren des Farbstoffes aus dem Matrixraum, sondern auch durch eine Vergrößerung des Matrixvolumens. Das rapide Anschwellen der RLM in KCl-basiertem Medium könnte daher den *Unquenching*-Effekt verstärkt haben und somit zu der in RLM beobachteten drastischen Erhöhung der Safranin-O-Fluoreszenz beigetragen haben. In RBM, in denen MC keine Schwellung induzierte, fehlte dieser zusätzliche Effekt. In zukünftigen Arbeiten sollte $\Delta\psi_m$ daher mit einer weiteren, sensitiveren Methode bestimmt werden. So hat die Verwendung des Farbstoffes 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyaninchlorid (JC-1) den Vorteil, dass sich bereits Potentialänderungen von etwa 20 mV messen lassen (Smiley et al., 1991). Anstelle eines Fluoreszenzfarbstoffes käme auch der Einsatz spezifischer Elektroden für das lipophile Tetraphenylphosphonium (TPP^+) in Frage (Labajova et al., 2006), dessen Verteilung vom Mem-

branpotential abhängt. Ähnlich wie bei JC-1 können auch mit TPP⁺ kleinere Änderungen von $\Delta\psi_m$ (~ 10 mV) gemessen werden (Holmuhamedov et al., 1998). Allerdings ist von TPP⁺ bekannt, dass es mitochondriale Ionentransportmechanismen moduliert (Karadjov et al., 1986) und die Oxidation verschiedener Substrate inhibiert (Mildaziene et al., 1997).

Ähnlich wie bei den RLM, so zeigte sich auch in MC-behandelten RBM eine ausgeprägte Blockade der Ca²⁺-Aufnahme. Entsprechend lässt sich auch für Hirnmitochondrien eine Hemmung der mPTP durch MC ausschließen, da diese eine Erhöhung der Ca²⁺-Aufnahmekapazität zur Folge hätte. Stattdessen bewirkte MC abermals, dass es schon bei geringen Ca²⁺-Konzentrationen zu einem Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ und damit verbunden zu einer Freisetzung des akkumulierten Ca²⁺ kam. Wie im Falle der RLM schien also MC die Ca²⁺-Sensitivität der mPTP eher zu erhöhen.

4.3 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse verstärken die bereits geäußerten Zweifel am neuroprotektiven Potential des Antibiotikums Minozyklin (siehe Übersichtsartikel in Diguët et al., 2004). Zum einen zeigte sich, dass MC in einem *in vitro*-Modell des Morbus Alzheimer nicht vor A β_{25-35} -induziertem Zelltod schützen kann. Zum anderen ergaben die Untersuchungen an isolierten Mitochondrien Hinweise auf zahlreiche schädigende Effekte des MC auf die Funktionstüchtigkeit der Organellen. Die bisherige Hypothese, dass MC die mPTP hemmt und auf diese Weise den Zelltod verhindern kann, wird durch die hier präsentierten Ergebnisse nachdrücklich in Frage gestellt.

Da die Behandlung isolierter RLM mit MC die Freisetzung von Cytochrom c auslöste, wäre im Gegenteil zu erwarten, dass eine MC-Behandlung in Zellen die Aktivierung des Apoptosoms und somit Apoptose auslösen kann. Aufgrund der Einschränkung der mitochondrialen Atmung durch MC ist zudem zu vermuten, dass MC auch die Bereitstellung von ATP beeinträchtigen und damit den nekrotischen Zelltod begünstigen kann, im Besonderen im Gehirn, dessen Energieverbrauch in Bezug zu seiner Masse besonders hoch ist. Allerdings ist auch bekannt, dass MC eine ganze Reihe mitochondrien-unabhängiger Effekte auf die Zelle hat, die durchaus neuroprotektive Wirkungen haben können. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit die an isolierten Mitochondrien gewonnenen Ergebnisse die Situation *in situ* oder gar *in vivo* widerspiegeln.

Ein wesentlicher Aspekt dabei ist die zelluläre MC-Konzentration: MC wird intrazellulär durch das dort abundant vorhandene Mg²⁺ (Romani und Scarpa, 2000) komplexiert und seine effektive Konzentration somit gesenkt. In der Blutbahn bindet zudem ein Großteil

des MC (~ 75 %) an Serumproteine (Barza et al., 1975). Infolgedessen liegt dort nur etwa 1 % des Gesamt-MC als freies MC vor (Berthon et al., 1983). Eine Studie an Ratten ergab, dass selbst nach intravenöser Verabreichung von – im Vergleich zu den üblicherweise in klinischen Studien eingesetzten Mengen – recht hohen Dosen (25 mg/kg Körpergewicht) im Hirngewebe nur eine MC-Konzentration im niedrigen mikromolaren Bereich ($< 10 \mu\text{M}$) erreicht wird (Colovic und Caccia, 2003). Eine Untersuchung an Mäusen kam zu ähnlichen Ergebnissen (Milane et al., 2007). Die hier beobachteten MC-induzierten Schädigungen der Mitochondrien traten hingegen erst ab einer Konzentration von etwa $25 \mu\text{M}$ auf. Allerdings zeigte sich auch, dass die negativen Effekte durch Ca^{2+} -Ionen drastisch verstärkt werden und dies bereits bei geringeren Dosen an MC ($10 \mu\text{M}$). Demzufolge ist es denkbar, dass eine MC-Behandlung im Zusammenhang mit Faktoren, die die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration erhöhen, auf Zellen oder Organismen schädliche Auswirkungen haben kann. Tatsächlich zeigten einige Studien, dass MC auf Zellebene sowie im Tiermodell verschiedene toxische Effekte ausübt: So verstärkt MC den durch 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) ausgelösten Zelltod dopaminerger Zellen im Striatum von Mäusen (Yang et al., 2003). Auch in Tiermodellen des Morbus Huntington (Diguët et al., 2004) sowie des Schlaganfalls (Tsuji et al., 2004) wurden schädliche Effekte beobachtet. Zudem wurde in einer Phase III-Studie an ALS-Patienten festgestellt, dass MC den Krankheitsverlauf verschlimmert (Gordon et al., 2004). Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern erstmals eine mögliche Erklärung für die in der Literatur beschriebenen toxischen Wirkungen des MC.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Tetrazyklin-Derivat Minozyklin (MC) besitzt neben seiner antibiotischen Wirkung auch neuroprotektive Eigenschaften. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Hypothese, dass eine Blockade der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) bei der Schutzwirkung durch MC eine Rolle spielt. Diese Fragestellung wurde zunächst anhand eines Zellkulturmodells des Morbus Alzheimer untersucht. Es zeigte sich, dass MC zwar die durch $A\beta_{25-35}$ verursachte Hemmung der zellulären MTT-Reduktion aufzuheben vermag, den $A\beta_{25-35}$ -induzierten Zelltod jedoch nicht inhibiert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der oftmals verwendete MTT-Assay kein geeigneter Vitalitätstest zur Abschätzung $A\beta$ -vermittelter Toxizität ist. Zudem konnte keine Beteiligung der mPTP am $A\beta_{25-35}$ -induzierten Zelltod festgestellt werden. Die Effekte von MC auf die mPTP wurden daher im Anschluss auf der Ebene isolierter Mitochondrien untersucht. Es zeigte sich, dass MC in der Lage ist, die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung von in Saccharose-Medium inkubierten Rattenlebermitochondrien (RLM) zu verhindern. Allerdings war dieser Effekt nicht auf eine Blockade der mPTP zurückzuführen. Stattdessen bewirkte MC sogar eine drastische Verringerung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahmekapazität. Darüber hinaus zeigte sich in einem physiologischeren, KCl-basierten Medium, dass MC selbst eine mPTP-unabhängige mitochondriale Schwellung und Depolarisation induziert. In diesem Fall bewirkte MC zudem die Freisetzung des proapoptischen Proteins Cytochrom c sowie eine Hemmung der mitochondrialen Redoxaktivität. Diese toxischen Effekte des Antibiotikums korrelierten mit seiner Eigenschaft, den RLM Mg^{2+} -Ionen zu entziehen. Von einer Absenkung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration ist aus der Literatur bekannt, dass sie die Aktivierung zahlreicher Ionenporter der inneren Mitochondrienmembran (u.a. mitochondrialer K^+ -Uniporter, *inner membrane anion channel*) nach sich zieht. Tatsächlich zeigte sich, dass eine Erhöhung des Matrix- Mg^{2+} sowie eine Blockade der genannten Kanäle die MC-induzierte Schwellung reduziert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verstärken die Zweifel am neuroprotektiven Potential des MC. Zudem widersprechen die präsentierten Daten der Hypothese, dass MC die mPTP hemmt. Stattdessen zeigte sich, dass MC die Mitochondrien schädigt, indem es eine Absenkung der intramitochondrialen Mg^{2+} -Konzentration bewirkt. Dieser bisher nicht beschriebene Effekt liefert eine mögliche Erklärung für die aus der Literatur bekannten toxischen Wirkungen des Antibiotikums.

6 ABSTRACT

The semisynthetic tetracycline derivative minocycline (MC) has been shown to exert neuroprotective effects in models of various neurodegenerative diseases. The underlying mechanisms, however, remain largely controversial. The aim of the present study was to investigate whether an inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) may contribute to MC-related neuroprotection. Using primary hippocampal cultures as an *in vitro* model of Alzheimer's disease, it was found that MC abolishes the A β_{25-35} -induced inhibition of cellular MTT-reduction. However, this effect did not correlate with any protective action of MC against A β_{25-35} -induced cell death. These data clearly show that the MTT-assay, which is commonly used to assess cell death, is not an appropriate assay system to detect A β -related neurotoxicity. It was also shown that an activation of the mPTP did not contribute to A β_{25-35} -triggered cell death. Therefore, the effect of MC on the opening state of the mPTP was studied in isolated rat liver mitochondria (RLM). It was found that MC blocked Ca²⁺-induced swelling and cytochrome c release from RLM incubated in sucrose-based medium. However, this effect was not associated with an inhibition of mPTP-opening, as MC reduced the mitochondrial Ca²⁺-retention capacity. In a more physiological, KCl-based medium, MC itself induced an mPTP-independent swelling and depolarisation of RLM. In this case, MC triggered the release of pro-apoptotic cytochrome c from the RLM and inhibited mitochondrial redox activity. These toxic effects of MC correlated well with its ability to deplete mitochondria from endogenous Mg²⁺, most probably by forming complexes with the cation. Intramitochondrial Mg²⁺ is known to block various ion conducting pathways within the inner mitochondrial membrane (IMM), such as the mitochondrial K⁺-uniporter and the inner membrane anion channel. A pharmacological inhibition of these channels largely inhibited MC-related swelling. Moreover, an increase in medium Mg²⁺-concentration also abolished MC-triggered swelling. These data indicate that indeed a depletion of intramitochondrial Mg²⁺ and the subsequent activation of ion channels within the IMM accounted for the swelling observed upon addition of MC.

Taken together, the present study raises doubts as to whether MC is a promising neuroprotectant. Moreover, the data obtained disprove the view that MC acts as an inhibitor of the mPTP. Instead, it was found that MC itself strongly impairs mitochondrial physiology by decreasing matrix Mg²⁺. This hitherto unknown effect of MC provides an explanation for the previously reported detrimental actions of the antibiotic.

7 LITERATUR

- K. Abe und H. Saito (1998). "Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes." *Neurosci Res* **31**(4): 295-305.
- K. Abe und H. Saito (1999). "Cholesterol does not affect the toxicity of amyloid beta fragment but mimics its effect on MTT formazan exocytosis in cultured rat hippocampal neurons." *Neurosci Res* **35**(3): 165-74.
- A. Y. Abramov, L. Canevari und M. R. Duchon (2003). "Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity." *J Neurosci* **23**(12): 5088-95.
- A. Y. Abramov, L. Canevari und M. R. Duchon (2004). "Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture." *Biochim Biophys Acta* **1742**(1-3): 81-7.
- A. M. Aleardi, G. Benard, O. Augereau, M. Malgat, J. C. Talbot, J. P. Mazat, T. Letellier, J. Dachary-Prigent, G. C. Solaini und R. Rossignol (2005). "Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release." *J Bioenerg Biomembr* **37**(4): 207-25.
- J. W. Allen, B. A. Eldadah, X. Huang, S. M. Knoblach und A. I. Faden (2001). "Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis." *J Neurosci Res* **65**(1): 45-53.
- I. Al-Nasser und M. Crompton (1986). "The reversible Ca²⁺-induced permeabilization of rat liver mitochondria." *Biochem J* **239**(1): 19-29.
- A. Alzheimer (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* **64**: 146-48.
- A. R. Amin, M. G. Attur, G. D. Thakker, P. D. Patel, P. R. Vyas, R. N. Patel, I. R. Patel und S. B. Abramson (1996). "A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 14014-9.
- C. D. Anderson, J. Pierce, I. Nicoud, A. Belous, C. D. Knox und R. S. Chari (2005). "Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury." *Liver Transpl* **11**(6): 663-8.
- S. A. Andrabi, I. Sayeed, D. Siemen, G. Wolf und T. F. Horn (2004). "Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin." *Faseb J* **18**(7): 869-71.
- A. Andreyev und G. Fiskum (1999). "Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver." *Cell Death Differ* **6**(9): 825-32.
- B. Antonsson, F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J. J. Mermoud, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul und J. C. Martinou (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." *Science* **277**(5324): 370-2.
- N. Arispe, E. Rojas und H. B. Pollard (1993). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 567-71.

- A. Azzi, R. P. Casey und M. J. Nalecz (1984). "The effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on enzymes of bioenergetic relevance." *Biochim Biophys Acta* **768**(3-4): 209-26.
- M. Barza, R. B. Brown, C. Shanks, C. Gamble und L. Weinstein (1975). "Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs." *Antimicrob Agents Chemother* **8**(6): 713-20.
- E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M. A. Forte und P. Bernardi (2005). "Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D." *J Biol Chem* **280**(19): 18558-61.
- A. D. Beavis und K. D. Garlid (1987). "The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalent cations and protons." *J Biol Chem* **262**(31): 15085-93.
- A. D. Beavis und K. D. Garlid (1988). "Inhibition of the mitochondrial inner membrane anion channel by dicyclohexylcarbodiimide. Evidence for a specific transport pathway." *J Biol Chem* **263**(16): 7574-80.
- P. Bednarczyk, K. Dolowy und A. Szewczyk (2005). "Matrix Mg²⁺ regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart." *FEBS Lett* **579**(7): 1625-32.
- C. Behl, J. Davis, G. M. Cole und D. Schubert (1992). "Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(2): 944-50.
- G. Benard, B. Faustin, E. Passerieux, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, J. P. Delage, L. Casteilla, T. Letellier und R. Rossignol (2006). "Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(6): C1172-82.
- S. B. Berman, S. C. Watkins und T. G. Hastings (2000). "Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria." *Exp Neurol* **164**(2): 415-25.
- P. A. Bernard und R. S. Cockrell (1979). "The respiration of brain mitochondria and its regulation by monovalent cation transport." *Biochim Biophys Acta* **548**(2): 173-86.
- P. Bernardi (1992). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization." *J Biol Chem* **267**(13): 8834-9.
- P. Bernardi, A. Angrilli, V. Ambrosin und G. F. Azzone (1989). "Activation of latent K⁺ uniport in mitochondria treated with the ionophore A23187." *J Biol Chem* **264**(32): 18902-6.
- P. Bernardi, A. Angrilli und G. F. Azzone (1990). "A gated pathway for electrophoretic Na⁺ fluxes in rat liver mitochondria. Regulation by surface Mg²⁺." *Eur J Biochem* **188**(1): 91-7.
- M. V. Berridge und A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Arch Biochem Biophys* **303**(2): 474-82.
- G. Berthon, M. Brion und L. Lambs (1983). "Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 2. Potentiometric study of magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and minocycline, and discussion of their possible in-

- fluence on the bioavailability of these antibiotics in blood plasma." *J Inorg Biochem* **19**(1): 1-18.
- G. Beutner, A. Ruck, B. Riede und D. Brdiczka (1998). "Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases." *Biochim Biophys Acta* **1368**(1): 7-18.
- K. Beyreuther, G. Multhaup, U. Monning, R. Sandbrink, D. Beher, L. Hesse, D. H. Small und C. L. Masters (1996). "Regulation of APP expression, biogenesis and metabolism by extracellular matrix and cytokines." *Ann N Y Acad Sci* **777**: 74-6.
- H. Bickel (2001). "[Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]." *Z Gerontol Geriatr* **34**(2): 108-15.
- A. Bjorklund und U. Stenevi (1979). "Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants." *Brain Res* **177**(3): 555-60.
- D. Blum, A. Chtarto, L. Tenenbaum, J. Brotchi und M. Levivier (2004). "Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders." *Neurobiol Dis* **17**(3): 359-66.
- L. N. Boggs, K. S. Fuson, M. Baez, L. Churgay, D. McClure, G. Becker und P. C. May (1996). "Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity." *J Neurochem* **67**(3): 1324-7.
- R. M. Bonelli, A. K. Hodl, P. Hofmann und H. P. Kapfhammer (2004). "Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline." *Int Clin Psychopharmacol* **19**(6): 337-42.
- D. G. Brdiczka, D. B. Zorov und S. S. Sheu (2006). "Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1762**(2): 148-63.
- C. Brenner, H. Cadiou, H. L. Vieira, N. Zamzami, I. Marzo, Z. Xie, B. Leber, D. Andrews, H. Duclouhier, J. C. Reed und G. Kroemer (2000). "Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator." *Oncogene* **19**(3): 329-36.
- M. R. Brown, P. G. Sullivan und J. W. Geddes (2006). "Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca²⁺ overload than nonsynaptic mitochondria." *J Biol Chem* **281**(17): 11658-68.
- V. Brundula, N. B. Rewcastle, L. M. Metz, C. C. Bernard und V. W. Yong (2002). "Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis." *Brain* **125**(Pt 6): 1297-308.
- N. Bye, M. D. Habgood, J. K. Callaway, N. Malakooti, A. Potter, T. Kossmann und M. C. Morganti-Kossmann (2007). "Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration." *Exp Neurol* **204**(1): 220-33.
- L. Canevari und J. B. Clark (2007). "Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection." *Neurochem Res* **32**(4-5): 739-50.
- L. Canevari, J. B. Clark und T. E. Bates (1999). "beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria." *FEBS Lett* **457**(1): 131-4.
- C. S. Casley, L. Canevari, J. M. Land, J. B. Clark und M. A. Sharpe (2002). "Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities." *J Neurochem* **80**(1): 91-100.

- D. S. Cassarino, R. H. Swerdlow, J. K. Parks, W. D. Parker, Jr. und J. P. Bennett, Jr. (1998). "Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential in SY5Y cells and reverses the depressed mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(1): 168-73.
- A. Cavalli, M. L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini und C. Melchiorre (2008). "Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases." *J Med Chem* **51**(3): 347-72.
- A. M. Cesura, E. Pinard, R. Schubanel, V. Goetschy, A. Friedlein, H. Langen, P. Polcic, M. A. Forte, P. Bernardi und J. A. Kemp (2003). "The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore." *J Biol Chem* **278**(50): 49812-8.
- K. Chandrasekaran, K. Hatanpaa, D. R. Brady und S. I. Rapoport (1996). "Evidence for physiological down-regulation of brain oxidative phosphorylation in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **142**(1): 80-8.
- E. Chavez, N. Garcia, C. Zazueta, F. Correa, C. Aviles, G. Garcia und E. O. Balam (2003). "The composition of the incubation medium influences the sensitivity of mitochondrial permeability transition to cyclosporin A." *J Bioenerg Biomembr* **35**(2): 149-56.
- E. Chavez, R. Moreno-Sanchez, C. Zazueta, H. Reyes-Vivas und D. Arteaga (1991). "Intramitochondrial K⁺ as activator of carboxyatractyloside-induced Ca²⁺ release." *Biochim Biophys Acta* **1070**(2): 461-6.
- C. W. Chen, R. M. Boiteau, W. F. Lai, S. W. Barger und A. M. Cataldo (2006). "sAPP α enhances the transdifferentiation of adult bone marrow progenitor cells to neuronal phenotypes." *Curr Alzheimer Res* **3**(1): 63-70.
- M. Chen, V. O. Ona, M. Li, R. J. Ferrante, K. B. Fink, S. Zhu, J. Bian, L. Guo, L. A. Farrell, S. M. Hersch, W. Hobbs, J. P. Vonsattel, J. H. Cha und R. M. Friedlander (2000). "Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease." *Nat Med* **6**(7): 797-801.
- C. Chinopoulos, A. A. Starkov und G. Fiskum (2003). "Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate." *J Biol Chem* **278**(30): 27382-9.
- S. H. Choi, D. Y. Lee, E. S. Chung, Y. B. Hong, S. U. Kim und B. K. Jin (2005). "Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra in vivo." *J Neurochem* **95**(6): 1755-65.
- Y. Choi, H. S. Kim, K. Y. Shin, E. M. Kim, M. Kim, C. H. Park, Y. H. Jeong, J. Yoo, J. P. Lee, K. A. Chang, S. Kim und Y. H. Suh (2007). "Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models." *Neuropsychopharmacology* **32**(11): 2393-404.
- M. Colovic und S. Caccia (2003). "Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **791**(1-2): 337-43.
- S. Cornet, B. Spinnewyn, S. Delaflotte, C. Charnet, V. Roubert, C. Favre, H. Hider, P. E. Chabrier und M. Auguet (2004). "Lack of evidence of direct mitochondrial involvement in the neuroprotective effect of minocycline." *Eur J Pharmacol* **505**(1-3): 111-9.

- P. Costantini, A. S. Belzacq, H. L. Vieira, N. Larochette, M. A. de Pablo, N. Zamzami, S. A. Susin, C. Brenner und G. Kroemer (2000). "Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis." *Oncogene* **19**(2): 307-14.
- C. W. Cotman, C. J. Pike und A. Copani (1992). "beta-Amyloid neurotoxicity: a discussion of in vitro findings." *Neurobiol Aging* **13**(5): 587-90.
- M. Crompton (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." *Biochem J* **341** (Pt 2): 233-49.
- M. Crompton, H. Ellinger und A. Costi (1988). "Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress." *Biochem J* **255**(1): 357-60.
- G. Daum (1985). "Lipids of mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **822**(1): 1-42.
- F. De Giorgi, L. Lartigue, M. K. Bauer, A. Schubert, S. Grimm, G. T. Hanson, S. J. Remington, R. J. Youle und F. Ichas (2002). "The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization." *Faseb J* **16**(6): 607-9.
- L. Dejean, Y. Camara, B. Sibille, G. Solanes und F. Villarroja (2004). "Uncoupling protein-3 sensitizes cells to mitochondrial-dependent stimulus of apoptosis." *J Cell Physiol* **201**(2): 294-304.
- E. M. Denovan-Wright, S. Devarajan, S. M. Dursun und H. A. Robertson (2002). "Maintained improvement with minocycline of a patient with advanced Huntington's disease." *J Psychopharmacol* **16**(4): 393-4.
- J. DeVincenzo, J. E. Cehelsky, R. Alvarez, S. Elbashir, J. Harborth, I. Toudjarska, L. Nechev, V. Murugaiah, A. Van Vliet, A. K. Vaishnav und R. Meyers (2008). "Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)." *Antiviral Res* **77**(3): 225-31.
- G. Diaz, A. Diana, A. M. Falchi, F. Gremo, A. Pani, B. Batetta, S. Dessi und R. Isola (2001). "Intra- and intercellular distribution of mitochondrial probes and changes after treatment with MDR modulators." *IUBMB Life* **51**(2): 121-6.
- G. Diaz, M. Melis, A. Musin, M. Piludu, M. Piras und A. M. Falchi (2007). "Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates." *Eur J Histochem* **51**(3): 213-8.
- E. Diguët, P. O. Fernagut, X. Wei, Y. Du, R. Rouland, C. Gross, E. Bezard und F. Tison (2004). "Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease." *Eur J Neurosci* **19**(12): 3266-76.
- E. Diguët, C. E. Gross, F. Tison und E. Bezard (2004). "Rise and fall of minocycline in neuroprotection: need to promote publication of negative results." *Exp Neurol* **189**(1): 1-4.
- H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. S. A, M. M. G, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkentin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen und S. D. Yan (2008). "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease." *Nat Med*.
- W. Durckheimer (1975). "Tetracyclines: chemistry, biochemistry, and structure-activity relations." *Angew Chem Int Ed Engl* **14**(11): 721-34.

- J. Duszynski und L. Wojtczak (1977). "Effect of Mg²⁺ depletion of mitochondria on their permeability to K⁺: the mechanism by which ionophore A23187 increases K⁺ permeability." *Biochem Biophys Res Commun* **74**(2): 417-24.
- D. Edbauer, E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner und C. Haass (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." *Nat Cell Biol* **5**(5): 486-8.
- F. S. Esch, P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure und P. J. Ward (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." *Science* **248**(4959): 1122-4.
- A. I. Faden und B. Stoica (2007). "Neuroprotection: challenges and opportunities." *Arch Neurol* **64**(6): 794-800.
- A. Familian, R. S. Boshuizen, P. Eikelenboom und R. Veerhuis (2006). "Inhibitory effect of minocycline on amyloid beta fibril formation and human microglial activation." *Glia* **53**(3): 233-40.
- R. Fan, F. Xu, M. L. Previti, J. Davis, A. M. Grande, J. K. Robinson und W. E. Van Nostrand (2007). "Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid." *J Neurosci* **27**(12): 3057-63.
- G. Feldmann, D. Haouzi, A. Moreau, A. M. Durand-Schneider, A. Bringuier, A. Berson, A. Mansouri, D. Fau und D. Pessayre (2000). "Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice." *Hepatology* **31**(3): 674-83.
- F. J. Fernandez-Gomez, M. F. Galindo, M. Gomez-Lazaro, C. Gonzalez-Garcia, V. Cena, N. Aguirre und J. Jordan (2005). "Involvement of mitochondrial potential and calcium buffering capacity in minocycline cytoprotective actions." *Neuroscience* **133**(4): 959-67.
- F. J. Fernandez-Gomez, M. Gomez-Lazaro, D. Pastor, S. Calvo, N. Aguirre, M. F. Galindo und J. Jordan (2005). "Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death." *Neurobiology of Disease* **20**(2): 384-391.
- P. Fernandez-Vizarra, A. P. Fernandez, S. Castro-Blanco, J. Serrano, M. L. Bentura, R. Martinez-Murillo, A. Martinez und J. Rodrigo (2004). "Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease." *Histol Histopathol* **19**(3): 823-44.
- E. Ferreiro, C. R. Oliveira und C. Pereira (2004). "Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide." *J Neurosci Res* **76**(6): 872-80.
- E. Ferreiro, C. R. Oliveira und C. M. Pereira (2008). "The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway." *Neurobiol Dis.*
- C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer und M. Sczufca (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." *Lancet* **366**(9503): 2112-7.
- B. W. Festoff, S. Ameenuddin, P. M. Arnold, A. Wong, K. S. Santacruz und B. A. Citron (2006). "Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury." *J Neurochem* **97**(5): 1314-26.

- R. Filipovic und N. Zecevic (2008). "Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia." *Exp Neurol* **211**(1): 41-51.
- C. Fox, A. Dingman, N. Derugin, M. F. Wendland, C. Manabat, S. Ji, D. M. Ferriero und Z. S. Vexler (2005). "Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion." *J Cereb Blood Flow Metab* **25**(9): 1138-49.
- C. R. Freed, P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg und S. Fahn (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." *N Engl J Med* **344**(10): 710-9.
- B. Fuks, P. Talaga, C. Huart, J.-P. Henichart, K. Bertrand, R. Grimee und G. Lorent (2005). "In vitro properties of 5-(benzylsulfonyl)-4-bromo-2-methyl-3(2H)-pyridazinone: A novel permeability transition pore inhibitor." *European Journal of Pharmacology* **519**(1-2): 24-30.
- J. B. Galper und J. E. Darnell (1971). "Mitochondrial protein synthesis in HeLa cells." *J Mol Biol* **57**(2): 363-7.
- G. A. Garden und T. Moller (2006). "Microglia biology in health and disease." *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(2): 127-37.
- K. D. Garlid und A. D. Beavis (1986). "Evidence for the existence of an inner membrane anion channel in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **853**(3-4): 187-204.
- L. M. Gauthier und J. J. Diwan (1979). "Inhibition of K⁺ flux into rat liver mitochondria by dicyclohexylcarbodiimide." *Biochem Biophys Res Commun* **87**(4): 1072-9.
- I. Gautier, V. Geeraert, J. Coppey, M. Coppey-Moisan und C. Durieux (2000). "A moderate but not total decrease of mitochondrial membrane potential triggers apoptosis in neuron-like cells." *Neuroreport* **11**(13): 2953-6.
- J. Ghiso, A. Rostagno, J. E. Gardella, L. Liem, P. D. Gorevic und B. Frangione (1992). "A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion." *Biochem J* **288** (Pt 3): 1053-9.
- S. Gilman, M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette und J. M. Orgogozo (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." *Neurology* **64**(9): 1553-62.
- V. Gogvadze, S. Orrenius und B. Zhivotovsky (2006). "Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1757**(5-6): 639-47.
- V. Gogvadze, J. D. Robertson, M. Enoksson, B. Zhivotovsky und S. Orrenius (2004). "Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition." *Biochem J* **378**(Pt 1): 213-7.
- V. Gogvadze, H. Stridh, S. Orrenius und I. Cotgreave (2002). "Tributyltin causes cytochrome C release from isolated mitochondria by two discrete mechanisms." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 904-8.
- P. Gonzalez-Alegre und H. L. Paulson (2007). "Technology insight: therapeutic RNA interference--how far from the neurology clinic?" *Nat Clin Pract Neurol* **3**(7): 394-404.

- P. H. Gordon, D. H. Moore, D. F. Gelinas, C. Qualls, M. E. Meister, J. Werner, M. Mendoza, J. Mass, G. Kushner und R. G. Miller (2004). "Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* **62**(10): 1845-7.
- P. H. Gordon, D. H. Moore, R. G. Miller, J. M. Florence, J. L. Verheijde, C. Doorish, J. F. Hilton, G. M. Spitalny, R. B. Macarthur, H. Mitsumoto, H. E. Neville, K. Boylan, T. Mozaffar, J. M. Belsh, J. Ravits, R. S. Bedlack, M. C. Graves, L. F. McCluskey, R. J. Barohn und R. Tandan (2007). "Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial." *Lancet Neurol.*
- A. Gough, S. Chapman, K. Wagstaff, P. Emery und E. Elias (1996). "Minocycline induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome." *Bmj* **312**(7024): 169-72.
- V. Goulden, D. Glass und W. J. Cunliffe (1996). "Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne." *Br J Dermatol* **134**(4): 693-5.
- E. J. Griffiths und A. P. Halestrap (1995). "Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion." *Biochem J* **307** (Pt 1): 93-8.
- T. E. Gunter und D. R. Pfeiffer (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium." *Am J Physiol* **258**(5 Pt 1): C755-86.
- G. Hajnoczky, G. Csordas, S. Das, C. Garcia-Perez, M. Saotome, S. Sinha Roy und M. Yi (2006). "Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis." *Cell Calcium* **40**(5-6): 553-60.
- A. P. Halestrap (1991). "Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage." *Biochem J* **278** (Pt 3): 715-9.
- A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield und C. P. Connern (1997). "Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase." *J Biol Chem* **272**(6): 3346-54.
- J. Hallauer, M. Schons, A. Smala und K. Berger (2000). "Untersuchungen von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung in Deutschland." *Gesundheitökonomie & Qualitätsmanagement* **5**: 37-39.
- Y. H. Han, S. H. Kim, S. Z. Kim und W. H. Park (2008). "Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) as an O₂(-) generator induces apoptosis via the depletion of intracellular GSH contents in Calu-6 cells." *Lung Cancer.*
- M. J. Hansson, T. Persson, H. Friberg, M. F. Keep, A. Rees, T. Wieloch und E. Elmer (2003). "Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria." *Brain Res* **960**(1-2): 99-111.
- J. A. Hardy und G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* **256**(5054): 184-5.
- M. F. Haroon, A. Fatima, S. Scholer, A. Gieseler, T. F. Horn, E. Kirches, G. Wolf und P. Kreutzmann (2007). "Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): Studies of cybrid cells bearing 11778 mutation." *Neurobiol Dis* **28**(3): 237-50.
- I. E. Hassinen und P. T. Vuokila (1993). "Reaction of dicyclohexylcarbodiimide with mitochondrial proteins." *Biochim Biophys Acta* **1144**(2): 107-24.

- Y. He, S. Appel und W. Le (2001). "Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum." *Brain Res* **909**(1-2): 187-93.
- K. M. Heiskanen, M. B. Bhat, H. W. Wang, J. Ma und A. L. Nieminen (1999). "Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells." *J Biol Chem* **274**(9): 5654-8.
- J. Hermolin und R. H. Fillingame (1989). "H⁺-ATPase activity of Escherichia coli F1F0 is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F0 complex." *J Biol Chem* **264**(7): 3896-903.
- E. L. Holmuhamedov, S. Jovanovic, P. P. Dzeja, A. Jovanovic und A. Terzic (1998). "Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function." *Am J Physiol* **275**(5 Pt 2): H1567-76.
- H. S. Hong, I. Maezawa, N. Yao, B. Xu, R. Diaz-Avalos, S. Rana, D. H. Hua, R. H. Cheng, K. S. Lam und L. W. Jin (2007). "Combining the rapid MTT formazan exocytosis assay and the MC65 protection assay led to the discovery of carbazole analogs as small molecule inhibitors of Abeta oligomer-induced cytotoxicity." *Brain Res* **1130**(1): 223-34.
- V. C. Honnorat-Benabbou, A. A. Lebugle, B. Sallek und D. Duffaut-Lagarrigue (2001). "Stability study of tetracyclines with respect to their use in slow release systems." *J Mater Sci Mater Med* **12**(2): 107-10.
- H. M. Huang, H. C. Ou, H. Xu, H. L. Chen, C. Fowler und G. E. Gibson (2003). "Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death." *J Neurosci Res* **74**(2): 309-17.
- X. Huang, C. S. Atwood, M. A. Hartshorn, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, M. P. Cuajungco, D. N. Gray, J. Lim, R. D. Moir, R. E. Tanzi und A. I. Bush (1999). "The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." *Biochemistry* **38**(24): 7609-16.
- D. R. Hunter, R. A. Haworth und J. H. Southard (1976). "Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria." *J Biol Chem* **251**(16): 5069-77.
- T. Iijima (2006). "Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death." *Neurosci Res* **55**(3): 234-43.
- K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, A. Morimoto, H. Ohigashi, R. Ohashi, K. Takegoshi, M. Nagao, T. Shimizu und T. Shirasawa (2005). "Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Biosci Bioeng* **99**(5): 437-47.
- G. B. Irvine, O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar und D. M. Walsh (2008). "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Mol Med* **14**(7-8): 451-64.
- M. Jaburek, V. Yarov-Yarovoy, P. Paucek und K. D. Garlid (1998). "State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate." *J Biol Chem* **273**(22): 13578-82.
- W. E. Jacobus und A. L. Lehninger (1973). "Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport." *J Biol Chem* **248**(13): 4803-10.

- J. H. Jang und Y. J. Surh (2003). "Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death." *Free Radic Biol Med* **34**(8): 1100-10.
- J. Jordan, F. J. Fernandez-Gomez, M. Ramos, I. Ikuta, N. Aguirre und M. F. Galindo (2007). "Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy." *Curr Drug Deliv* **4**(3): 225-31.
- L. S. Jouaville, P. Pinton, C. Bastianutto, G. A. Rutter und R. Rizzuto (1999). "Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13807-12.
- D. W. Jung, E. Panzeter, K. Baysal und G. P. Brierley (1997). "On the relationship between matrix free Mg²⁺ concentration and total Mg²⁺ in heart mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1320**(3): 310-20.
- B. L. Kagan, R. Azimov und R. Azimova (2004). "Amyloid peptide channels." *J Membr Biol* **202**(1): 1-10.
- J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther und B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-6.
- S. Kar, D. Seto, P. Gaudreau und R. Quirion (1996). "Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices." *J Neurosci* **16**(3): 1034-40.
- J. S. Karadjov, L. Kudzina und V. P. Zinchenko (1986). "TPP⁺ inhibits Na⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from brain mitochondria." *Cell Calcium* **7**(2): 115-9.
- G. Keilhoff, L. Schild und H. Fansa (2008). "Minocycline protects Schwann cells from ischemia-like injury and promotes axonal outgrowth in bioartificial nerve grafts lacking Wallerian degeneration." *Exp Neurol* **212**(1): 189-200.
- J. N. Keller, Q. Guo, F. W. Holtsberg, A. J. Bruce-Keller und M. P. Mattson (1998). "Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production." *J Neurosci* **18**(12): 4439-50.
- K. J. Kelly, T. A. Sutton, N. Weathered, N. Ray, E. J. Caldwell, Z. Plotkin und P. C. Dagher (2004). "Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury." *Am J Physiol Renal Physiol* **287**(4): F760-6.
- P. Kermer, J. Liman, J. H. Weishaupt und M. Bahr (2004). "Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application." *Neurodegener Dis* **1**(1): 9-19.
- P. Kerokoski, H. Soinen und T. Pirttila (2001). "Beta-amyloid (1-42) affects MTT reduction in astrocytes: implications for vesicular trafficking and cell functionality." *Neurochem Int* **38**(2): 127-34.
- H. S. Kim, J. H. Lee, J. P. Lee, E. M. Kim, K. A. Chang, C. H. Park, S. J. Jeong, M. C. Wittendorp, J. H. Seo, S. H. Choi und Y. H. Suh (2002). "Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria." *Neuroreport* **13**(15): 1989-93.
- W. G. Kim, R. P. Mohny, B. Wilson, G. H. Jeohn, B. Liu und J. S. Hong (2000). "Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia." *J Neurosci* **20**(16): 6309-16.

- T. Kobayashi, S. Kuroda, M. Tada, K. Houkin, Y. Iwasaki und H. Abe (2003). "Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury." *Brain Res* **960**(1-2): 62-70.
- N. W. Kowall, A. C. McKee, B. A. Yankner und M. F. Beal (1992). "In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment." *Neurobiol Aging* **13**(5): 537-42.
- A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho und A. E. Vercesi (2001). "Mitochondrial permeability transition and oxidative stress." *FEBS Lett* **495**(1-2): 12-5.
- R. L. Kraus, R. Pasieczny, K. Lariosa-Willingham, M. S. Turner, A. Jiang und J. W. Trautger (2005). "Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity." *J Neurochem* **94**(3): 819-27.
- B. S. Kristal und J. M. Dubinsky (1997). "Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling-dependent and -independent pathways." *J Neurochem* **69**(2): 524-38.
- B. S. Kristal, I. G. Stavrovskaya, B. F. Krasnikov und M. Lukyanova (2002). "Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and neurodegeneration." *Soc. Neurosci. Abstr.* **18.9**.
- W. S. Kunz und F. N. Gellerich (1993). "Quantification of the content of fluorescent flavoproteins in mitochondria from liver, kidney cortex, skeletal muscle, and brain." *Biochem Med Metab Biol* **50**(1): 103-10.
- K. Kupsch, S. Parvez, D. Siemen und G. Wolf (2007). "Modulation of the permeability transition pore by inhibition of the mitochondrial K(ATP) channel in liver vs. brain mitochondria." *J Membr Biol* **215**(2-3): 69-74.
- Y. Kushnareva, A. N. Murphy und A. Andreyev (2002). "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state." *Biochem J* **368**(Pt 2): 545-53.
- A. Labajova, A. Vojtiskova, P. Krivakova, J. Kofranek, Z. Drahota und J. Houstek (2006). "Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode." *Anal Biochem* **353**(1): 37-42.
- Y. Lampl, M. Boaz, R. Gilad, M. Lorberboym, R. Dabby, A. Rapoport, M. Anca-Hershkowitz und M. Sadeh (2007). "Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study." *Neurology* **69**(14): 1404-10.
- R. G. Lapidus und P. M. Sokolove (1994). "The mitochondrial permeability transition. Interactions of spermine, ADP, and inorganic phosphate." *J Biol Chem* **269**(29): 18931-6.
- A. Lawen (2007). "Another piece of the puzzle of apoptotic cytochrome c release." *Mol Microbiol* **66**(3): 553-6.
- K. Le Quoc und D. Le Quoc (1988). "Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site." *Arch Biochem Biophys* **265**(2): 249-57.
- E. Lenartowicz, P. Bernardi und G. F. Azzone (1991). "Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* **23**(4): 679-88.

- A. W. Leung und A. P. Halestrap (2008). "Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore." *Biochim Biophys Acta*.
- E. Levy-Lahad, W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang und et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science* **269**(5226): 973-7.
- G. Li, L. Y. Zou, C. M. Cao und E. S. Yang (2005). "Coenzyme Q10 protects SHSY5Y neuronal cells from beta amyloid toxicity and oxygen-glucose deprivation by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore." *Biofactors* **25**(1-4): 97-107.
- S. Lin, X. Wei, Y. Xu, C. Yan, R. Dodel, Y. Zhang, J. Liu, J. E. Klaunig, M. Farlow und Y. Du (2003). "Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical production in rat cerebellar granule neurons." *Life Sci* **72**(14): 1635-41.
- S. Lin, Y. Zhang, R. Dodel, M. R. Farlow, S. M. Paul und Y. Du (2001). "Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons." *Neurosci Lett* **315**(1-2): 61-4.
- P. Liston, W. G. Fong und R. G. Korneluk (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." *Oncogene* **22**(53): 8568-80.
- Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura und D. Schubert (1997). "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *J Neurochem* **69**(2): 581-93.
- Y. Liu, D. A. Peterson und D. Schubert (1998). "Amyloid beta peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13266-71.
- Y. Liu und D. Schubert (1997). "Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis." *J Neurochem* **69**(6): 2285-93.
- Y. Liu und D. Schubert (1998). "Steroid hormones block amyloid fibril-induced 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) formazan exocytosis: relationship to neurotoxicity." *J Neurochem* **71**(6): 2322-9.
- A. Lleo, O. Berezovska, J. H. Growdon und B. T. Hyman (2004). "Clinical, pathological, and biochemical spectrum of Alzheimer disease associated with PS-1 mutations." *Am J Geriatr Psychiatry* **12**(2): 146-56.
- J. D. Ly, D. R. Grubb und A. Lawen (2003). "The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update." *Apoptosis* **8**(2): 115-28.
- H. Macdonald, R. G. Kelly, E. S. Allen, J. F. Noble und L. A. Kanegis (1973). "Pharmacokinetic studies on minocycline in man." *Clin Pharmacol Ther* **14**(5): 852-61.
- M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson, B. S. Park, J. Quinn und P. H. Reddy (2006). "Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression." *Hum Mol Genet*.
- M. Manczak, B. S. Park, Y. Jung und P. H. Reddy (2004). "Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage." *Neuromolecular Med* **5**(2): 147-62.

- L. Mangiarini, K. Sathasivam, M. Seller, B. Cozens, A. Harper, C. Hetherington, M. Lawton, Y. Trottier, H. Lehrach, S. W. Davies und G. P. Bates (1996). "Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice." *Cell* **87**(3): 493-506.
- R. Mansson, M. J. Hansson, S. Morota, H. Uchino, C. T. Ekdahl und E. Elmer (2007). "Re-evaluation of mitochondrial permeability transition as a primary neuroprotective target of minocycline." *Neurobiol Dis* **25**(1): 198-205.
- J. Marin-Garcia, R. Ananthakrishnan und M. J. Goldenthal (1995). "Heart mitochondria response to alcohol is different than brain and liver." *Alcohol Clin Exp Res* **19**(6): 1463-6.
- J. B. Martin (1999). "Molecular basis of the neurodegenerative disorders." *N Engl J Med* **340**(25): 1970-80.
- W. H. Martin, D. J. DiResta und K. D. Garlid (1986). "Kinetics of inhibition and binding of dicyclohexylcarbodiimide to the 82,000-dalton mitochondrial K⁺/H⁺ antiporter." *J Biol Chem* **261**(26): 12300-5.
- M. P. Mattson, B. Cheng, A. R. Culwell, F. S. Esch, I. Lieberburg und R. E. Rydel (1993). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein." *Neuron* **10**(2): 243-54.
- M. P. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg und R. E. Rydel (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." *J Neurosci* **12**(2): 376-89.
- B. Mayer und R. Oberbauer (2003). "Mitochondrial regulation of apoptosis." *News Physiol Sci* **18**: 89-94.
- C. J. Maynard, A. I. Bush, C. L. Masters, R. Cappai und Q. X. Li (2005). "Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Int J Exp Pathol* **86**(3): 147-59.
- J. G. McCormack und R. M. Denton (1993). "The role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of oxidative phosphorylation in mammalian tissues." *Biochem Soc Trans* **21** (Pt 3)(3): 793-9.
- L. Meda, M. A. Cassatella, G. I. Szendrei, L. Otvos, Jr., P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari und F. Rossi (1995). "Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma." *Nature* **374**(6523): 647-50.
- A. Milane, C. Fernandez, G. Bensimon, V. Meininger und R. Farinotti (2007). "Simple Liquid Chromatographic Determination of Minocycline in Brain and Plasma." *Chromatographia* **65**(5): 277-281.
- A. Milane, C. Fernandez, S. Vautier, G. Bensimon, V. Meininger und R. Farinotti (2007). "Minocycline and riluzole brain disposition: interactions with p-glycoprotein at the blood-brain barrier." *J Neurochem* **103**(1): 164-73.
- V. Mildaziene, R. Baniene, A. Marcinkeviciute, Z. Nauciene, A. Kalvenas und A. Zimkus (1997). "Tetraphenylphosphonium inhibits oxidation of physiological substrates in heart mitochondria." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 67-70.
- C. L. Moore (1971). "Specific inhibition of mitochondrial Ca⁺⁺ transport by ruthenium red." *Biochem Biophys Res Commun* **42**(2): 298-305.
- P. I. Moreira, M. S. Santos, A. Moreno und C. Oliveira (2001). "Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria." *Biosci Rep* **21**(6): 789-800.

- A. Mouri, Y. Noda, H. Hara, H. Mizoguchi, T. Tabira und T. Nabeshima (2007). "Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model." *Faseb J* **21**(9): 2135-48.
- G. Multhaup, A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, T. Ruppert, C. L. Masters und K. Beyreuther (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I)." *Science* **271**(5254): 1406-9.
- W. J. Nicklas, J. B. Clark und J. R. Williamson (1971). "Metabolism of rat brain mitochondria. Studies on the potassium ion-stimulated oxidation of pyruvate." *Biochem J* **123**(1): 83-95.
- A. Nicolli, E. Basso, V. Petronilli, R. M. Wenger und P. Bernardi (1996). "Interactions of Cyclophilin with the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, a Cyclosporin A-sensitive Channel." *J. Biol. Chem.* **271**(4): 2185-2192.
- A. Nishikimi, Y. Kira, E. Kasahara, E. F. Sato, T. Kanno, K. Utsumi und M. Inoue (2001). "Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release." *Biochem J* **356**(Pt 2): 621-6.
- S. A. Novgorodov, T. I. Gudz, G. P. Brierley und D. R. Pfeiffer (1994). "Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP." *Arch Biochem Biophys* **311**(2): 219-28.
- V. O. Ona, M. Li, J. P. Vonsattel, L. J. Andrews, S. Q. Khan, W. M. Chung, A. S. Frey, A. S. Menon, X. J. Li, P. E. Stieg, J. Yuan, J. B. Penney, A. B. Young, J. H. Cha und R. M. Friedlander (1999). "Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease." *Nature* **399**(6733): 263-7.
- J. M. Orgogozo, S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank und C. Hock (2003). "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." *Neurology* **61**(1): 46-54.
- B. O'Rourke (2007). "Mitochondrial ion channels." *Annu Rev Physiol* **69**: 19-49.
- Y. L. Ow, D. R. Green, Z. Hao und T. W. Mak (2008). "Cytochrome c: functions beyond respiration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 532-42.
- A. V. Panov, S. Dikalov, N. Shalbuyeva, R. Hemendinger, J. T. Greenamyre und J. Rosenfeld (2006). "Species and Tissue Specific Relationships between Mitochondrial Permeability Transition and Generation of Ros in Brain and Liver Mitochondria of Rats and Mice." *Am J Physiol Cell Physiol*.
- E. Paradis, H. Douillard, M. Koutroumanis, C. Goodyer und A. LeBlanc (1996). "Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons." *J Neurosci* **16**(23): 7533-9.
- J. K. Parks, T. S. Smith, P. A. Trimmer, J. P. Bennett, Jr. und W. D. Parker, Jr. (2001). "Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro." *J Neurochem* **76**(4): 1050-6.
- W. C. Parks, C. L. Wilson und Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(8): 617-29.

- W. Pendergrass, N. Wolf und M. Poot (2004). "Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues." *Cytometry A* **61**(2): 162-9.
- C. J. Pike, A. J. Walencewicz-Wasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe und C. W. Cotman (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." *J Neurochem* **64**(1): 253-65.
- R. K. Porter, J. M. Scott und M. D. Brand (1992). "Choline transport into rat liver mitochondria." *Biochem Soc Trans* **20**(3): 248S.
- M. F. Powers und A. D. Beavis (1991). "Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel." *J Biol Chem* **266**(26): 17250-6.
- R. Radi, A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano und L. Castro (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." *Free Radic Biol Med* **33**(11): 1451-64.
- R. Radi, M. Rodriguez, L. Castro und R. Telleri (1994). "Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite." *Arch Biochem Biophys* **308**(1): 89-95.
- A. Rasola und P. Bernardi (2007). "The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis." *Apoptosis* **12**(5): 815-33.
- P. H. Reddy (2006). "Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **96**(1): 1-13.
- P. W. Reed und H. A. Lardy (1972). "A23187: a divalent cation ionophore." *J Biol Chem* **247**(21): 6970-7.
- J. B. Rich, D. X. Rasmusson, M. F. Folstein, K. A. Carson, C. Kawas und J. Brandt (1995). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease." *Neurology* **45**(1): 51-5.
- C. Richter, J. W. Park und B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(17): 6465-7.
- R. B. Rock und P. K. Peterson (2006). "Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain." *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(2): 117-26.
- M. Rojo, R. Hovius, R. A. Demel, K. Nicolay und T. Wallimann (1991). "Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes." *J Biol Chem* **266**(30): 20290-5.
- A. M. Romani und A. Scarpa (2000). "Regulation of cellular magnesium." *Front Biosci* **5**: D720-34.
- R. Ronicke, A. Klemm, J. Meinhardt, U. H. Schroder, M. Fandrich und K. G. Reymann (2008). "Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture?" *PLoS ONE* **3**(9): e3236.
- H. Rubbo, R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk und B. A. Freeman (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." *J Biol Chem* **269**(42): 26066-75.
- J. K. Ryu, S. Franciosi, P. Sattayaprasert, S. U. Kim und J. G. McLarnon (2004). "Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus." *Glia* **48**(1): 85-90.

- J. K. Ryu und J. G. McLarnon (2006). "Minocycline or iNOS inhibition block 3-nitrotyrosine increases and blood-brain barrier leakiness in amyloid beta-peptide-injected rat hippocampus." *Exp Neurol* **198**(2): 552-7.
- S. Sanz-Blasco, R. A. Valero, I. Rodriguez-Crespo, C. Villalobos und L. Nunez (2008). "Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs." *PLoS ONE* **3**(7): e2718.
- N. E. Saris und E. Carafoli (2005). "A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria." *Biochemistry (Mosc)* **70**(2): 187-94.
- R. C. Scaduto, Jr. und L. W. Grotyohann (1999). "Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives." *Biophys J* **76**(1 Pt 1): 469-77.
- T. M. Scarabelli, A. Stephanou, E. Pasini, G. Gitti, P. Townsend, K. Lawrence, C. Chen-Scarabelli, L. Saravolatz, D. Latchman, R. Knight und J. Gardin (2004). "Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO." *J Am Coll Cardiol* **43**(5): 865-74.
- D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevent, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games und P. Seubert (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." *Nature* **400**(6740): 173-7.
- P. Schönfeld, S. Gerke, R. Bohnensack und L. Wojtczak (2003). "Stimulation of potassium cycling in mitochondria by long-chain fatty acids." *Biochim Biophys Acta* **1604**(2): 125-33.
- P. Schönfeld, S. Kahlert und G. Reiser (2004). "In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition." *Biochem J* **383**(Pt 1): 121-8.
- T. J. Seabrook, L. Jiang, M. Maier und C. A. Lemere (2006). "Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice." *Glia* **53**(7): 776-782.
- M. J. Selwyn, A. P. Dawson, M. Stockdale und N. Gains (1970). "Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds." *Eur J Biochem* **14**(1): 120-6.
- L. A. Selznick, T. S. Zheng, R. A. Flavell, P. Rakic und K. A. Roth (2000). "Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent." *J Neuropathol Exp Neurol* **59**(4): 271-9.
- M. S. Shearman, S. R. Hawtin und V. J. Taylor (1995). "The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides." *J Neurochem* **65**(1): 218-27.
- R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman und et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-60.

- O. Singer, R. A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N. G. Coufal, F. H. Gage, I. M. Verma und E. Masliah (2005). "Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model." *Nat Neurosci* **8**(10): 1343-9.
- D. Sirk, Z. Zhu, J. S. Wadia, N. Shulyakova, N. Phan, J. Fong und L. R. Mills (2007). "Chronic exposure to sub-lethal beta-amyloid (Abeta) inhibits the import of nuclear-encoded proteins to mitochondria in differentiated PC12 cells." *J Neurochem* **103**(5): 1989-2003.
- S. T. Smiley, M. Reers, C. Mottola-Hartshorn, M. Lin, A. Chen, T. W. Smith, G. D. Steele, Jr. und L. B. Chen (1991). "Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3671-5.
- D. L. Smith, B. Woodman, A. Mahal, K. Sathasivam, S. Ghazi-Noori, P. A. Lowden, G. P. Bates und E. Hockly (2003). "Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease." *Ann Neurol* **54**(2): 186-96.
- D. L. Sparks, S. W. Scheff, J. C. Hunsaker, 3rd, H. Liu, T. Landers und D. R. Gross (1994). "Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol." *Exp Neurol* **126**(1): 88-94.
- O. Speer, N. Back, T. Buerklen, D. Brdiczka, A. Koretsky, T. Wallimann und O. Eriksson (2005). "Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane." *Biochem J* **385**(Pt 2): 445-50.
- E. R. Stadtman und R. L. Levine (2000). "Protein oxidation." *Ann N Y Acad Sci* **899**: 191-208.
- R. H. Swerdlow (2007). "Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging?" *Neurobiol Aging* **28**(10): 1465-80.
- R. C. Taylor, S. P. Cullen und S. J. Martin (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 231-41.
- T. P. Theruvath, Z. Zhong, P. Padiaditakis, V. K. Ramshesh, R. T. Currin, A. Tikunov, E. Holmuhamedov und J. J. Lemasters (2008). "Minocycline and N-methyl-4-isoleucine cyclosporin (NIM811) mitigate storage/reperfusion injury after rat liver transplantation through suppression of the mitochondrial permeability transition." *Hepatology* **47**(1): 236-46.
- T. Tikka, B. L. Fiebich, G. Goldsteins, R. Keinanen und J. Koistinaho (2001). "Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia." *J Neurosci* **21**(8): 2580-8.
- M. Tsuji, M. A. Wilson, M. S. Lange und M. V. Johnston (2004). "Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model." *Exp Neurol* **189**(1): 58-65.
- F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis und P. Eikelenboom (1996). "Amyloid beta protein primes cultured rat microglial cells for an enhanced phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity." *J Neurochem* **66**(6): 2468-76.
- P. T. Vuokila und I. E. Hassinen (1988). "NN'-dicyclohexylcarbodi-imide-sensitivity of bovine heart mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase. Inhibition of activity and binding to subunits." *Biochem J* **249**(2): 339-44.
- P. C. Waldmeier, J. J. Feldtrauer, T. Qian und J. J. Lemasters (2002). "Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811." *Mol Pharmacol* **62**(1): 22-9.

- J. Wang, Q. Wei, C. Y. Wang, W. D. Hill, D. C. Hess und Z. Dong (2004). "Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria." *J Biol Chem* **279**(19): 19948-54.
- X. Wang, S. Zhu, M. Drozda, W. Zhang, I. G. Stavrovskaya, E. Cattaneo, R. J. Ferrante, B. S. Kristal und R. M. Friedlander (2003). "Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10483-7.
- T. Wieloch, G. Mattiasson, M. Hansson und E. Elmer (2007). Mitochondrial Permeability Transition in the CNS-Composition, Regulation, and Pathophysiological Relevance. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*: 667-702.
- K. Wisniewski, J. Howe, D. G. Williams und H. M. Wisniewski (1978). "Precocious aging and dementia in patients with Down's syndrome." *Biol Psychiatry* **13**(5): 619-27.
- F. Yamakura, H. Taka, T. Fujimura und K. Murayama (1998). "Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine." *J Biol Chem* **273**(23): 14085-9.
- L. Yang, S. Sugama, J. W. Chirichigno, J. Gregorio, S. Lorenzl, D. H. Shin, S. E. Browne, Y. Shimizu, T. H. Joh, M. F. Beal und D. S. Albers (2003). "Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons." *J Neurosci Res* **74**(2): 278-85.
- J. S. Yao, Y. Chen, W. Zhai, K. Xu, W. L. Young und G. Y. Yang (2004). "Minocycline exerts multiple inhibitory effects on vascular endothelial growth factor-induced smooth muscle cell migration: the role of ERK1/2, PI3K, and matrix metalloproteinases." *Circ Res* **95**(4): 364-71.
- E. Yap, W. L. Tan, I. Ng und Y. K. Ng (2008). "Combinatorial-approached neuroprotection using pan-caspase inhibitor and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor following experimental stroke in rats; is there additional benefit?" *Brain Res* **1195**: 130-8.
- R. J. Youle und A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.
- J. Yrjanheikki, R. Keinanen, M. Pellikka, T. Hokfelt und J. Koistinaho (1998). "Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15769-74.
- J. Yrjanheikki, T. Tikka, R. Keinanen, G. Goldsteins, P. H. Chan und J. Koistinaho (1999). "A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13496-500.
- L. Zhang, N. C. Ging, T. Komoda, T. Hanada, T. Suzuki und K. Watanabe (2005). "Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation." *FEBS Lett* **579**(28): 6423-7.
- Y. Zhang, R. McLaughlin, C. Goodyer und A. LeBlanc (2002). "Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons." *J Cell Biol* **156**(3): 519-29.
- H. Zheng, M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, G. R. Dawson, S. Boyce, M. W. Conner, K. A. Stevens, H. H. Slunt, S. S. Sisoda, H. Y. Chen und L. H. Van der Ploeg (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* **81**(4): 525-31.

- S. Zhu, I. G. Stavrovskaya, M. Drozda, B. Y. Kim, V. Ona, M. Li, S. Sarang, A. S. Liu, D. M. Hartley, C. Wu du, S. Gullans, R. J. Ferrante, S. Przedborski, B. S. Kristal und R. M. Friedlander (2002). "Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice." *Nature* **417**(6884): 74-8.
- M. Zoratti, I. Szabo und U. De Marchi (2005). "Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?" *Biochim Biophys Acta* **1706**(1-2): 40-52.

DANKSAGUNG

Wer bereits einmal eine Dissertation verfasst hat, weiß, dass ein solches Unterfangen ohne die direkte und indirekte Unterstützung anderer kaum möglich ist. Es ist mir daher eine große Freude, an dieser Stelle all jenen Menschen von Herzen zu danken, die durch ihre Ratschläge, Impulse und Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und die letzten Jahre zu einer wertvollen Erinnerung gemacht haben:

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Gerald Wolf für die Bereitstellung des Themas und seine unermüdliche Unterstützung auch über die Emeritierung hinaus danken. Sein kritisches Auge hat so manchem Rohentwurf einer Veröffentlichung – und so auch dieser – erst zur endgültigen Form verholfen. Ich bedanke mich für die zahlreichen, richtungsweisenden Ratschläge und Hinweise, unsere Diskussionen und die nötige Prise Geduld und Druck, die mir halfen, diesen manchmal steinigen Weg nun zu einem vorläufigen Ende zu gehen.

Ein ebenso großer Dank gilt Prof. Dr. Detlef Siemen, der mich bereits während der Diplomarbeit und weiter während der Promotionszeit in vielerlei Hinsicht unterstützte. Ich bedanke mich herzlich für die Möglichkeit, Experimente in seinem Labor durchzuführen sowie für die fachliche und häufig auch moralische Unterstützung. Auch Prof. Dr. Schönfeld gebührt mein Dank für seine tatkräftige Unterstützung und seine Ideen, die schließlich Licht ins Dunkel gebracht haben. Sein unerschöpfliches Wissen und seine umfangreiche Erfahrung waren eine starke Bereicherung dieser Arbeit. Vielen Dank auch für die kritische Durchsicht von Teilen dieser Dissertationsschrift.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken: Dr. Peter Kreuzmann danke ich für die umfassende fachliche Betreuung und die konstruktive Kritik beim Erstellen der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt Dr. Fahad Haroon für seine enorme Hilfsbereitschaft bei technischen und wissenschaftlichen Schwierigkeiten. Danken möchte ich auch Anne Gieseler für die Unterstützung bei fachlichen wie persönlichen Problemen, die ermunternden Gespräche und die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Einen ganz besonders großen Dank möchte ich Irmgard Leschka für die tatkräftige experimentelle Unterstützung aussprechen. Ohne die Hilfe bei der Präparation von Mitochondrien und Zellkulturen wäre es kaum möglich gewesen, diese Arbeit in der gegebenen Zeit fertigzustellen. Vielen Dank dafür! Ein ebenso großer Dank gebührt Gudrun Schmidt für die immer zuverlässige Versorgung mit Versuchstieren. Regina Dobrowolny danke ich für die engagierte Hilfe bei der Zellkultur sowie der Gelelektrophorese. Bedanken möchte ich mich auch bei Leona Bück und Karla Klingenberg für die Unterstützung bei der Zellkultur, der Versorgung der Versuchstiere und der Elektronenmikroskopie. Dr. Karin Richter danke

ich recht herzlich für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. Bei Dr. Kristina Langnäse möchte ich mich für die stetige Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Optimierung der Immunoblots, bedanken.

Zum Gelingen dieser Arbeit hat maßgeblich auch die Kooperation mit den Kollegen der Klinischen Neurobiochemie sowie des Institutes für Biochemie beigetragen. Frau Kaiser und Frau Witzke danke ich für die zahlreichen kleinen Entlastungen bei der Laborarbeit. Dr. Silvia Hertel möchte ich für den experimentellen Beitrag zur Klärung der mitochondrialen Effekte des Minozyklin danken. Ein großer Dank gebührt auch Frau Goldammer, die mich gerade in der Endphase der Arbeit großzügig mit isolierten Mitochondrien versorgte.

Dr. Gerburg Keilhoff danke ich dafür, dass sie stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand, insbesondere im Zusammenhang mit Kongressreisen. Bei Dr. Mario Engelmann möchte ich mich für die Ratschläge zur Statistik bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Julia Czerney und Beate Zörner aussprechen, auf deren Hilfe bei organisatorischen Fragen, Computer-Pannen oder der Beschaffung selbst obskurster Publikationen ich immer zählen konnte. Einen herzlichen Dank auch für die hervorragende Gestaltung zahlreicher Unternehmungen, die mir immer in Erinnerung bleiben werden.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Neurobiologie danke ich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, ihre offenen Ohren und helfenden Hände sowie die gute Arbeitsatmosphäre, die einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte. Ich hatte im Rahmen meiner Dissertationsarbeit nicht nur die Gelegenheit, die wissenschaftliche Arbeitsweise zu erlernen, sondern auch Freunde fürs Leben zu finden. Insbesondere Anne Gieseler, Julia Noack, Dr. Fahad Haroon und Dr. Ambrin Fatima möchte ich herzlich dafür danken, dass sie die Freuden und den Frust des Laboralltags mit mir teilten und mir immer mit Rat, Tat und Trost zur Seite standen.

Der größte Dank gebührt den Menschen, denen diese Arbeit gewidmet ist: Meiner Familie, ohne deren unermüdliche Unterstützung, Geduld, Fürsorge und Liebe ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können. Ich weiß mein Glück zu schätzen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|---------------------------------------|
| Name | Kathleen Kupsch |
| Geburtsdatum | 18.05.1981 |
| Geburtsort | Lauchhammer |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Adresse | Hamberger Straße 80, 51381 Leverkusen |
| E-Mail-Adresse | kkupsch@web.de |

Schulische und akademische Ausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 09/1993 – 07/2000 | Gymnasium Großräschen (Abschluss: allgemeine Hochschulreife) |
| 10/2000 – 09/2002 | Grundstudium Biophysik an der Humboldt-Universität Berlin (Abschluss: Vordiplom) |
| 10/2002 – 02/2006 | Hauptstudium Neurowissenschaften an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Abschluss: Diplom-Neurowissenschaftlerin) |
| 03/2006 – 11/2008 | Promotionsstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Promotionsthema: Mitochondriale Effekte des Minozyklin und Neuroprotektion angefertigt als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Neurobiologie (seit 01.10.2008 Institut für Biochemie und Zellbiologie) |

Berufliche Laufbahn

| | |
|--------------|---|
| seit 12/2008 | Clinical Research Associate bei ClinAssess GmbH, Leverkusen |
|--------------|---|

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

Mitochondriale Effekte von Minozyklin und Neuroprotektion

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 06.11.2008

Kathleen Kupsch