

**Rotenon-induzierte Komplex I-Inhibierung in primär
kultivierten neokortikalen Neuronen:
oxidativer Stress, Permeabilitätstransitionsdynamik und
die protektive Rolle von Minozyklin**

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-Biologin Anne Gieseler
geboren am 23. September 1979 in Burg

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

eingereicht am 18.12.2009
verteidigt am 13.04.2010

*Meinem Opa, Hermann Helm,
in liebevoller Erinnerung gewidmet*

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
4	TABELLENVERZEICHNIS	5
5	EINLEITUNG	1
5.1	Die Parkinson-Erkrankung	1
5.1.1	Ätiologie der Parkinson-Erkrankung	3
5.1.2	Pathogenesewege der Parkinson-Erkrankung	4
5.2	Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung	11
5.2.1	Pharmakologisch-induzierte Tiermodelle	11
5.2.2	Rotenonmodell der Parkinson-Erkrankung	12
5.3	Minozyklin	14
5.4	Ziel der Arbeit	16
6	MATERIAL UND METHODEN	17
6.1	Materialien	17
6.2	Methoden	18
6.2.1	Tiere und Gewebe	18
6.2.2	Zellkultur	18
6.2.3	Messung intrazellulärer Kalzium-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$	20
6.2.4	Immunzytochemische Analyse	25
6.2.5	Analyse der Zellvitalität/MTT-Assay	26
6.2.6	Schwellungsexperimente an isolierten Mitochondrien	26
6.2.7	Bestimmung antioxidativer Eigenschaften	29
6.2.8	Auswertung und statistische Analyse der Daten	30

7	ERGEBNISSE	32
7.1	Funktionelle Charakterisierung des Zellkulturmodells	32
7.1.1	Morphologische Charakterisierung des Zellkulturmodells	36
7.1.2	Schädigung der Neuronenkulturen mit Rotenon	38
7.1.3	Rolle der mtPTP bei einer Rotenon-verursachten Schädigung	42
7.1.4	Effekt von Minozyklin auf die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation	42
7.2	Untersuchung der mitochondrialen Schwellung	46
7.2.1	Einfluss von Rotenon auf isolierte Hirnmitochondrien	46
7.2.2	Effekt von Rotenon auf isolierte Lebermitochondrien und dessen Modulation durch CsA und Minozyklin	47
7.3	Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Minozyklin	50
7.3.1	Oxidation von DFF in primär kultivierten kortikalen Neuronen	50
7.3.2	Radikalfängereigenschaften von Minozyklin im DPPH-Experiment	52
8	DISKUSSION	53
8.1	Das Schädigungsmodell	53
8.2	Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation	56
8.3	Minozyklin verhindert die Rotenon-vermittelte Kalzium-Deregulation in kortikalen Neuronen	57
8.4	Minozyklin besitzt antioxidative Eigenschaften	59
9	LITERATUR	61
10	DANKSAGUNG	73

1 ZUSAMMENFASSUNG

Neurodegenerative Erkrankungen stellen in Gesellschaften mit steigender Lebenserwartung ein großes medizinisches Problem dar. Die Parkinson-Krankheit ist eine der häufigsten neurodegenerativen Störungen, verursacht durch den Untergang Dopamin-produzierender Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* im Mittelhirn. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Neben genetischen Faktoren kommen mitochondrial bedingte Stoffwechselstörungen in Frage, die mit der Bildung von freien Radikalen sowie mit einer Erhöhung intrazellulärer Kalziumspiegel einhergehen.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, nach Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Modells zur Aufklärung der für die Parkinson-Krankheit beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen beizutragen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Tetrazyklin-Derivat Minozyklin, das in der Klinik als potenzielles Neuroprotektivum eingesetzt wird. Anhand von primär kultivierten kortikalen Neuronen wurde durch Applikation von Rotenon eine Inhibierung des mitochondrialen Komplex I vorgenommen, um nachfolgend die Auswirkung dieser Blockade auf die Aktivität bzw. Öffnung der für neurodegenerative Prozesse bedeutsamen mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mtPTP), zu untersuchen. Die Bestimmung mtPTP-relevanter Parameter, wie zytosolische Kalziumdynamik, mitochondriale Schwellung sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS), sollte mittels bildgebender Verfahren und biochemischer Analysen Aufschluss über die Veränderungen der mitochondrialen Funktionalität geben. Damit war die Voraussetzung zu schaffen, um zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Minozyklin beizutragen, dessen Eignung als Neuroprotektivum in jüngerer Zeit zunehmend kontrovers diskutiert wird.

Unsere Kalzium-*Imaging*-Experimente konnten zeigen, dass Rotenon in kortikalen Neuronen zu einer veränderten zytosolischen Kalziumdynamik führt. In Anwesenheit des „klassischen“ mtPTP-Blockers Cyclosporin A (CsA) wird die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation verringert, was eine Beteiligung der mtPTP erkennen lässt. Diese Vermutung wurde durch die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützt, in denen Rotenon in isolierten Mitochondrien die Kalzium-induzierte mtPTP-Öffnung fördert. Im Zellkulturmodell zeigte sich, dass Minozyklin die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation nahezu komplett verhindert und sich damit noch wirksamer als der reine mtPTP-Inhibitor CsA erwies. Neben einer Blockade der mtPTP sind die Radikalfängereigenschaften des Mino-

zyklins als protektiv erkannt worden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die durch H_2O_2 stimulierte ROS-Produktion kortikaler Neuronen durch Minozyklin drastisch verringert wird. Zugleich konnte für das Pharmakon ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

Aus den vorgelegten Befunden resultiert die Empfehlung, einer weiteren klinischen Anwendung des Minozyklins als Neuroprotektivum, in Abhängigkeit von der Dosis und Applikationsart, eine präzise Nutzen-Schaden-Kalkulation zugrunde zulegen.

Aus der hier vorgelegten Arbeit gingen folgende Publikationen hervor:

Gieseler A, Schultze AT, Kupsch K, Haroon MF, Wolf G, Siemen D, Kreutzmann P: Inhibitory modulation of the mitochondrial permeability transition by minocycline. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 1;77(5):888-96.

Haroon MF, Fatima A, Schöler S, **Gieseler A**, Horn TF, Kirches E, Wolf G, Kreutzmann P: Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): studies of cybrid cells bearing 11,778 mutation. *Neurobiol Dis.* 2007 Dec;28(3):237-50.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AIF1	Apoptose-induzierender Faktor 1 (<i>Apoptosis Inducing Factor 1</i>)
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
BSA	<i>Bovines</i> Serum Albumin
Ca ²⁺	freie Kalziumionen
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (<i>Charged-coupled Device</i>)
CsA	Cyclosporin A
CycD	Cyclophilin D
Cyt c	Cytochrom C
DA	Dopamin
DFP	Difluorofluorescin
DIV	Tage <i>in vitro</i> (<i>Days In Vitro</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Pikrylhydrazyl
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fluoreszenzintensität
Fe-S	Eisen-Schwefel
FMN	Flavinmononukleotid
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
H ₂ DFFDA	5-(and-6)-Carboxy-2',7'-Difluorodihydrofluorescein-Diacetat
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom
i.v.	intravenös
L-Dopa	L-Dopamin
LSM	Laserraster-Mikroskop (<i>Laser Scanning Microscope</i>)
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPP+	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mtDNA	mitochondriale DNA
mtPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MZ	Minozyklin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOS	Stickoxid-Synthase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PD	Parkinson-Erkrankung (<i>Parkinson's Disease</i>)
PDL	Poly-D-Lysin
PT	Permeabilitätstransition
PTP	Permeabilitätstransitions-pore
Q	Ubichinon

QH2	Ubichinol
RNS	Reaktive Stickstoff-Spezies (<i>Reaktive Nitrogen Species</i>)
ROI	Region des Interesses (<i>Region of Interest</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>Reaktive Oxygen Species</i>)
ROT	Rotenon
RT	Raumtemperatur
Smac	Zweiter Mitochondrien-abgeleiteter Aktivator der Caspase (<i>Second Mitochondria Derived Activator of Caspase</i>)
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
VDAC	Spannungsabhängiger-Anionen-Kanal (<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>)

3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der für die Parkinson-Erkrankung relevanten Gehirnregionen.....	2
Abb. 2: Schema der mitochondrialen Atmungskette mit den 5 Enzymkomplexen, eingebettet in die innere Mitochondrienmembran.....	5
Abb. 3: Dargestellt ist das Funktionsprinzip der mtPTP nach Halestrap.....	9
Abb. 4: Chemische Formel von Rotenon mit hoch lipophiler Struktur.....	12
Abb. 5: Struktur des Tetrazyklins und des Tetrazyklin-Derivats Minozyklin.....	15
Abb. 6: (A) Strukturformel von Fluo-4 AM. (B): Darstellung des Emissionsspektrums von Fluo-4.....	21
Abb. 7: Schematische Darstellung der Attofluor-Stahkkammer.....	22
Abb. 8: Strukturformel (A) und Emissionsspektrum (B) von Fura-PE3 AM.).....	24
Abb. 9: NMDA-und Glutamat-induzierte Kalziumtransienten in 9 (A) und 13 Tage (B) alten kortikalen Neuronen.....	36
Abb. 10: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und nachträgliche immunzytochemische Analyse von 13 Tage alten Kulturen aus Kortexgewebe der Ratte (E16).	37
Abb. 11: MTT-Formazanbildung in Kulturen Rotenon-belasteter Zellen.	38
Abb. 12: Graphisch dargestellte NMDA-induzierte Fura-PE3-Fluoreszenzveränderungen unterschiedlicher Behandlungsgruppen (Kontrolle, 10 nM ROT) in 9 Tage alten Kortexkulturen.	40
Abb. 13: Graphisch dargestellte NMDA-induzierte Fura-PE3-Fluoreszenzveränderungen der Kontroll- und Rotenon-Behandlungsgruppe in 13 Tage alten Kortexkulturen.....	41
Abb. 14: NMDA-induzierte Kalziumtransienten in unterschiedlich behandelten 13 Tage alten Kortexkulturen. (A).....	44
Abb. 15: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Kalziummessungen 13 Tage alter kortikaler Neurone unterschiedlicher Behandlungsgruppen.	46
Abb. 16: Die dargestellten Kurvenverläufe in (A) demonstrieren die Ca^{2+} -induzierte Absorptionsabnahme einer Suspension von Hirnmitochondrien.....	47
Abb. 17: Ca^{2+} -induzierte mitochondriale Schwellung von Lebermitochondrien.	49
Abb. 18: DFF-Fluoreszenzintensitätsmessungen in primär kultivierten kortikalen Neuronen (13. DIV).	51
Abb. 19: Die Radikalfängereigenschaften von Minozyklin zeigte sich in einer deutlichen Absorptionsabnahme von DPPH, ähnlich der durch Ascorbinsäure verursacht.	52

4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung von Genen und Genorten, die mit genetisch verursachten Formen der Parkinson-Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden.	3
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Apparaturen	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	17
Tabelle 4: Zusammensetzung des Kulturmediums	20
Tabelle 5: Zusammensetzung des HEPES-Puffers	23
Tabelle 6: Zusammensetzung des Phosphatpuffers	25
Tabelle 7: Für die immunzytochemische Analyse verwendete Erst- und Zweitantikörper und deren Verdünnungen.	26
Tabelle 8: Zusammensetzung der Biuret-Reagenz	27
Tabelle 9: Zusammensetzung der Isolationsmedien A und B	28
Tabelle 10: Zusammensetzung des Hansson-Schwellungsmedium	29
Tabelle 11: Zusammensetzung der Locke's Lösung	30

5 EINLEITUNG

Die ungefähr 100 Milliarden Nervenzellen im menschlichen Gehirn koordinieren lebenswichtige Prozesse. Wenn Teile dieses hochkomplexen Systems ausfallen, wie es bei einer Vielzahl neurodegenerativer Störungen der Fall ist, kann das sehr ernste Folgen haben. Im Regelfall geht die Neurodegeneration mit einem langsam fortschreitenden Funktionsverlust einher, der bis hin zum Ausfall spezifischer Neuronenpopulationen und ihrer Verbindungen führt. Der progressive Verlauf zeigt sich in charakteristischen klinischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen. Da neurodegenerative Prozesse im fortgeschrittenen Alter auftreten, kommt es bei steigender Lebenserwartung und Zunahme des Anteils älterer Menschen an der Gesamtpopulation zu einem Anstieg dieser oft mit schweren neurologischen Ausfällen und Demenz assoziierten Störungen.

Mit einer Inzidenz von ca. 1,8 % der Bevölkerung über 65 Jahren in Europa (de Rijk *et al.*, 2000) ist die Parkinson-Krankheit nach der Alzheimer-Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. In Deutschland leiden schätzungsweise 250.000 Menschen an dieser Erkrankung, weltweit sind es über 6 Millionen. Bis heute sind trotz intensiver Forschung die Ursachen der Parkinson-Krankheit unvollkommen verstanden, und die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur weiteren Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen beizutragen. Insbesondere galt es, mit den dabei zu erarbeitenden Techniken den Wirkungsmechanismen des Tetrazyklin-Derivates Minozyklin nachzugehen, das als potenzielles Therapeutikum in Betracht zu ziehen ist.

5.1 Die Parkinson-Erkrankung

Die Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's disease*, PD) ist eine Bewegungsstörung des extrapyramidalmotorischen Systems und wurde erstmals von dem englischen Arzt und Apotheker James Parkinson (1775-1824) im Jahre 1817 beschrieben. In seiner Abhandlung „*An Essay on the Shaking Palsy*“ ordnete er die klinische Symptomatik dieser Bewegungsstörung bereits einer zentralnervalen Erkrankung zu (Parkinson, 1817; Sian *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zur sekundären PD sind bei der primären Form die auslösenden Faktoren noch weitestgehend unbekannt. Sie wird daher unter dem Begriff des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) zusammengefasst (Gandhi and Wood, 2005). Die Degeneration dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc; Abb. 1), einer Struk-

tur des Mittelhirns, ist neuropathologisch das Hauptcharakteristikum dieser Erkrankung. Der dadurch entstehende Mangel an Dopamin (DA) im *Striatum*, dem Projektionsgebiet der dopaminergen Zellen, führt zu den vier Kardinalsymptomen Bradykinesie (Bewegungsarmut), Rigor (Bewegungssteifheit), Tremor (Muskelzittern) und posturale Instabilität (Conley and Kirchner, 1999). Auch weitere dopaminerge und nicht-dopaminerge Gehirnregionen sind betroffen, wobei sich die Symptomatik nicht nur auf das motorische System allein beschränkt (Jellinger, 1991; Hirsch *et al.*, 2003). Man geht heute davon aus, dass bei den meisten Betroffenen zunächst eine Störung der Nervenzellen in den Kerngebieten des olfaktorischen Systems und im Hirnstamm auftritt (Braak *et al.*, 2003). Erst in einem so genannten dritten Stadium erreicht die Krankheit das ventrale Mittelhirn. Histopathologische Merkmale sind dabei die Entstehung von sogenannten *Lewy-Bodies* (Holdorff, 2002), eosinophile Einschlusskörperchen im Zytoplasma der betroffenen Nervenzellen. Wird das IPS klinisch manifestiert, sind bereits etwa 70-80 % der nigralen dopaminergen Neuronen irreversibel geschädigt (Lang and Lozano, 1998) und die progressive Degeneration ist durch die bisher lediglich palliative Therapie nicht aufzuhalten (Blandini and Greenamyre, 1999).

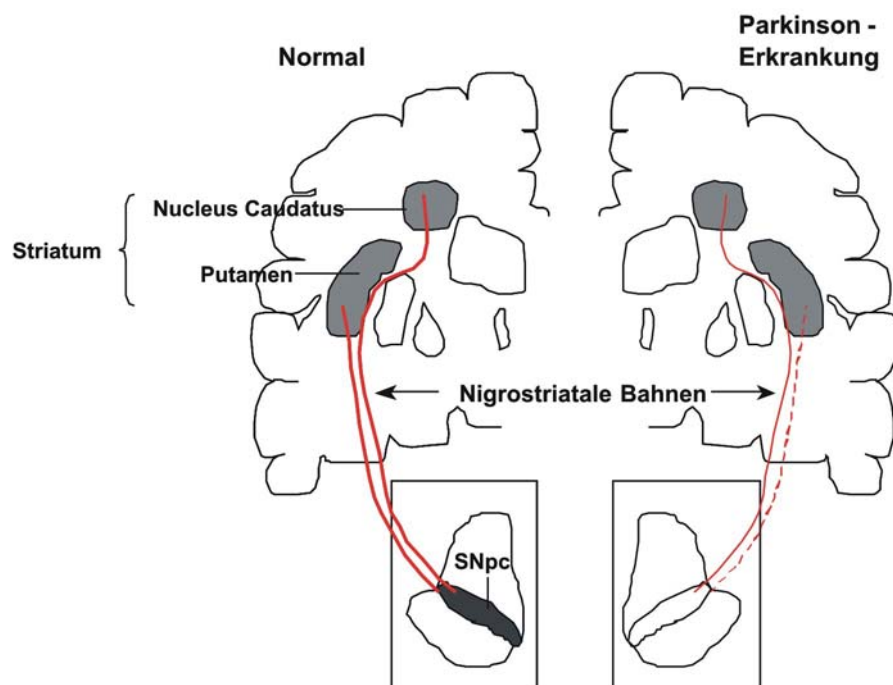


Abb. 1: Schematische Darstellung der für die Parkinson-Erkrankung relevanten Gehirnregionen. In rot sind die gesunden (links) und die erkrankten (rechts) nigrostriatalen Bahnen verdeutlicht. Bei der Parkinson-Krankheit kommt es zu einem Verlust der melaninhaltigen dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). Am stärksten sind diejenigen Nervenzellen betroffen, die zum Putamen projizieren. Abbildung modifiziert nach Benmoyal-Segal and Soreq, 2006.

5.1.1 Ätiologie der Parkinson-Erkrankung

Der überwiegende Teil der PD zählt mit noch ungeklärter Ätiologie zum IPS, die Ursachen für die Entwicklung eines sekundären (symptomatischen) Parkinson-Syndroms hingegen sind weitestgehend bekannt. Von den sporadisch auftretenden idiopathischen und symptomatischen Formen sind die hereditären Formen abzugrenzen, die etwa 5-10 % aller Fälle ausmachen (Mizuno *et al.*, 1999). Verschiedene Genloci (PARK1-11) wurden bereits identifiziert und näher beschrieben (Bonifati *et al.*, 2004; siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Auflistung von Genen und Genorten, die mit genetisch verursachten Formen der Parkinson-Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden. Modifiziert nach Fleming *et al.*, 2005.

PARK	GENORT	GEN	FUNKTION
1/4	4q21-22	α -Synuclein	Präsynaptische Funktion
2	6q25-27	Parkin	E3-Ubiquitin-Ligase
5	4p14	UCH-L1	Ubiquitin-Rückgewinnung
6	1p25-36	PINK1	Mitochondriale Funktion
7	1p36	DJ1	Oxidativer Stress
8	12p112q13.1	LRRK2	Kinase

Aus Studien zur Prävalenz und Inzidenz des IPS in verschiedenen Bevölkerungsgruppen (Di Monte, 2003; Uversky, 2004) wird heutzutage hinsichtlich der Ursachen von einer Kombination aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und Altersdefiziten ausgegangen. Verwandte von PD-Patienten erkranken gemessen an der Normalbevölkerung mit doppelt so hoher Wahrscheinlichkeit, was ein nachhaltiges Argument für die genetische Disposition ist (Vierregge, 1994; Vierregge *et al.*, 1994). Darüber hinaus sind multifaktorielle exogene Risikofaktoren bekannt (Scott *et al.*, 2001; Sherer *et al.*, 2001). Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie der Exposition mit Pestiziden, wurde durch epidemiologische Untersuchungen belegt (Di Monte, 2003; Brown *et al.*, 2005). Die mit höherem Alter exponentiell steigende Prävalenz für IPS ist unumstritten und gibt Hinweise auf einen altersabhängigen Anstieg neuronaler Suszeptibilität gegenüber neurotoxischen Faktoren (Zhang and Román, 1993; Le Couteur *et al.*, 2002).

5.1.2 Pathogenesewege der Parkinson-Erkrankung

Einflüsse von Genetik, Umwelt und Alter potenzieren das Risiko an PD zu erkranken. Sie setzen in unterschiedlicher Weise an den pathogenetischen Mechanismen an, die letztlich zum progressiven Zelltod dopaminerger Neurone führen (Jenner *et al.*, 1998). Zu diesen Pathogenesewegen zählen neben Proteinaggregationen und inflammatorischen Prozessen auch mitochondriale Dysfunktionen, die mit oxidativen Stress, Öffnung der Permeabilitätstransitionspore und Zelltod einhergehen (Betarbet *et al.*, 2002).

5.1.2.1 Proteinaggregation

Im physiologischen Zellstoffwechsel werden falsch gefaltete oder anderweitig geschädigte Proteine durch den 26S-Proteasom-Komplex zu Peptid-Fragmenten und Aminosäuren abgebaut. Ein Zusammenhang zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-Weg und der Pathogenese des IPS wurde durch den Nachweis des Proteins α -Synuclein und von Proteasom-Bausteinen in den für degenerierende dopaminerge Neuronen *SNpc* typische Proteinaggregate, den *Lewy-Bodies* erbracht (Kahle *et al.*, 2002). Die Ursache für die Bildung dieser Proteinaggregate wird zum einen in einer Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Weges vermutet, zum anderen auch in Veränderungen der Struktur oder Menge des α -Synucleins. Beides ist beim PARK1- wie auch PARK4-Gendefekt zu beobachten (Le and Appel, 2004; Betarbet *et al.*, 2005). Bislang ist nicht hinreichend geklärt, inwieweit α -Synuclein oder die mit ihm interagierende Proteine Substrate von Parkin darstellen (Chung *et al.*, 2001). Mutationen des Gens, welches für Parkin kodiert (auch als PARK2 bezeichnet) sind Ursache für eine autosomal rezessive hereditäre Form der PD (Kitada *et al.*, 1998). Gegen eine generelle Toxizität von *Lewy-Bodies* spricht, dass sie innerhalb von überlebenden Neuronen gefunden werden. Wahrscheinlich dienen sie zunächst dem Schutz der Zelle, beeinträchtigen aber ab einer bestimmten Konzentration die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (Betarbet *et al.*, 2005).

5.1.2.2 Inflammatorische Prozesse

Inflammatorische Prozesse in neuronalen Geweben werden hauptsächlich von den immunkompetenten Gliazellen vermittelt. Mikrogliazellen sind postnatal aus der Blutbahn in das Gehirn eingewanderte Zellen und entsprechen immunkompetenten Makrophagen. Sind sie phagozytotisch aktiv und präsentieren Antigene, werden sie als aktivierte Mikroglia be-

zeichnet (Cross and Woodroffe, 2001). In PD-Patienten wurde ein Anstieg an aktivierter Mikroglia in der *SNpc* nachgewiesen (McGeer *et al.*, 1988). Die höhere Dichte dieser Zellen geht mit einer steigenden Expression an proinflammatorischen Zytokinen, z.B. dem Tumor-Nekrose-Faktor, einher (Nagatsu *et al.*, 2000). Es wird aber angenommen, dass es sich bei den entzündlichen Prozessen eher um sekundäre Mechanismen als Reaktion auf bereits stattfindende neurodegenerative Veränderungen handelt. Diese Prozesse mögen zur Progression der Erkrankung beitragen (Langston *et al.*, 1999).

5.1.2.3 Mitochondriale Dysfunktionen

Mitochondrien sind Zellorganellen, die im Zellkatabolismus den Hauptanteil des Energieträgers ATP synthetisieren. Dazu übertragen sie in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS; Atmungskette) Elektronen und Wasserstoff von hochenergetischen Verbindungen auf elementaren Sauerstoff, und erzeugen somit Wasser. Die hierbei frei werdende Energie wird in die Errichtung eines Protonengradienten investiert, welcher der Synthese von ATP und dem Zellstoffwechsel dient (Abb. 2).

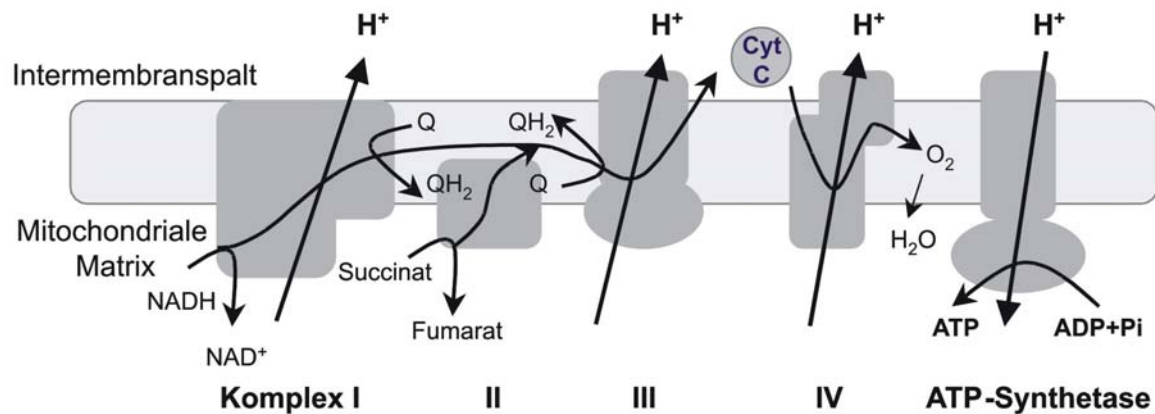


Abb. 2: Schema der mitochondrialen Atmungskette mit den 5 Enzymkomplexen, eingebettet in die innere Mitochondrienmembran. Die in Redoxreaktionen frei werdende Energie wird für den Aufbau eines Protonengradienten genutzt, und der Rückfluss der Protonen durch den Komplex V dient der Synthese von ATP.

Fünf Proteinkomplexe der OXPHOS sind an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubihydrochinon-Cytochrom-C-Oxidoreduktase), Komplex IV (Cytochrom C-Oxidoreduktase) und die ATP-Synthetase. Für die hier gewählte Aufgabenstellung ist der Komplex I von besonderer Bedeutung. Es handelt sich mit

940 kDa um eine sehr umfangreiche molekulare Struktur. Sie besteht aus 43 Proteinuntereinheiten, von denen 7 durch die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert werden. Komplex I enthält ein nicht-kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) und mindestens fünf Eisen-Schwefel-Zentren (Fe-S). Diese dienen als prosthetische Gruppen bei der Übertragung von Elektronen von NADH auf Ubichinon. Vom NADH werden zunächst zwei Elektronen auf das FMN übertragen, dabei entsteht die reduzierende Form FMNH₂. Die Elektronen werden dann vom FMNH₂ auf eine Reihe von Fe-S transferiert, gefolgt von einer Übertragung auf ein Coenzym Q, das aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in biologischen Systemen auch als Ubichinon (Q) bezeichnet wird. Die Reduktion dieses enzymgebundenen Zwischenprodukts führt zum Ubichinol (QH₂). Durch den Fluss von zwei Elektronen durch die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase vom NADH zum QH₂, werden vier Protonen von der Matrix- auf die Zytosolseite der Mitochondrien gepumpt (Hatefi, 1985). Der dabei entstehende pH-Gradient und das Membranpotential erzeugen eine protonenmotorische Kraft, die dem Antrieb der ATP-Synthese dient.

Mitochondrien sind häufig an degenerativen Vorgängen beteiligt (Hatefi, 1985; Murphy *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang zwischen der Neurodegeneration dopaminerger Neuronen und Fehlfunktionen der Mitochondrien wurde durch die Anwendung des Komplex I-Inhibitors MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) verdeutlicht. Es führte 1979 in Kalifornien als Bestandteil eines synthetischen Heroinkoktails zu akuten Parkinson-Syndromen. In verschiedenen Modellen wurde der Wirkmechanismus von MPTP untersucht und eine selektive Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette belegt (Nicklas *et al.*, 1985). *Post-mortem*-Untersuchungen der Gehirne von Parkinson-Patienten ergeben eine ca. 30 %ige Reduktion der Aktivität des Komplex I. Ob es sich hierbei in der Pathogenese des IPS um einen primären Mechanismus handelt und wenn ja, ob dieser genetisch oder durch Umweltfaktoren ausgelöst wird, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden (Schapira *et al.*, 1990). Es liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, inwiefern in PD-Patienten eine generelle Komplex I-Dysfunktion zu einer selektiven Degeneration nigraler dopaminerger Neurone führt. Im entsprechenden Falle würde dies für einen primären mitochondrialen Defekt als Krankheitsursache sprechen (Parker *et al.*, 1989; DiDonato *et al.*, 1993). Untersuchungen in Zellkulturen und an isolierten Mitochondrien ergaben vielfältige Zusammenhänge zwischen mitochondrialen Defiziten und oxidativem Stress.

5.1.2.3.1 *Oxidativer Stress*

Unter oxidativen Stress versteht man die Schädigung biologischer Systeme durch so genannte reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Dabei werden freie Radikale, wie das Superoxid-Radikal-Anion und das Hydroxyl-Radikal, und andersartige molekulare Oxidantien, wie das Wasserstoffperoxid, unterschieden. Auch reaktive Stickstoffspezies (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), wie Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit, sind am oxidativen Stress beteiligt. Freie Radikale zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aus und sind im Allgemeinen reaktionsfreudig (Halliwell, 1992). Durch Modifikationen von Aminosäureresten oder durch Lipidperoxidation werden Funktionsstörungen membranassoziierter Proteine und zellulärer Enzyme (Bowling and Beal, 1995), DNA-Schäden (Yoritaka *et al.*, 1996), mitochondriale Defekte (Allen *et al.*, 1995) sowie apoptotische Mechanismen (Li *et al.*, 2003) ausgelöst.

ROS/RNS sind im physiologischen Zellstoffwechsel auftretende Zwischenprodukte, die von zelleigenen Antioxidantien (Glutathion, Thioredoxin) und entsprechenden Enzymen (Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase, Katalase) sowie Vitamin E und Vitamin C abgefangen werden. Bei oxidativem Stress herrscht ein Ungleichgewicht zwischen dem oxidativen und dem antioxidativen Potenzial zugunsten ersterem vor, was entweder durch die vermehrte Bildung von ROS/RNS oder durch einen Mangel an antioxidativer Kapazität bedingt ist (Jenner, 1998).

Bei Fehlfunktionen der mitochondrialen Enzymkomplexe nimmt die Zahl gebildeter ROS stark zu und führt seinerseits zu einer Schädigung der Atmungskette. Hinzu kommt der Mangel an ATP bei gestörter OXPHOS, wodurch ein zelluläres Energiedefizit entsteht. ROS schädigen zudem die mtDNA, die kaum Reparaturmechanismen besitzt und nicht durch Histone geschützt wird. Da wichtige Proteine der mitochondrialen Komplexe von der mtDNA kodiert sind, wird der Schädigungsprozess weiter vorangetrieben. Ist die Zelle nicht in der Lage, diesen Vorgang durch geeignete antioxidative Mechanismen zu unterbrechen, entsteht ein *Circulus vitiosus*, der letztendlich zum Zusammenbruch des Energiehaushaltes der Zelle und somit zur Zelldegeneration führt. Die empfindlichste Komponente für oxidativen Stress ist der Komplex I, da bereits eine Hemmung seiner Funktion um 16 % einen deutlichen Anstieg an ROS induziert, während der Komplex III bis zu 70 % beeinträchtigt werden muss, bevor Veränderungen in der ROS Produktion sichtbar werden. Die höchste Empfindlichkeit des Komplex I ist für Mitochondrien in Nervenendigungen nachgewiesen (Schapira *et al.*, 1990; Adam-Vizi, 2005).

Mit zunehmendem Alter ist ein Anstieg des oxidativen Stresses beschrieben worden, der als Ursache für die Degeneration dopaminergener Neurone auch für solche Fälle zu verzeichnen ist, in denen kein Parkinson-Syndrom vorliegt (Le Couteur *et al.*, 2002; Manczak *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Dopaminerge Neurone zeichnen sich *per se* durch hohen oxidativen Stress aus, da der Katabolismus von DA via Monoaminoxidase-B (MAO-B), die Autooxidation von DA, sowie der für diese Zellen typische Eisenspiegel und Neuromelaningehalt vermehrt zu einer Entstehung von freien Radikalen führen (Coyle and Puttfarcken, 1993). Hieraus resultiert eine höhere Vulnerabilität dopaminergener Neuronen für eine bevorzugte Degeneration im IPS (Jenner, 1998).

5.1.2.3.2 Mitochondriale Permeabilitätstransition

Für die Aufrechterhaltung der oxidativen Phosphorylierung ist eine geringe Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran eine wichtige Voraussetzung. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass oxidativer Stress ein Auslöser für die Permeabilitätstransition (PT) sein kann (Radi *et al.* 2002; Solenski *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang ist ein spezieller Mechanismus beschrieben worden, der einen massiven Anstieg der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Moleküle und Ionen mit einem Molekulargewicht bis zu 1500 Da zur Folge hat. Die PT geht auf die Bildung einer unspezifischen Megapore in der Mitochondrienmembran, der sogenannten *Permeability Transition Pore* (PTP), zurück (Crompton *et al.*, 1999; Petronilli *et al.*, 2001; Alano *et al.*, 2002). Der wohl wichtigste Faktor für die Öffnung der PTP stellt eine Überladung der Mitochondrien mit Kalziumionen dar (Leist and Nicotera, 1998; Crompton *et al.*, 1999). Die Sensitivität der Pore für Kalzium wird jedoch durch andere Einflüsse bestimmt. So ist ein Mangel an Pyridinnukleotiden oder die Anwesenheit von organischem Phosphat ausschlaggebend für die Öffnungswahrscheinlichkeit der PTP, wohingegen ein niedriger pH-Wert sich inhibierend auswirkt (Crompton *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine mitochondriale Depolarisation die PTP-Öffnung fördert, jedoch können auch Sekundäreffekte der Depolarisation zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der PTP beitragen. So hat der durch die PTP-Öffnung verursachte Abfall des mitochondrialen Membranpotentials eine Erhöhung der ROS-Produktion zur Folge. Ein „klassischer“ Hemmstoff der PTP ist das zyklische Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) (Búa *et al.*, 2001). Es hemmt die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mtPTP) durch die Interaktion mit dem löslichen Matrixprotein Cyclophilin D (CycD), ein Enzym, das die Isomerisie-

nung von Peptidbindungen von der *cis*- in die *trans*-Konformation katalysiert. Durch die Bindung an Proteine der inneren Mitochondrienmembran bewirkt das CycD vermutlich eine Konformationsänderung und induziert damit die Öffnung der mtPTP. In Anwesenheit von Kalziumionen und bei oxidativem Stress konnte eine verstärkte Bindung von CycD an die innere Mitochondrienmembran gezeigt werden (Búa *et al.*, 2001). Bei dem Zielprotein des CycD handelt es sich um den Adeninnukleotidtransporter (ANT) der inneren Mitochondrienmembran, der für den Austausch von ADP gegen ATP verantwortlich ist. So inhibieren auch die physiologischen Substrate ATP und ADP die Öffnung der mtPTP. Die Oxidation kritischer Aminosäurereste des ANT führt zur PT, eine Möglichkeit, die Modularität der Pore durch oxidativen Stress zu erklären. Weitere Bestandteile der PTP sind der *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran, Mitglieder der Bcl-2-Familie sowie das zytosolische Enzym Hexokinase und die mitochondriale Kreatinkinase (Nicolli *et al.*, 1996; Martinou and Green, 2001). Basierend auf diesen Ergebnissen schlug Halestrap (Halestrap, 2006) einen Mechanismus vor, wie er in Abbildung 3 skizziert ist.

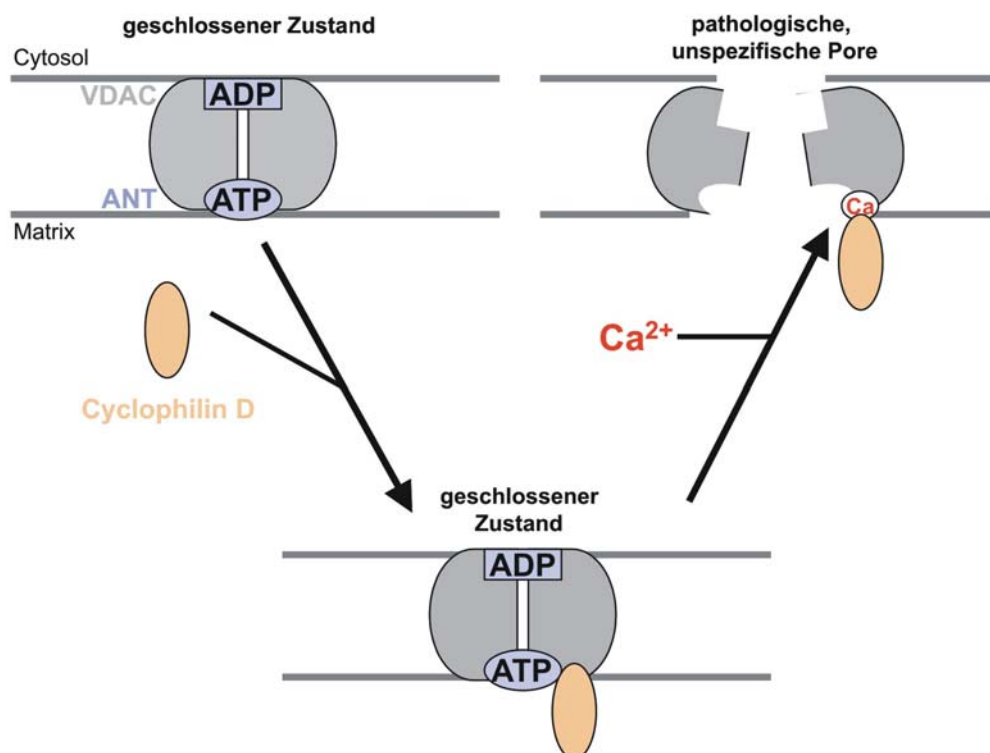


Abb. 3: Dargestellt ist das Funktionsprinzip der mtPTP nach Halestrap (2006). CycD bindet, verstärkt durch oxidativen Stress, an den ANT und verstärkt dort eine Konformationsänderung des Proteins. Es bildet sich eine Megapore. Die Bindung von Kalziumionen fördert diesen Prozess. Die Bindung von Kalzium an den ANT kann durch Bindung von Adeninnukleotiden an den Transporter inhibiert werden.

5.1.2.3.3 *Zelltod*

Die mitochondriale Permeabilitätstransition spielt beim Zelltod eine offenbar große Rolle. Zwei Wege zum Zelltod werden unterschieden: die Nekrose und die Apoptose. Die Nekrose ist in den meisten Fällen als Folge irreversibler Zellschädigung nach schweren Stresssituationen oder hohen Konzentrationen toxischer Agenzien anzusehen (Leist and Nicotera, 1998; Nieminen, 2003; Orrenius *et al.*, 2003). Es handelt sich um einen passiven Prozess, der mit schnellem ATP-Verlust und Zusammenbruch der Membranfunktion einhergeht. Morphologisch ist der nekrotische Zelltod durch ein Anschwellen der Zellen, gefolgt von einer Ruptur der Zellmembran und Freisetzung der Zellorganellen in das Interstitium charakterisiert. Die Membranintegrität geht verloren, was in der Freisetzung inflammatorischer Zytokine resultiert. Schwere Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe sind die Folge.

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, ATP-abhängiger Vorgang, der durch extrinsische, Rezeptor-vermittelte oder intrinsische Signalwege induziert wird (Orrenius *et al.*, 2003). Der Initialphase folgt der *point of no return*, nach dem die Phase der Degradation eintritt, in der morphologischen Anzeichen, wie Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung manifestiert werden.

Die apoptotische Signalkaskade wird durch Aktivierung von Caspasen initiiert. Caspasen werden als inaktive Pro-Enzyme expremiert und erhalten ihre Aktivität nach proteolytischer Spaltung. Sowohl extrazelluläre Signale, wie die Bindung an Todesrezeptoren an der Zellmembran, als auch die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien in das Zytosol führen zu einer Aktivierung von Caspasen, die dann andere Caspasen aktivieren, die ihrerseits wichtige Proteine spalten und somit die zelluläre Degeneration einleiten. Wie das Cyt c die Mitochondrien verlässt, ist bis heute nicht genügend geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass dieses Protein den Intermembranspalt durch Megaporen innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran verlässt. So verursachen physiologische proapoptotische Stimuli eine Translokation des zytosolischen Proteins Bax in die Mitochondrien. Bax gehört zur Bcl-2-Familie und kann durch Oligomerisierung große unspezifische Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, und über diese, neben Cyt c, auch andere proapoptotische Proteine wie AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) oder Smac (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase*) in den mitochondrialen Intermembranraum entlassen. Eine Öffnung der PTP resultiert aufgrund des kolloidosmotischen Drucks in einem Anschwellen der mitochondrialen Matrix, was die Ruptur der äußeren Mitochondrien-

membran und die Diffusion proapoptotischer Proteine in das Zytosol nach sich zieht. Allerdings kann dieses Modell nicht erklären, warum ausschließlich proapoptotische Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranspalt entlassen werden. Aufgrund des ATP-Verbrauchs kann es zur Apoptose nur bei *transienter* PTP-Öffnung kommen.

Zahlreiche Ergebnisse in der Literatur zeigen, dass die beiden Zelltodarten gemeinsame Mechanismen nutzen können, von denen die mitochondriale Membranpermeabilisation eine zentrale Rolle spielt (Lam *et al.*, 2001). In der nachfolgenden Signalkaskade divergieren die nekrotischen und apoptotischen Signalwege jedoch (Nieminen, 2003).

5.2 Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung

Tiermodelle sind zur Erforschung der Pathomechanismen von essentieller Bedeutung. Dabei werden genetische von chemisch induzierten Tiermodellen abgegrenzt. Die pharmakologische Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette wird in diversen chemisch induzierten Tiermodellen genutzt, um verschiedene Merkmale der Parkinson-Erkrankung hervor zurufen und zu erforschen.

5.2.1 Pharmakologisch-induzierte Tiermodelle

Die in Nagern und Primaten etablierten chemischen Tiermodelle basieren allesamt auf der Injektion von toxischen Substanzen, die mit unterschiedlicher Spezifität das dopaminerge System zerstören.

Eine in diesem Zusammenhang wichtige Substanz ist das 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), ein hydroxyliertes Analogon des Neurotransmitters DA. Die strukturelle Ähnlichkeit zum DA ermöglicht die Aufnahme dieser Substanz durch selektive Transportmechanismen für Katecholamine. Bei der Desaminierung durch die MAO mit dem Nebenprodukt Wasserstoffperoxid und wegen der nicht-enzymatischen Autooxidation von 6-OHDA in ROS entsteht verstärkt oxidativer Stress. Als Konsequenz kommt es zur Überlastung der intrazellulären antioxidativen Systeme und dadurch zur Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüchen, Mutationen und strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts. Zudem wird eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion als weiterer Schädigungsweg des 6-OHDA angenommen, denn Lotharius *et al.* (1999) stellten fest, dass 6-OHDA in kultivierten dopaminergen Neuronen einen Zusammenbruch des Membranpotentials bewirkt.

Auch das bereits erwähnte MPTP erlaubt die selektive Intoxikation dopaminergere Neuronen. Nach Aufnahme in Astrozyten wird es durch die gliale MAO-B in seinen toxischen

Hauptmetaboliten MPP⁺ umgewandelt (Salach *et al.*, 1984). Über extraneuronale Monoamin-Transporter gelangt das MPP⁺ in den Extrazellulärraum, ist in dieser Form ein Substrat für Dopamintransporter und reichert sich somit vorzugsweise in Neuronen der *SNpc* an (Javitch *et al.*, 1985). Nicht sequestriertes MPP⁺ akkumuliert mitochondrial und blockiert spezifisch den Enzym-Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Nicklas *et al.*, 1985; Mizuno *et al.*, 1988). Die resultierende Absenkung des ATP-Spiegels führt zum Verlust des neuronalen und mitochondrialen Membranpotentials, zur Störung der Kalzium-Homöostase und Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die gezeigt haben, dass es eine direkte Korrelation zwischen erhöhter MPTP-Konzentration, absinkendem ATP-Spiegel und erhöhter Zelltod-Rate, gibt.

Greenamyre *et al.* (1999) beschrieben ein weiteres chemisches Tiermodell der idiopathischen Parkinson-Erkrankung. Sie berichteten über einen chronisch progressiven Untergang dopaminerger Neuronen in der *SNpc* nach intravenöser Applikation von Rotenon mittels eines Mikropumpensystems in Ratten.

5.2.2 Rotenonmodell der Parkinson-Erkrankung

Rotenon ist eine natürlich vorkommende Substanz. Sie wird als das wirksamste Mitglied der *Rotenoide* angesehen, einer Familie zytotoxischer Verbindungen, die aus Leguminosen der Gattung *Derris* und *Lonchocarpus* extrahiert werden können (Abb. 4).

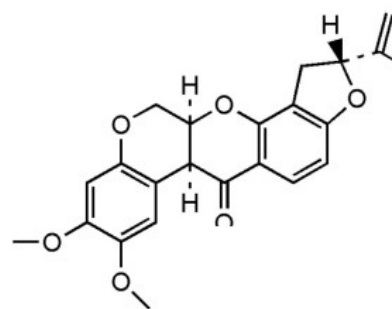


Abb. 4: Chemische Formel von Rotenon mit hoch lipophiler Struktur; modifiziert nach Bove *et al.*, 2005.

In der Landwirtschaft, insbesondere aber in der Fischzucht wird es zur Bestandsregulierung eingesetzt (Uversky, 2004). Die Exposition mit Rotenon führt zu einer erhöhten Prävalenz für das IPS und wird daher als Risikofaktor in der Ätiologie der Erkrankung be-

trachtet (Gorell *et al.*, 1998; Le Couteur *et al.*, 1999; Kamel *et al.*, 2001). Rotenon zerfällt, wenn es Sonnenlicht ausgesetzt wird, innerhalb weniger Tage nahezu vollständig, und in 1-3 Tagen im Erdboden oder im Wasser. Daher ist eher die direkte Exposition und Inhalation oder die Aufnahme über Nahrungsmittel epidemiologisch von Bedeutung als eine Grundwasserbelastung. Nach oraler Aufnahme wird Rotenon jedoch kaum resorbiert und die Leber baut die Substanz effizient ab, wie in Toxinstudien an Ratten und Hunden über einen Zeitraum von 24 Monate gezeigt wurde. In diesen Untersuchungen wurden keine neuropathologischen Effekte im Gehirn oder Verhaltensauffälligkeiten beschrieben (Gorell *et al.*, 1998). In einer Studie an Ratten und Mäusen hingegen war Rotenon nach systemischer Gabe im Gehirn nachzuweisen (Ilivicky and Casida, 1969; Caboni *et al.*, 2004). Dort passiert es zelluläre Membranen und kann sich in Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien anreichern (Schuler and Casida, 2001). Rotenon depolymerisiert Mikrotubuli in Tubulinmonomere. Diese wurden als Substrate der Protein-Ubiquitin-Ligase Parkin des Proteasom-Komplexes identifiziert, die interessanterweise in einer monogenetisch determinierten Form von PD fehlt. Nach Ren *et al.* (2003) verlangsamt ein Mangel den Abbau dieser sich unter Einfluss von Rotenon anhäufenden Proteine und fördert somit die Bildung von Proteinaggregaten (*Lewy-Bodies*). Anders als im 6-OHDA- und MPTP-induziertem Tiermodell der Parkinson-Erkrankung sind in Rotenon-behandelten Ratten in einigen der verbleibenden dopaminergen Neuronen der *SNpc* solche proteinhaltigen Einschlüsse zu finden (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003; Höglinger *et al.*, 2003). Diese sind, ähnlich wie die Lewy Körper bei der PD, immunpositiv für Ubiquitin und α -Synuklein (Betarbet *et al.*, 2000). In Verhaltensexperimenten zeigen Rotenon-behandelte Ratten eine verringerte Mobilität, eine gebeugte Haltung und in einigen Fällen auch Steifigkeit und sogar Katalepsie (Alam and Schmidt, 2002). Diese Beeinträchtigungen des motorischen Systems konnte durch L-Dopa-Gabe zurückgesetzt werden.

Von noch größerer Bedeutung für die Induktion der PD und ähnlicher Symptome ist die durch Rotenon verursachte, hoch potente und spezifische Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Daher wird es seit längerem auch in der Parkinson-Forschung verwendet. Bevor Rotenon in Tiermodellen eingesetzt wurde, lagen bereits Daten aus Zellkulturexperimenten vor. So wurde eine höhere Sensibilität dopaminergener Neuronen für die Toxizität von Rotenon und eine Reduktion der Transmitterwiederaufnahme im Vergleich zu GABAergen Neuronen festgestellt (Marey-Semper *et al.*, 1995). *In vivo* allerdings führt die Applikation von Rotenon zu widersprüchlichen Ergebnissen. So wurde bei Ratten nach intravenöser (i.v.) Injektion von 10-18 mg/kg Rotenon (täglich über eine

Woche hinweg) eine selektive Läsionierung des Striatums mit Neuronenschädigung und Gliose beobachtet. Paradoxerweise waren nigrale dopaminerge Neuronen nicht betroffen (Ferrante *et al.*, 1997). Subkutane Injektionen (15 mg/kg einmalig oder 1,5 mg/kg Rotenon dreimal wöchentlich über 3 Wochen hinweg) bei der Maus führten ebenfalls zu keiner Abnahme des striatalen DA-Gehaltes, erhöhten jedoch akut den DA-Metabolismus (Thiffault *et al.*, 2000). Erste selektive Schädigungen des nigrostriatalen Systems nach systemischer Applikation von Rotenon wurden erst bei chronischer Belastung beobachtet, z.B. bei kontinuierlicher Gabe über 28 Tage hinweg (Ratte i.v. Injektion von 2-3 mg/kg täglich) (Greenamyre *et al.*, 1999; Betarbet *et al.*, 2000). Im Gehirn der Tiere wurde bei dieser Applikationsart eine Konzentration von etwa 20-30 mM Rotenon erreicht. Allein schon die Hemmung der Atmungskette erklärt hinreichend solche durch Rotenon verursachten Mechanismen wie oxidativen Stress, Exzitotoxizität, Proteinaggregation und Apoptose, die auch *in vivo* gegenüber einem alleinigen ATP-Mangel eine größere Rolle spielen (Sherer *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2001).

5.3 Minozyklin

Minozyklin ist ein semisynthetisches Antibiotikum und gehört zur Stoffklasse der Tetrazykline. Diese üben ihre antibakterielle Funktion aus, indem sie die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstellen der 30S-Ribosomenuntereinheit beeinträchtigen und somit die Verlängerung der Polypeptidkette während der bakteriellen Proteinbiosynthese verhindern (Klein and Cunha, 1995). Tetrazykline weisen gemeinsam eine konservierte tetrazyklische Ringstruktur auf, wobei die Anzahl und Art der chemischen Substitutionen an verschiedenen Positionen variieren (Stirling *et al.*, 2005; Abb. 5). Das Tetrazyklin-Derivat Minozyklin wurde erstmalig 1967 synthetisiert und enthält eine Dimethylaminogruppe an Position R₁.

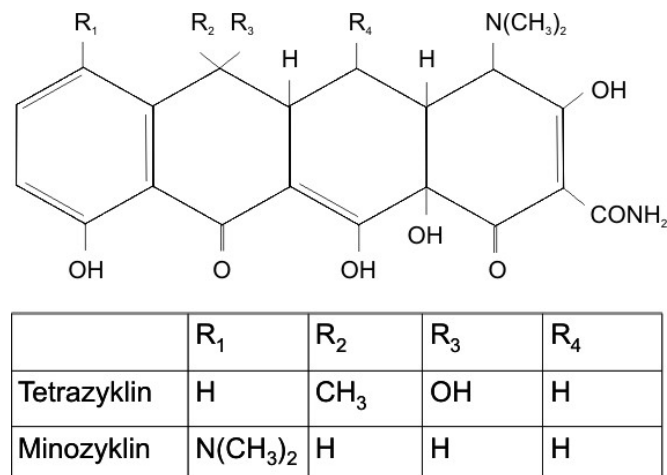


Abb. 5: Struktur des Tetrazyklins und des Tetrazyklin-Derivats Minozyklin. Beide Substanzen teilen eine gemeinsame konservierte tetrazyklische Ringstruktur. Das semisynthetische Derivat Minozyklin besitzt chemische Modifikationen an Position R₁, R₂ und R₃ der Ringstruktur.

Minozyklin besitzt ein breites antibakterielles Wirkspektrum und wird zudem zur Behandlung von *Akne vulgaris* und rheumatischer *Arthritis* (Freeman, 1989; Tilley *et al.*, 1995) eingesetzt. Neben seiner antibiotischen Wirkung wird für dieses Medikament jedoch auch ein neuroprotektiver Effekt beobachtet (Du *et al.*, 2001; Festoff *et al.*, 2006). Die hohe Lipophilie von Minozyklin ermöglicht eine gute Verteilung im Gewebe. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass sich bis zu 50 % der Serumkonzentration an Minozyklin im Gehirn anreichert (Smith and Leyden, 2005).

Tierexperimentelle Untersuchungen haben belegt, dass Minozyklin bei Schlaganfall und bei primären neurodegenerativen Erkrankungen, wie Huntington, Parkinson, Multipler Sklerose und Amyotropher Lateralsklerose erfolgreich eingesetzt werden kann (Brundula *et al.*, 2002; Bonelli *et al.*, 2004; Thomas and Le, 2004; Gordon *et al.*, 2004). Minozyklin beweist neben seinen antiinflammatorischen auch antiapoptotische Eigenschaften, was die Inhibition von Matrix-Metalloproteasen (Huang *et al.*, 2009) und iNOS (Amin *et al.*, 1996) sowie eine Blockade von Caspase-1 and Caspase-3, die Inhibition der MAP-Kinase sowie die mtPTP-vermittelte Cyt C-Freisetzung (Lin *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004) beinhaltet. Darüber hinaus gibt es erste Ergebnisse, die belegen, dass Minozyklin auch antioxidative Eigenschaften besitzt (Kraus *et al.*, 2005).

Der neuroprotektive Wirkungsmechanismus von Minozyklin wird in vielen Studien kontrovers diskutiert und ist bis heute nicht eindeutig aufgeklärt.

5.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit sich eine Komplex I-Inhibierung in Neuronen auf ihre Sensitivität gegenüber PT-auslösenden Noxen (ROS/RNS) auswirkt. Zu diesem Zweck sollte ein *In-vitro*-Zellkulturmodell etabliert werden, mit dem durch die Applikation des Elektronentransportblockers Rotenon eine Hemmung des Komplex I in kortikalen Neuronen hervorgerufen wird. Die Hypothese, dass eine pharmakologisch induzierte Komplex I-Inhibierung zusammen mit intrazellulär erhöhtem Kalziumspiegel zur Öffnung der mtPTP führt, sollte an Primärkulturen solcher Neuronen mittels bildgebenden Verfahren und biochemischen Analysen auf Aktivität bzw. Formierung der mtPTP untersucht werden. Prüfparameter war die zytosolische Kalziumdynamik, die am ehesten Aufschluss über die veränderte mitochondriale Funktionalität gibt. Anhand der zu etablierenden experimentellen Möglichkeiten sollten darüber hinaus die Wirkungsmechanismen des Minozyklins untersucht werden. Außerdem war zu überprüfen, inwieweit Antioxidantien sowie Agonisten oder Antagonisten der mtPTP eine schützende Wirkung ausüben. Auch hierbei lag das Hauptaugenmerk auf dem Tetrazyklin-Derivat Minozyklin.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Materialien

Im Folgenden sind genutzte Gerätschaften und Apparaturen (Tabelle 2) sowie Chemikalien (Tabelle 3), die nicht eigens im Methodenteil erwähnt werden, aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Apparaturen

GERÄTE	HERSTELLER
Laserscanmikroskop AXIOVERT, LSM 510 Pascal	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Jena
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Gilson, Frankreich
Pumpschlauch Typ ENE 08	Windaus, Clausthal-Zellerfeld
Spektrophotometer Cary 100 Conc	Varian, Darmstadt
Spektrophotometer PerkinElmer	Waltham, Massachusetts, USA
Spektrophotometerküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Mitochondrienpräparation)	Sorvall, Langenselbold
Zentrifuge (Zellkultur)	Heraeus, Hanau

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

SUBSTANZEN	HERSTELLER
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
BSA (<i>Bovines</i> Serum Albumin)	PAA, Cölbe
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Fluka, Buchs (Schweiz)
CsA (Cyclosporin A)	Alexis, Grünberg
CuSO ₄	Sigma, Steinheim
Desoxycholat	Sigma, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Sigma, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma, Steinheim
Glutamat	Sigma, Steinheim
HEPES	Boehringer, Mannheim
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Mannitol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Fluka, Buchs
Minozyklin	Sigma, Steinheim
MOPS [3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure]	Calbiochem, Bad Soden
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ⁺ /K ⁺ -Tartat	Merck, Darmstadt

NaOH	Merck, Darmstadt
NMDA (n-Methyl-D-Aspartat)	Alexis, Grünberg
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
Percoll	Sigma, Steinheim
Pluronsäure	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinstandard BSA (<i>Bovines Serum Albumin</i>)	Sigma, Steinheim
Rotenon	Sigma, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tetrazyklin	Sigma, Steinheim
Tris	Sigma, Steinheim
Triton-X-100	Ferka, Berlin
Trolox	Sigma, Steinheim

6.2 Methoden

6.2.1 Tiere und Gewebe

Alle Tierexperimente erfolgten in Abstimmung mit der Tierschutzkommission des Bundeslandes Sachsen-Anhalt. Die Tiere wurden unter kontrollierten, pathogenfreien Bedingungen (Temperatur: 20 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 50-60%) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten, und hatten ständigen Zugang zu Futter (Altromin, Lage) und Wasser.

Kortikale Neuronenkulturen wurden aus Embryonen trächtiger Wistar-Ratten (hauseigene Zucht oder Bezug von Harlan-Winkelmann, Borcheln) am Embryonaltag 16 (E 16) angelegt. Dazu waren die Ratten über Nacht verpaart worden. Der Tag nach Trennung der Muttertiere von den Männchen ist als Embryonaltag 1 (E 1) definiert.

6.2.2 Zellkultur

6.2.2.1 Beschichtung der Deckgläser

Kortikale Neuronen wurden auf Deckgläsern in Zellkulturschalen kultiviert. Zum Anheften auf eine Glasoberfläche, die für das Wachstum und die Differenzierung unabdingbar ist, erfolgte eine Beschichtung der Deckgläser mit dem basischen Polymer Poly-D-Lysin (PDL; Invitrogen, Karlsruhe). Sterilisierte Deckgläser (Durchmesser 25 mm; Menzel-Gläser, Braunschweig) wurden dazu in Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm; Nunc, Wiesbaden) überführt und mit steriler PDL-Lösung (1 mg/ml in PBS pH 7,4) beschichtet. Nach einstündiger Inkubation erfolgten zwei Waschschriffe mit sterilem *Aqua dest.* Die so präparierten Zellkulturschalen kamen zum Trocknen über Nacht in einen Begasungs-

Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) und wurden dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

6.2.2.2 Gewinnung kortikaler Neuronenkulturen

Trächtige Rattenweibchen wurden am Embryonaltag 16 mittels Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) in einem Betäubungstopf narkotisiert und anschließend dekapitiert. Nach der Öffnung des Bauchraumes erfolgte die Entnahme und anschließende Überführung der Embryonen in sterilen Puffer (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS; Ca²⁺-und Mg²⁺-frei; Invitrogen, Karlsruhe). Nach dem Desinfizieren in 70 % Ethanol folgten die weiteren Präparationsschritte der Embryonen unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Arbeitsmaterialien.

Die Embryonen wurden nach Entfernung der Embryonsäcke ebenfalls durch Dekapitation getötet und die Köpfe in Kulturmedium (Tabelle 4) gesammelt. Der Hirnentnahme schloss sich die Separation der kortikalen Hemisphären mit Hilfe eines Stereomikroskops an. Nach mechanischer Dispersion des gewonnenen Gewebes mittels Trituration in Kulturmedium durch eine Einmal-Injektions-Kanüle (23G) erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm) bei Raumtemperatur (RT). Das entstandene Pellet wurde erneut in 5 ml Kulturmedium gelöst und wie zuvor zentrifugiert. In Abhängigkeit von der Pelletgröße erfolgte die Resuspendierung in 1 bis 5 ml Medium. Es wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit dem gleichen Volumen an Trypanblau (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Dieser Farbstoff kann die Membran lebender Zellen nicht passieren und färbt daher ausschließlich tote Zellen an. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Lebendzellzahl ermittelt und die gewünschte Einstreudichte von 1,5 x 10⁶ Zellen/2 ml durch Zugabe von Kulturmedium erreicht. Dieser Zellsuspension wurden 2 % des serumfreien Supplements B27 (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugesetzt und jeweils 2 ml in eine Kulturschale plattiert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zur experimentellen Nutzung in einem Begasungs-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Anteil, 95 % Luftfeuchtigkeit.), wobei je nach Bedarf ein Mediumwechsel stattfand.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Kulturmediums

SUBSTANZ	HERSTELLER
500 ml <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA, Cölbe
2,5 ml Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe

6.2.3 *Messung intrazellulärer Kalzium-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$*

6.2.3.1 *Konfokalmikroskopische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in kortikalen Neuronen*

Für die Messung intrazellulärer Kalziumtransienten $[Ca^{2+}]_i$ kam ein inverses konfokales Laserscannmikroskop der Firma Carl Zeiss (LSM 5Pascal Axiovert 100M) zum Einsatz. Die Besonderheit der konfokalen Mikroskopie, die Eliminierung des Streulichtanteils durch den Einsatz von Lochblenden, erlaubt die Aufnahme besonders scharfer und hochauflösender Bilder. Als Lichtquelle zur Anregung dienten ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm und ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 450 bis 514 nm. Das von der Probe abgegebene Fluoreszenzlicht wird von einem Photomultiplier detektiert, digitalisiert und als Computerbild dargestellt. Zur Aufnahme und Bearbeitung der Bilder diente die Software PASCAL der Firma Zeiss. Um ein zusätzliches Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden sämtliche Experimente im abgedunkelten Raum durchgeführt.

Eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kortikalen Neuronen konnte mit Hilfe des fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 detektiert werden (Abb. 6 A). Nach Inkubation der Zellen mit dem Pentaacetoxy-Methylester (Fluo-4 AM; Invitrogen, Karlsruhe) gelangt die Verbindung in die Zellen und wird dort hydrolysiert. Die Hydrolyse verhindert einerseits das Wiederaustrreten des Farbstoffes und ist andererseits notwendig, damit er durch Bindung von Ca^{2+} zur Fluoreszenz befähigt wird. Fluo-4 zeigt nach Bindung an Ca^{2+} ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 516 nm (Abb. 6 B). Die Intensität der Emission ist abhängig von der Menge an gebundenem Kalzium und eignet sich daher als Indikator für intrazelluläre Kalziumkonzentrationen.

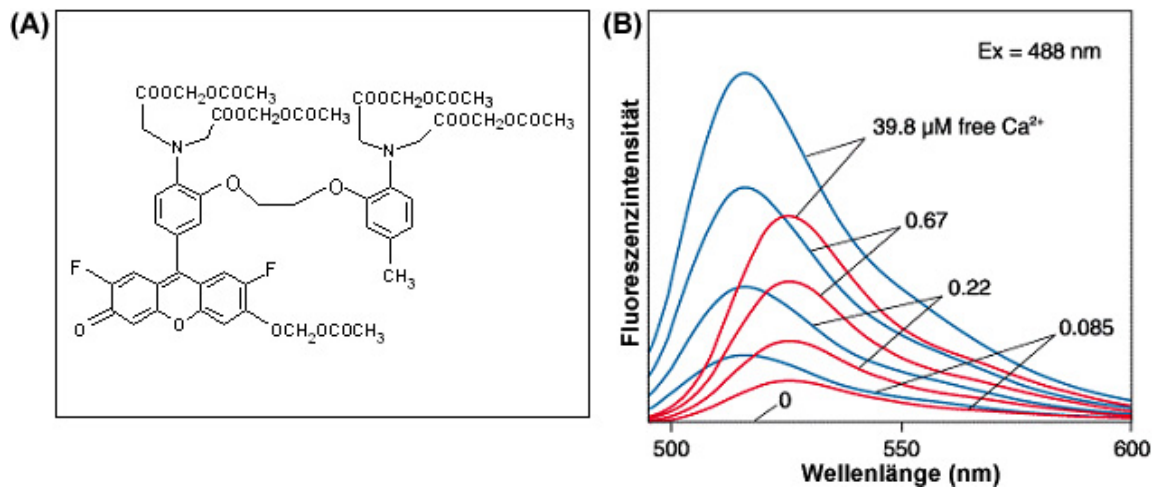


Abb. 6: (A) Strukturformel von Fluo-4 AM (aus: TEFLABS - *Product Specification and Analysis*¹). (B): Darstellung des Emissionsspektrums von Fluo-4 (blau) in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration (modifiziert nach: *The Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*²).

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 50 μg Fluo-4 AM in 45,6 μl DMSO plus 10 % Pluronsäure gelöst und in Aliquots (3 μl) bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach einer 45-minütigen Inkubation mit Fluo-4 AM (Endkonzentration: 2,5 μM in Medium) im Begasungs-Brutschrank ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden die mit kortikalen Zellen bewachsenen Deckgläschen in eine Stahlkammer (Attofluor, Molecular Probes, Leiden, Niederlande; Abb. 7) eingespannt und mit HEPES-Puffer (Tabelle 5) überschichtet. Anschließend erfolgten die Befestigung der Kammer auf einem beheizbaren Objektisch und der Anschluss des Pumpensystems (Fixierung von Zu- und Ablauf gegenüberliegend am oberen Rand der Stahlkammer). Alle Puffer, mit denen die Kulturen dem jeweiligen Stimulationsprotokoll entsprechend überspült wurden (ca. 1 ml/min), waren auf $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ vortemperiert.

¹ <http://www.teflabs.com/displayproduct/>

² <http://probes.invitrogen.com/handbook/>

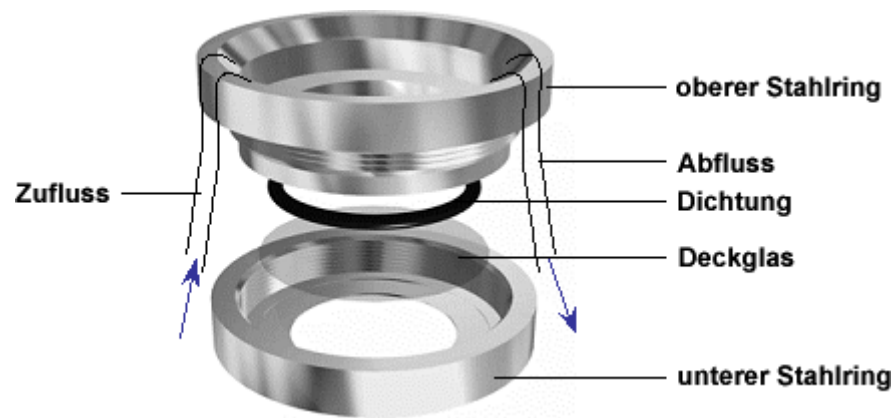


Abb. 7: Schematische Darstellung der Attofluor-Stahkkammer (modifiziert nach: *The Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*³) mit Zu- und Abfluss.

Unter Nutzung des Durchlichtes wurde bei 40-facher Vergrößerung ein Areal ausgewählt und von diesem mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm über einen Zeitraum von 2 min alle 10 s ein Fluoreszenzbild (Auflösung: 512x512 Pixel) aufgenommen (Langpassfilter von 505 nm). Die Laserstärke, der Durchmesser der Lochblende, die Sensitivität des Detektors und sonstige Einstellungen des Konfokalmikroskops wurden für alle Experimente konstant gehalten. Um die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den morphologisch und späterhin z.T. immunzytochemisch als Neuronen identifizierten Zellen zu ermitteln, erfolgte am Ende des Experiments eine Analyse der Pixelintensitäten in ausgewählten Bildbereichen (*Regions of interest*, ROIs) über den Somata der Zellen. Zur späteren Eliminierung unspezifischer Effekte wurde während der Messungen in einem Bildbereich, in dem weder Zellkörper noch Zellfasern vorhanden waren, ein Hintergrundsignal aufgenommen. Die quantitative Analyse erfolgte durch Subtraktion des Hintergrundsignals von allen erhaltenden Werten der einzelnen ROIs. Diese wurden anschließend gemittelt und als n=1 angegeben. Im Anschluss an die Kalziummessungen erfolgte stichprobenweise eine immunzytochemische Zelltypisierung (siehe 6.2.4).

³ <http://probes.invitrogen.com/handbook/>

Tabelle 5: Zusammensetzung des HEPES-Puffers*

SUBSTANZ	GEBRAUCHSKONZENTRATION	EINWAAGE PER 1 L
NaCl	140 mM	8,180 g
KCl	5 mM	0,387 g
CaCl ₂	2 mM	0,222 g
Glukose	10 mM	1,802 g
Hepes	10 mM	2,383 g

* pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen

6.2.3.2 Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in kortikalen Neuronen

Bei der ratiometrischen Messung lässt sich die Konzentration freier Kalziumionen (Ca^{2+}) im intrazellulärem Raum mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-PE3 messen, da das Absorptionsspektrum dieses Ca^{2+} -Chelators von der Bindung freier Ca^{2+} abhängig ist. Das Maximum des Absorptionsspektrums von Fura-PE 3 liegt für die kalziumgebundene Form bei $\lambda_1=340$ nm und für die kalziumfreie Form bei $\lambda_2=380$ nm. Die maximale Emission erfolgt in beiden Fällen bei $\lambda_E=510$ nm (Abb. 8 B). Gemessen werden somit die Fluoreszenzintensitäten, die bei Anregung mit den beiden Wellenlängen 340 und 380 nm emittiert werden. Dabei verhält sich der Quotient der Fluoreszenzintensitäten proportional zur Konzentration freier Ca^{2+} in der Zelle.

Fura-PE3 AM wird als lipophiler, nicht-fluoreszierender membranpermeabler Pentaacetoxy-Methylester (Fura-PE3 AM; Invitrogen, Karlsruhe; Abb. 8 A) in das Kulturmedium appliziert. Der Farbstoff gelangt in dieser Form durch die Zellmembran in das Zytosol, wo die Esterbindungen durch zelleigene Esterasen aufgespalten werden. Der nun polare Farbstoff ist in dieser Form membranimpermeabel und fluoreszent.

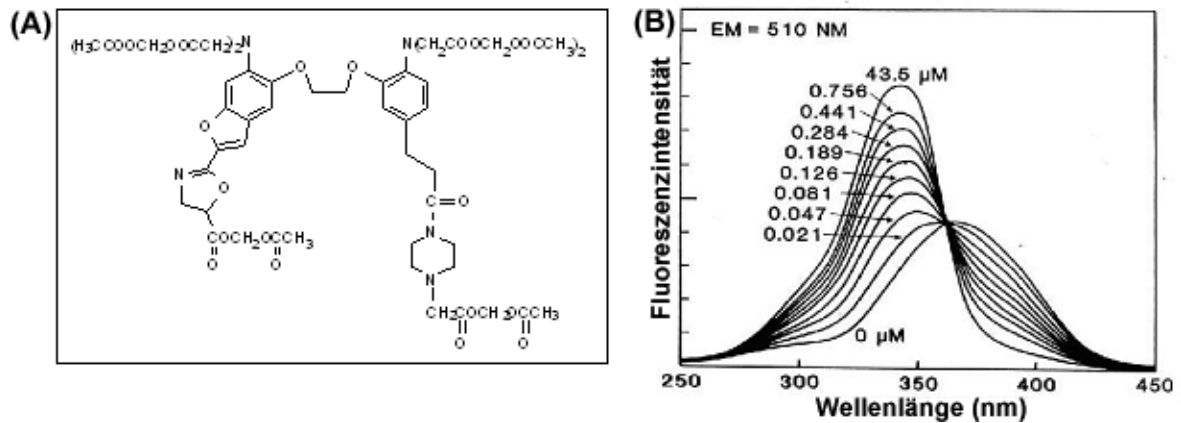


Abb. 8: Strukturformel (A) und Emissionsspektrum (B) von Fura-PE3 AM (modifiziert nach: *TEFLABS - Product Specification and Analysis*⁴).

Die Zugabe des Farbstoffes erfolgte während der Inkubation der kortikalen Kulturen für 60 min im Begasungs-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) mit Kulturmedium, das 5 μM Fura-PE3 AM (Stammlösung: 2,5 mM in DMSO plus 10 % Pluronsäure) enthielt. Die Detektion der Kalziumdynamik in Kortexzellen geschah mit einem VisiTron-Imaging-System (VisiTron-Systems GmbH, Puchheim). Die Zellen wurden durch einen Monochromator (A-1010B Visichrome High Speed Polychromator System) mit den Wellenlängen $\lambda_1=340$ nm und $\lambda_2=380$ nm angeregt. Die Messung der Fluoreszenzsignale fand mit einer gekühlten Spot-Insight-CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) statt. Die Steuerung des gesamten Systems sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MetaFluor (Version 5.0, Downingtown, PA, USA). Bei der Durchführung der Messungen wurde mit den entsprechenden Exzitationswellenlängen λ_1 und λ_2 alle 10 s ein Standbild aufgezeichnet. Auf dem ersten Bild erfolgte die Markierung der einzelnen ROIs, in denen die mittlere Fluoreszenzintensitäten (F_1 und F_2) für jedes Standbild der aufgenommenen Sequenz errechnet wurde. Jede ROI war so gewählt worden, dass es dem Soma einer zu untersuchenden Zelle entsprach. Dementsprechend wurde für jede gemessene Zelle der Quotient $R=F_1/F_2$ berechnet und über die Versuchszeit aufgetragen. Parallel erfolgte die Aufnahme eines Hintergrundsignals in einem Bildbereich ohne zelluläre Strukturen. Das Hintergrundsignal wurde von allen erhaltenen Werten der einzelnen ROIs abgezogen. Die ROIs einer jeweiligen Messung wurden gemittelt und als $n=1$ angegeben.

⁴ <http://www.teflabs.com/displayproduct/>

6.2.4 Immunzytochemische Analyse

Zur morphologischen Charakterisierung der kortikalen Kulturen kam die Immunzytochemie zum Einsatz. Entsprechende Kulturen wurden zunächst mit 4 %igem Formaldehyd (in 0,1 % NaP_i-Puffer, pH 7,4) für 20 min bei RT fixiert und anschließend durch dreimaliges Waschen mit einem Phosphatpuffer (PBS, Tabelle 6) von etwaigen Fixansrückständen befreit.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Phosphatpuffers* (PBS; 10 fach konzentriert)

SUBSTANZ	GEBRAUCHSKONZENTRATION	EINWAAGE PER 1000 ML
NaCl	1,37 M	80,000 g
KCl	27 mM	2,000 g
Na ₂ HPO ₄	100 mM	36,330 g
KH ₂ PO ₄	18 mM	2,400 g

* pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen schloss sich eine halbstündige Präinkubation mit PBS plus 10 % Eselnormalseum (ENS), 0,3 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumazid bei RT an. Die Inkubation mit den Erstantikörpern fand über Nacht bei 4 °C statt. Alle verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen und Antikörperinkubationslösungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS plus 0,3 % Triton X-100 folgte eine weitere Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % Rinderserumalbumin (*Bovines Serum Albumin*, BSA) in PBS plus 0,1 % Triton X-100 für 30 min bei RT. Anschließend wurde die Probe mit dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 4 h bei RT und unter abgedunkelten Verhältnissen inkubiert. Zum Abschluss erfolgten ein dreimaliges Waschen mit PBS und das Einbetten der Präparate mit Immumount (Thermo Elektron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) auf einem Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig). Die Präparate wurden bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 7: Für die immunzytochemische Analyse verwendete Erst- und Zweitantikörper und deren Verdünnung

ANTIKÖRPER	FIRMA	VERDÜNNUNG IN ANGEGEBENEM PUFFER
Goat-anti GFAP	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500 in PBS mit 10 % ENS, 0,3 % Triton-X-100 und 0,1 % Natriumazid
Mouse-anti SMI 311	Convance, Berkeley, USA	1:1000 in PBS mit 10 % ENS, 0,3 % Triton-X-100 und 0,1 % Natriumazid
Cy3 anti-goat	Dianova, Hamburg	1:1000 in PBS mit 0,1 % Triton-X-100 und 0,2 % BSA
Cy2 anti-mouse	Rockland, Gilbertsville, USA	1:1000 in PBS mit 0,1 % Triton-X-100 und 0,2 % BSA

6.2.5 Analyse der Zellvitalität/MTT-Assay

Die Vitalität von Zellen wurde mittels des MTT-Tests bestimmt. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide; Sigma, Steinheim) wird von lebenden Zellen aufgenommen und mit Hilfe von zytoplasmatischen Dehydrogenasen zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff reduziert.

Kortikale Zellen wurden in Zellkulturschalen bzw. 96-Well-Platten kultiviert und nach entsprechender Behandlung für eine Stunde mit 1 ml bzw. 200 µl MTT-Lösung (1 mg MTT in 1 ml PBS) im Begasungs-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach Abnahme der MTT-Lösung erfolgte das Solubilisieren der Farbkristalle durch Zugabe von 1 ml bzw. 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Intensität der Absorption bei 570 nm (UV/Vis Spektrophotometer PerkinElmer) gab Aufschluss über die Menge an zu Formazan umgesetzten MTT innerhalb der Zellen. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen (Kontrolle).

6.2.6 Schwellungsexperimente an isolierten Mitochondrien

6.2.6.1 Isolation von Lebermitochondrien aus der Ratte

Die Isolation von Lebermitochondrien erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kupsch *et al.* (2007). Mit Isofluran narkotisierten, männlichen Wistar-Ratten wurde die Leber entnommen und in eiskalter Saccharose-Lösung (0,25 M, pH 7,4 mit Tris) gewaschen, um eventuelle Blutrückstände zu entfernen. Nach grober Zerkleinerung des Gewebes erfolgte die Homogenisierung in ca. 35 ml EDTA-haltiger Saccharose-Lösung (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4 mit Tris eingestellt) in einem Potter-Gerät. Die erhaltende Suspensi-

on wurde zentrifugiert (800xg, 5 min, 4 °C), gefolgt von zwei weiteren Zentrifugationsschritten (5100xg, 4 min, 4 °C; 12300xg, 2 min, 4 °C). Die anschließende Resuspension des zuletzt erhaltenden Pellets erfolgte in einem Homogenisator mit ca. 2 ml EDTA-freier Saccharose-Lösung (0,25 M Saccharose, pH 7,4 mit Tris eingestellt). Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12300xg wurde das Pellet in 750 µl Saccharose-Lösung mit 0,5 mM EDTA gelöst.

Zur Quantifizierung der erhaltenen Mitochondrienmenge erfolgte eine Proteinbestimmung, in dem 10 µl der erhaltenen Suspension mit einer Lösung aus Biuret-Reagenz (750 µl; Tabelle 8), 3 %igem Desoxycholat (250 µl) und destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt wurde. Als Leerwert wurde eine proteinfreie Lösung eingesetzt und zur Kalibrierung ein BSA-Proteinstandard verwendet. Nach sorgfältiger Durchmischung der Proben und Schütteln für 4 min bei 96 °C im Thermomixer, erfolgte die spektrophotometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Biuret-Reagenz

SUBSTANZ	GEBRAUCHSKONZENTRATION
Na ⁺ -/K ⁺ -Tartat	21 mM
CuSO ₄	6 mM
NaOH	750 mM

6.2.6.2 Gewinnung von Hirnmitochondrien aus der Ratte

Männlichen Ratten wurde unter Isoflurannarkose das Gehirn entnommen und in eiskaltes Isolationsmedium A (Tabelle 9) überführt. Das Cerebellum sowie die Hirnhäute und Blutgefäße wurden entfernt und das Gehirn in kleine Stücke geschnitten. Alle Präparationschritte erfolgten auf Eis. Die Homogenisierung des Gewebes in Isolationsmedium A geschah per Hand in einem Potter-Gerät, gefolgt von einem dreiminütigen Zentrifugationsschritt (1300xg, 4 °C). Der Überstand wurde aufbewahrt, das Pellet in Isolationsmedium A resuspendiert und wiederholt, wie zuvor, zentrifugiert. Beide Überstände wurden zusammengefasst, bei 21200xg für 10 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in 15 %igem Percoll (gelöst in Isolationsmedium A) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf einen bereits vorbereiteten Percoll-Gradienten aus 2,5 ml 40 % Percoll und 3,5 ml 23 % Percoll gegeben und 10 min bei 31700xg und 4 °C zentrifugiert. Die sich an der unteren Grenzschicht befindlichen Mitochondrien wurden vorsichtig abpipettiert und 4-fach mit einer BSA-Lösung (10 mg/ml in Isolationsmedium A) verdünnt. Anschließend erfolgte

eine Zentrifugation (16700xg, 10 min, 4 °C) und das Resuspendieren des Pellets in Isolationsmedium A ohne BSA. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (6700xg, 10 min, 4 °C) wurde das entstandene Pellet in 100 µl Isolationsmedium B (Tabelle 9) aufgenommen.

Die Proteinbestimmung der erhaltenen Mitochondriensuspension erfolgte mittels des BCATM Protein Assay Kits von Pierce. Entsprechend der Anleitung wurden dazu 50 Teile der Reagenzlösung A mit einem Teil der Reagenzlösung B vermischt. Zu 500 µl dieser Mischung waren 50 µl der Probe hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert worden. Als Leerwert wurde wiederum eine proteinfreie Lösung eingesetzt. Zur Kalibrierung diente ein BSA-Proteinstandard. Anschließend erfolgte die spektrophotometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 546 nm.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Isolationsmedien A und B*

SUBSTANZ	GEBRAUCHS-KONZENTRATION ISOLATIONSMEDIUM A	GEBRAUCHS-KONZENTRATION ISOLATIONSMEDIUM B
Mannitol	225 mM	225,0 mM
Saccharose	75 mM	75,0 mM
MOPS	20 mM	20,0 mM
EGTA	1 mM	0,1 mM

* pH-Wert 7,4 mit Tris einstellen

6.2.6.3 Messung der Volumenzunahme an isolierten Leber- und Hirnmitochondrien

Um eine Änderung des Matrixvolumens der isolierten Mitochondrien zu verfolgen, wurde die Absorption der Mitochondriensuspension alle 100 ms über einen Zeitraum von 15 min in einem Spektrophotometer bei 540 nm aufgezeichnet. Eine Abnahme der Absorption ist ein Indiz für mitochondriale Schwellung.

Die Lebermitochondriensuspension wurde mit Hansson-Schwellungsmedium (Tabelle 10) plus 0,1 mM Phosphat auf 600-900 µg Protein pro ml je Ansatz eingestellt. Das Starten der Messungen erfolgte nach dem Erreichen einer stabilen Ausgangsabsorption (mindestens 5 min). Um das Schwellen der Mitochondrien durch eine Erhöhung der mitochondrialen Permeabilitätstransition zu induzieren, wurde eine Minute nach Beginn der Messung 25 µM Kalzium zugesetzt. Die zu testenden Pharmaka waren dem Schwellungsmedium bereits vor Zugabe der Mitochondrien zugegeben worden.

Schwellungsexperimente an Hirnmitochondrien erfolgten in Hansson-Medium mit 1 mM Phosphat. Die Menge an Mitochondrien war so zu justieren, dass der Ansatz 250 µg Protein pro ml enthielt. Eine Erhöhung der mitochondrialen Permeabilitätstransition wurde in Hirnmitochondrien durch Zugabe von 50 µM Kalzium induziert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Hansson-Schwellungsmedium*.

SUBSTANZ	GEBRAUCHSKONZENTRATION	EINWAAGE PER 1000 ML
KCl	125 mM	5,556 g
Tris	20 mM	3,152 g
MgCl ₂ *6 H ₂ O	1 mM	0,101 g
EGTA	1 µM	0,468 g
NaH ₂ PO ₄	700 µM	0,254 g
K ₂ HPO ₄	300 µM	0,040 g
Glutamat	5 mM	0,926 g
Malat	5 mM	0,811 g

* pH 7,2 mit Tris einstellen

6.2.7 Bestimmung antioxidativer Eigenschaften

6.2.7.1 Detektion intrazellulär entstehender, freier Radikale

Zur Detektion intrazellulär entstehender, freier Radikale wurden kortikale Zellen mit dem unpolaren Fluorogen Dihydro-Difluorfluorescein-Diacetat (H₂DFFDA; Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) beladen. Im Zytoplasma wird der Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen gespalten und kann in dieser Form nicht mehr aus der Zelle austreten. Die Oxidation durch freie Radikale modifiziert das Molekül so, dass es bei entsprechender Anregung fluoresziert.

Die Kulturen wurden für 60 min im Begasungs-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) mit 100 µM H₂DFFDA (Stammlösung 50 mM in DMSO) in Locke's Lösung (Tabelle: 11) inkubiert. Anschließend erfolgte der Einbau der mit einem Zellrasen bewachsenen Deckgläser in eine Attofluor-Stahlkammer (Abb. 7). Nach einem Waschschrift mit Locke's Lösung erfolgte die Montage in einem beheizbaren Objektisch auf dem Mikroskop. Sämtliche Einstellungen des konfokalen Fluoreszenzmikroskops sind für alle Experimente beibehalten worden. Über einen Zeitraum von 10 min wurde alle 10 s jeweils ein Fluoreszenzbild (Anregung bei 488 nm, Emission mit Breitbandfilter 530-600 nm) sowie ein Durchlichtbild aufgenommen und anschließend quantitativ analysiert. Dazu wurden mit Hilfe von ROIs die Intensitätswerte jeder Zelle bestimmt (vgl. 6.2.3.1).

Tabelle: 11: Zusammensetzung der Locke's Lösung*:

SUBSTANZ	GEBRAUCHSKONZENTRATION	EINWAAGE PER 500 ML
NaCl	154 mM	4,504 g
KCl	5,6 mM	0,208 g
CaCl ₂	2,3 mM	0,169 g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1 mM	0,101 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,151 g
HEPES	15 mM	1,787 g
Glukose	10 mM	0,901 g

* pH 7,3 mit 1 M NaOH einstellen

6.2.7.2 DPPH-Assay

Um Radikalfängereigenschaften zu testen, wurde die sogenannte DPPH-Methode benutzt. Sie beruht darauf, dass das intensiv violettfarbene, stabile Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; Fluka, Steinheim) durch die Reaktion mit Antioxidantien entfärbt wird. Die jeweilige Testkomponente wurde zu 2 ml DPPH-Lösung (100 µM in Methanol) hinzugegeben und für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend war die Absorptionsmessung bei 516 nm an einem Perkin-Elmer UV Spektrophotometer durchzuführen. Die Effektivität herkömmlicher Radikalfänger wie Ascorbinsäure wurde als Vergleichssubstanz verwendet.

6.2.8 Auswertung und statistische Analyse der Daten

Zur statistischen Analyse der Daten wurden das Programm GraphPad Prism (Version 3.02) und das Programm SPSS (Version 15.0) verwendet. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen galten als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$. Dafür wurden folgende Symbole benutzt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.2.8.1 Kalzium- / DCF-Imaging

Die Fluoreszenzwerte jeder Messung wurden mittels der PASCAL-Software des LSM bzw. der MetaFluor-Software des VisitronSystems analysiert. Zunächst war der Mittelwert der Intensitätswerte pro Zeitpunkt über alle Zellen einer Zellkultur zu bilden. Anschließend wurde der niedrigste ermittelte Wert pro ROI der analysierten Zellen auf 0, der höchste gemessene Wert auf 100 normiert. Alle anderen Fluoreszenzintensitäten werden als relative Veränderungen zwischen diesen Werten ausgedrückt. Für jede Behandlungsgruppe bil-

den die berechneten Mittelwerte aus unabhängigen Messungen (Präparationen) die Veränderung der normalisierten Fluoreszenz über die Zeit hinweg ab, graphisch dargestellt (Mittelwerte der einzelnen Fluoreszenzintensitäten \pm Standardfehler) mit Hilfe von GraphPad Prism.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurden die letzten fünf Intensitätswerte der Auswaschphase pro Behandlungsgruppe gemittelt, einer *one-way* ANOVA und anschließend einem Dunnett T3-Posttest unterzogen.

6.2.8.2 Schwellungsexperimente

Der erste ermittelte Absorptionwert der Mitochondriensuspension wurde auf 100 normiert und alle weiteren Werte als Veränderungen relativ zu diesem Basalwert ausgedrückt. Für jede Behandlungsgruppe und für jeden Zeitpunkt ist der Mittelwert der relativen Absorptionen von mindestens 3 unabhängigen Präparationen berechnet und als Mittelwert \pm Standardfehler graphisch dargestellt worden. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurde mittels *one-way* ANOVA überprüft.

6.2.8.3 MTT-Assay

Von den 6 Messdaten pro Rotenon-Konzentration wurde jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler gebildet. Die unbehandelten Zellkulturen (Kontrollen) wurden auf 100 % Vitalität normiert. Aus dem Verhältnis zwischen den Absorptionswerten der mit Rotenon inkubierten Zellkulturen und des Kontrollansatzes ohne Rotenon ist die relative Vitalität der Zellen errechnet worden. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen wurde eine *one-way* ANOVA angewendet.

7 ERGEBNISSE

7.1 Funktionelle Charakterisierung des Zellkulturmodells

Um kortikale Neuronenkulturen mittels der Kalzium-*Imaging* Technik auf ihre Antwortbereitschaft gegenüber Glutamat und NMDA zu charakterisieren, wurde die Fluoreszenzintensität von Kalziumindikatorfarbstoffen über einen Zeitraum von mehreren Minuten gemessen.

Anhand von Fura-PE3-beladenen Kulturen erfolgte die Testung verschiedener NMDA- und Glutamatkonzentrationen (50, 100, 200 und 400 μM) um einen optimalen Stimulus zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation vom Alter der primär kultivierten kortikalen Neuronenkulturen abhängt (Abb. 9).

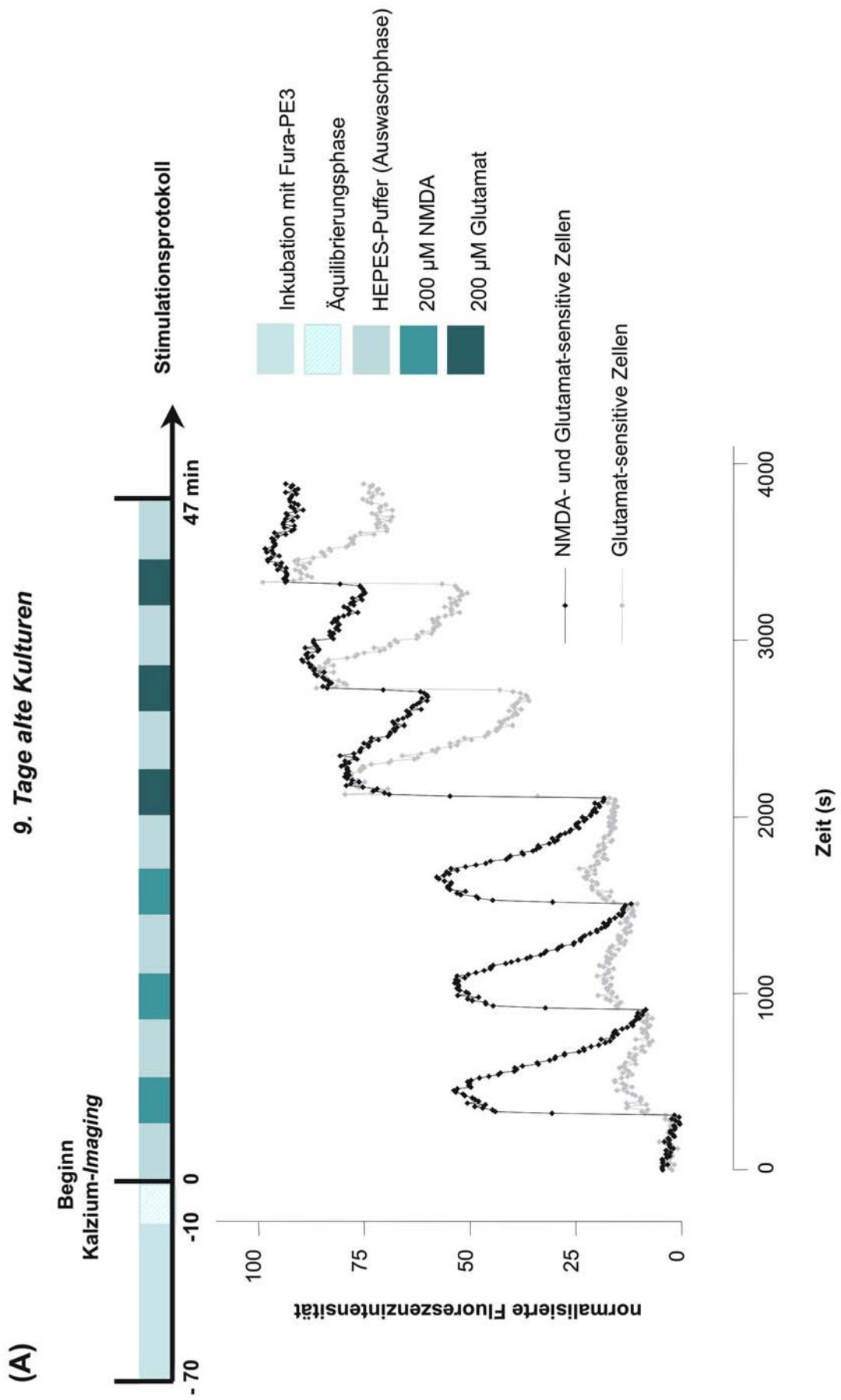
Die Basalwerte vor der Stimulation blieben in einer sogenannten Äquilibrationsphase über einen Zeitraum von etwa 10 min stabil. Die Stimulation mit 200 μM NMDA führt in einigen Zellen der 9 Tage alten Kulturen zu einem rapiden Anstieg der gemittelten Fluoreszenzintensität um circa 50 % (Abb. 9 A), die mit Beginn des Auswaschens des NMDA mehr als 300 s benötigten, um auf die auf 0 normierte Basislinie zurückzukehren. Die Stimulation wurde zweimal wiederholt, worauf die Zellen erneut mit Fluoreszenzerhöhungen um etwa 50 % reagierten, allerdings erreichten sie die Basiswerte nach jeweiligem Auswaschen des NMDA nicht wieder vollkommen. Eine anschließende dreimalige Stimulation mit Glutamat verstärkte die veränderte Kalziumdynamik noch. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen, die zuvor nicht auf NMDA reagierten, bei einer Stimulation mit 200 μM Glutamat nun doch mit einem Fluoreszenzanstieg antworteten. Die Applikation von 200 μM Glutamat führte in NMDA-sensitiven Zellen zu einer Fluoreszenzerhöhung um 80 %, eine zweite und dritte Stimulation sogar zu Werten um 85 und 100 %. Beim Auswaschen der Stimuli verblieb die Fluoreszenzintensität schließlich nahezu auf dem Anregungsniveau (Kalzium-Deregulation).

Die zweite Zellpopulation reagierte auf eine Stimulation mit 200 μM Glutamat ebenfalls mit einer schnellen Fluoreszenzerhöhung, deren maximaler Wert sich von dem der NMDA-sensitiven Zellen nicht wesentlich unterschied. Jedoch sank das Fluoreszenzsignal nach Auswaschung des Glutamats schneller, blieb aber gegenüber der Basislinie um etwa 80 % erhöht.

Wurde dieses Stimulationsprotokoll auf kortikale Zellen 13 Tage alter Zellkulturen (13. DIV) angewendet, so führte eine dreimalige Stimulation mit 200 μM NMDA zu einer maximalen Fluoreszenzerhöhung um bis zu 75 % (Abb. 9 B), die sich selbst bei Zunahme der

NMDA-Konzentration auf 400 μM nicht weiter potenzieren ließ (Daten nicht gezeigt). Zudem erreichten die Signale nach Beendigung des jeweiligen Stimulus innerhalb von 300 s den Basalwert nahezu vollständig. Eine anschließende Stimulation mit 200 μM Glutamat führte in NMDA-sensitiven wie auch in ausschließlich auf Glutamat reagierenden Zellen zu einem rapiden Anstieg der Fluoreszenzintensität, wobei sich jedoch in beiden Zellpopulationen die Fluoreszenzsignale nach Auswaschung zunehmend vom Basalwert entfernten. Selbst bei einer Glutamatkonzentration von 50 μM verblieb die Fluoreszenzintensität weit oberhalb des Basalwertes.

Aus den hier vorgestellten Beobachtungen wurde bei nachfolgenden Experimenten als Stimulation NMDA in einer Konzentration von 200 μM verwendet. Der Anteil derjenigen Zellen, die auf eine NMDA-Stimulation mit maximaler Fluoreszenzerhöhung und stabilen, gut reproduzierbaren Kalziumtransienten antworteten, war beim Einsatz von 200 μM NMDA am höchsten.



(B)

13. Tage alte Kulturen

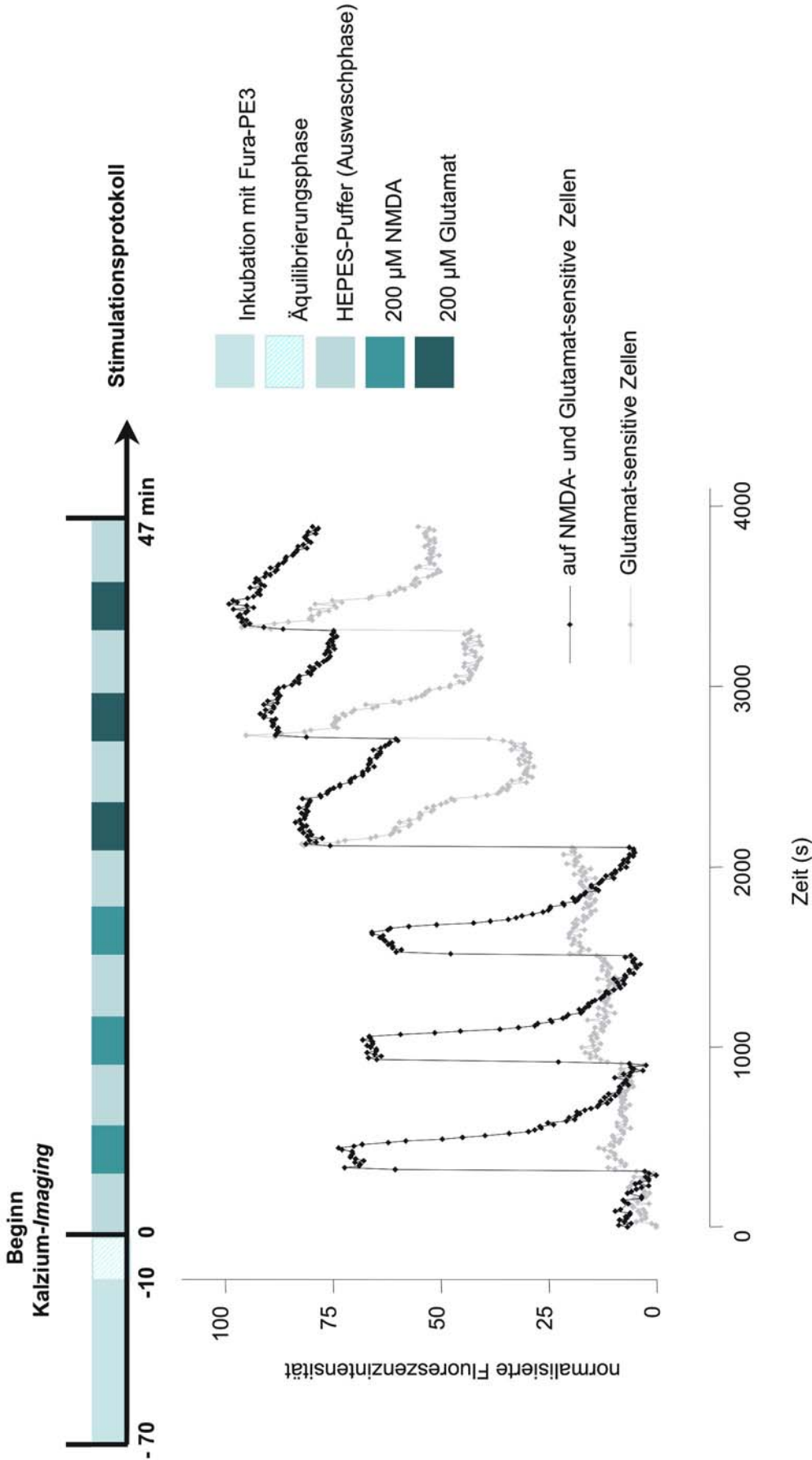


Abb. 9: NMDA- und Glutamat-induzierte Kalziumtransienten in 9 (**A**) und 13 Tage (**B**) alten kortikalen Neuronen. Die Kurven zeigen für jeden einzelnen Messpunkt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von Zellen zweier Schwesterkulturen, die auf NMDA und Glutamat oder auf Glutamat allein reagieren. Mit der Zeit kehren die Fura-PE3-Fluoreszenzsignale der auf NMDA und Glutamat reagierenden Zellen als auch der NMDA-sensitiven Zellen junger Kulturen (**A**) nach Stimulation nicht auf den Basalwert zurück, besonders deutlich bei Glutamat-Stimulation. (**B**): NMDA-sensitive Neuronen zeigten wiederholt einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, welche nach jeder Auswaschphase wieder den Basalwert erreichte. Eine Glutamatstimulation bewirkt jedoch eine Kalzium-Deregulation, welche die Rückkehr des Fluoreszenzsignals auf den Basalwert zunehmend verhindert.

7.1.1 *Morphologische Charakterisierung des Zellkulturmodells*

Eine Kontamination mit Gliazellen, wie sie trotz Verwendung serumfreien Mediums immer wieder auftrat, beeinträchtigte die Verwendbarkeit der Neuronenkulturen. In Abb. 10 sind Kalziummessungen von Zellen aus einer Mischkultur und einer Kultur mit einem hohen Neuronenanteil („Reinkultur“) repräsentativ dargestellt. Eine nachträgliche immunzytochemische Analyse verdeutlicht die Verteilung von Neuronen und Astrogliazellen in den entsprechenden Kulturen.

Trotz nachweislich vorhandener Neuronen (nachfolgende Immunzytochemie) zeigten diese auf NMDA-Stimulation nahezu kein Fluoreszenzsignal (Abb. 10 C). Aufgrund derartiger Probleme und insgesamt unbefriedigender Ergebnisse bei den *Imaging*-Experimenten mit Mischkulturen, wurden in den nachfolgenden Experimenten nur solche Kulturen verwendet, die einen hohen Anteil an Neuronen aufwiesen.

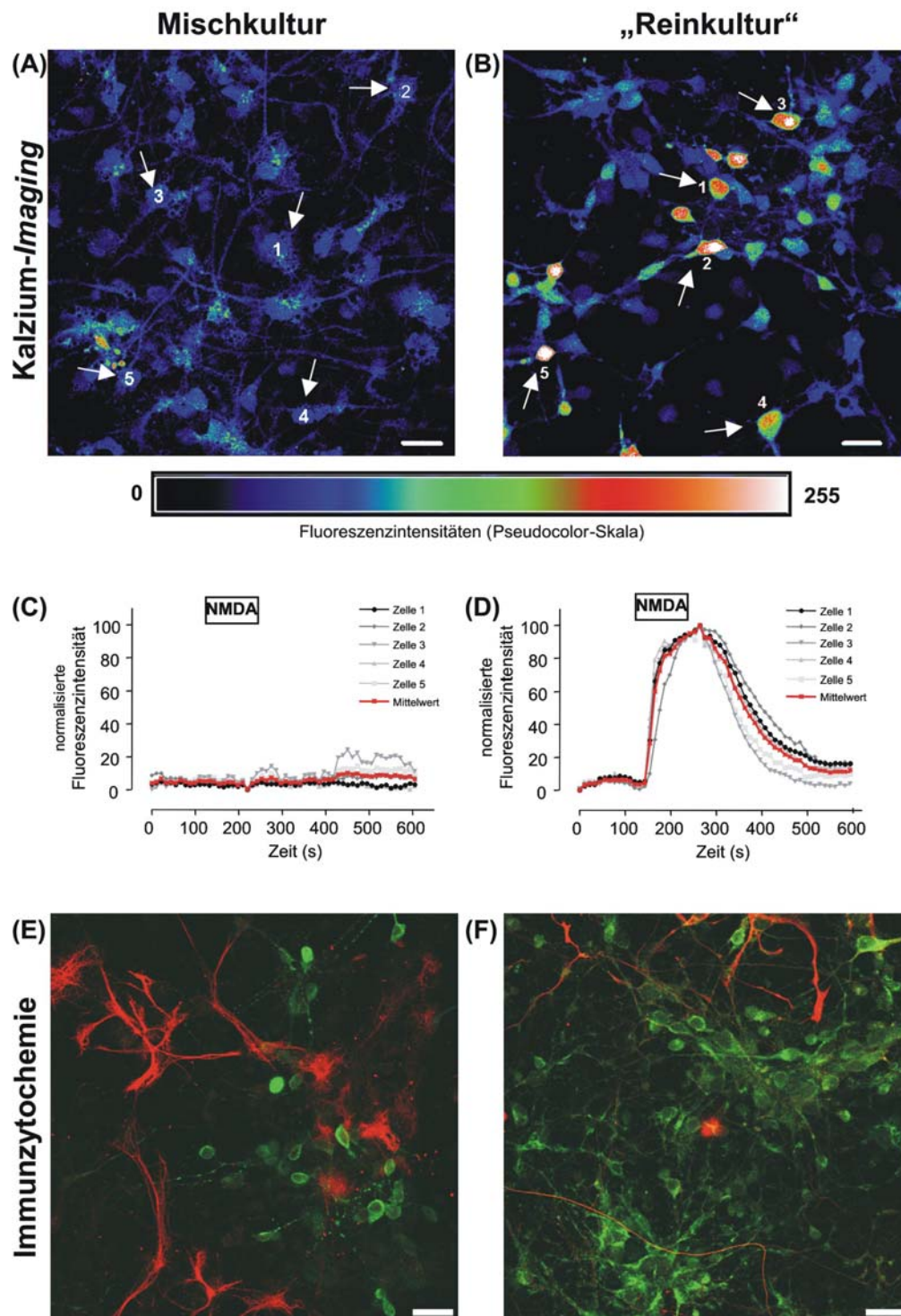


Abb. 10: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und nachträgliche immunzytochemische Analyse von 13 Tage alten Kulturen aus Kortexgewebe der Ratte (E16): links hoher Anteil an Gliazellen (Mischkultur), rechts vorwiegend Neuronen („Reinkultur“). In **(A)** und **(B)** sind konfokale Bilder einer Kalziummessung nach Stimulation mit $200 \mu\text{M}$ NMDA (zum Zeitpunkt $t=250 \text{ s}$) für eine Misch- und eine Reinkultur abgebildet. Die Fluoreszenzwerte ausgewählter mit Fluo-4 beladener Zellen (Zelle 1-5) sind in **(C)** und **(D)** graphisch dargestellt. Die konfokalen Bilder der nachträglich einer immunzytochemischen Färbung (anti-SMI311 in grün; anti-GFAP in rot) unterzogenen Kulturen in **(E)** und **(F)** verdeutlichen den Gehalt und die Verteilung von Neuronen und Astrogliazellen. Skala = $20 \mu\text{M}$

7.1.2 Schädigung der Neuronenkulturen mit Rotenon

Die bei der Zielstellung der Arbeit (1.4) formulierte Aufgabe, Neuronen mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon modellhaft zu schädigen, setzte voraus, diejenige Rotenonkonzentration zu finden, die die Zellen in ihrer respiratorischen Aktivität zwar einschränkt, aber die Absterberate dennoch möglichst gering hält. Als Testmethode wurde der MTT-Assay verwendet.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der metabolischen Reduktion von MTT zum entsprechendem Formazan zwischen der Kontrollgruppe und den für 24 h mit den Rotenonkonzentrationen 100 pM, 500 pM und 1 nM inkubierten Zellkulturen beobachtet werden. So ergab 100 pM Rotenon ca. 88 %, 1 nM Rotenon ca. 75% Abweichung gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 11). Erst bei höheren Rotenon-Konzentrationen wurde die Abweichung statistisch signifikant. Fünf nM ergaben eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion des MTT-Metabolismus auf ca. 58 % und bei 10 nM Rotenon eine hochsignifikante Abnahme ($p < 0,01$) auf 47 % der Kontrollgruppe. Eine Konzentration von 10 nM Rotenon wurde als Standard für die nachfolgenden *Imaging*-Experimente festgelegt.

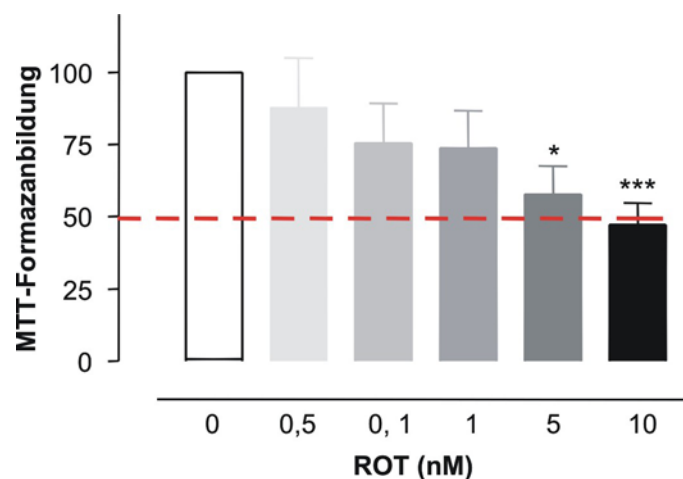


Abb. 11: MTT-Formazanbildung in Kulturen Rotenon-belasteter Zellen. Dreizehn Tage alte kortikale Zellkulturen wurden für 24 h mit Rotenon inkubiert und einem MTT-Assay unterzogen. Nach Extraktion des durch Reduktion gebildeten Formazan mittels DMSO (6.2.4) erfolgte die Absorptionsmessung bei 570 nm. Der Wert für die Kontrollgruppe (unbehandelte Kulturen) wurde gleich 100 gesetzt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte±Standardfehler (n=6; für 500 pM n 4; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle).

Öffnet sich die mtPTP, so strömt das in den Mitochondrien vorhandene Kalzium in das Zytosol und im Kalzium-*Imaging* sollte somit eine verzögerte bzw. ausbleibende Rückkehr des Fluoreszenzsignals zur Basislinie zu sehen sein. Im Kontrollversuch verursachen die drei aufeinanderfolgenden NMDA-Stimulationen einen jeweils ähnlich hohen Anstieg der

Fluoreszenzintensität in jeder einzelnen Zellkultur, die nach dem Auswaschen des NMDA wieder zu dem auf 0 normierten Basalwert zurückkehrte. Wenn auf eine Stimulation mit NMDA verzichtet wurde, zeigte sich, dass die Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzintensität sowohl in einer unbehandelten als auch in einer während des *Imagings* mit Rotenon behandelten, Fura PE3-beladenen Zellkultur beim *Imaging* der Fluoreszenz ebenfalls nahezu konstant blieb. Eine Stimulation mit 200 μM NMDA bewirkte in 9 Tage alten Zellkulturen, die 30 min vor Beginn des Experiments mit 10 nM Rotenon inkubiert wurden, einen ähnlichen Anstieg der Fura-PE3 Fluoreszenz wie auch in der unbehandelten Kontrollgruppe. Das Fluoreszenzsignal erreichte nach Auswaschen des NMDAs wieder den Basalwert (Abb. 12).

Hingegen verursachte eine simultane Behandlung der Zellkulturen mit 10 nM Rotenon und 200 μM NMDA bei 13 Tage alten Kulturen (Abb. 13) einen Fluoreszenzanstieg, der nach den einzelnen NMDA-Stimulationen den Basalwert nicht wieder erreichte, da am Ende des *Imagings* zum Zeitpunkt 1400 s ein Wert von $60,25 \pm 6,74$ % zu messen war. Die Fluoreszenzintensität blieb auf diesem Plateau ziemlich konstant, wobei jedoch ein leichter Abfall zwischen der ersten und zweiten Stimulation mit NMDA zu beobachten war.

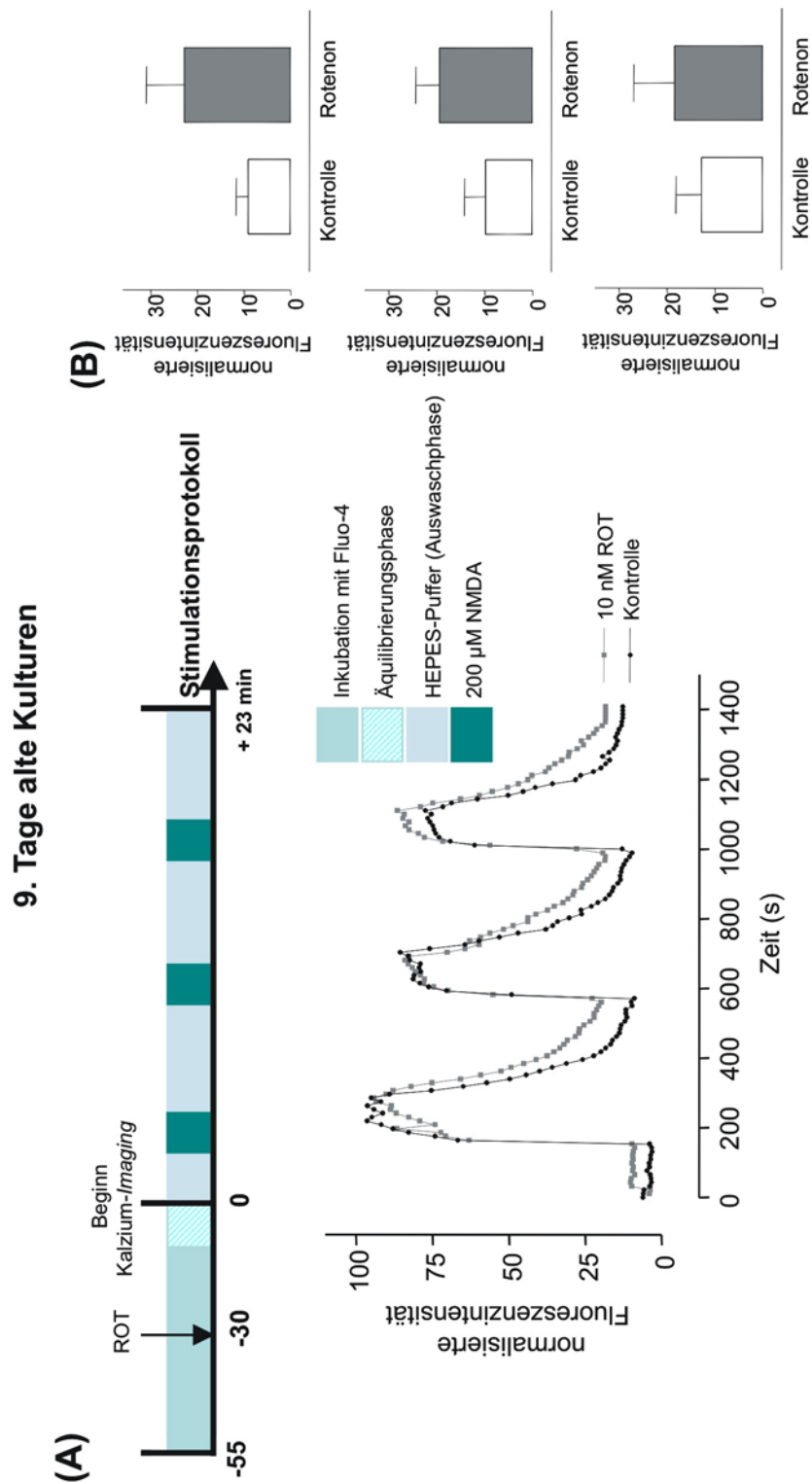


Abb. 12: Graphisch dargestellte NMDA-induzierte Fura-PE3-Fluoreszenzveränderungen unterschiedlicher Behandlungsgruppen (Kontrolle, 10 nM ROT) in 9 Tage alten Kortexkulturen. **(A):** Die Kurven stellen die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Zellen innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe für jeden einzelnen Messpunkt dar. Neuronen der Kontrollgruppe zeigten während jeder NMDA-Stimulation einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, die während der Auswaschphase mit HEPES-Puffer jeweils wieder auf den Basalwert zurückging. Eine simultane Behandlung mit 10 nM Rotenon (ROT) führte zu keiner Veränderung des Fluoreszenzsignals. Die Fluoreszenzintensitätswerte nach Ende der jeweiligen Auswaschphase sind in **(B)**, **(C)** und **(D)** dargestellt. Die Daten wurden normalisiert und als Mittelwerte±Standardfehler (n=3 Zellkulturen pro Behandlungs-Gruppe am 9. DIV) ausgedrückt.

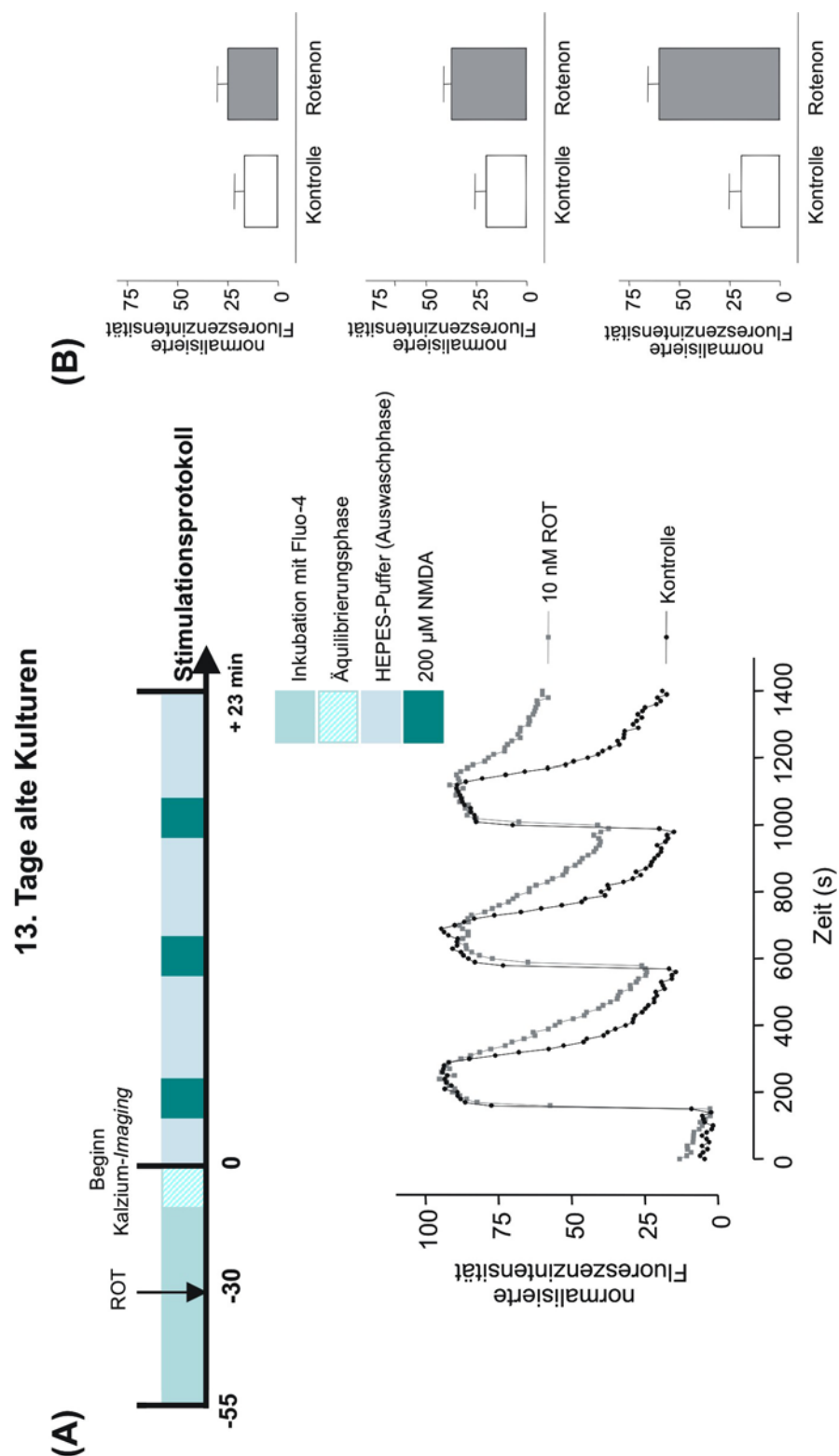


Abb. 13: Graphisch dargestellte NMDA-induzierte Fura-PE3-Fluoreszenzveränderungen der Kontroll- und Rotenon-Behandlungsgruppe in 13 Tage alten Kortexkulturen. **(A):** Die Kurven demonstrieren die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Zellen innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe für jeden einzelnen Messpunkt. Neuronen der Kontrollgruppe zeigten während jeder NMDA-Stimulation einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, die nach Auswaschen des NMDAs jeweils wieder den Basalwert erreichte. Wurden die Neuronen während des Fura-PE3-Imagings simultan mit 10 nM Rotenon (ROT) superfundiert, verblieb der NMDA-induzierte Fluoreszenzanstieg auf einem erhöhten Plateau: Die Fluoreszenzintensität erreichte nach dem Auswaschen des NMDAs nicht wieder den Basalwert. In **(B)**, **(C)** und **(D)** sind die Fluoreszenzin-

tensitätswerte nach der jeweiligen Auswaschphase graphisch aufgetragen. Die Daten wurden normalisiert und als Mittelwerte±Standardfehler (n=3 Zellkulturen pro Behandlungsgruppe) ausgedrückt.

7.1.3 Rolle der mtPTP bei einer Rotenon-verursachten Schädigung

Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem „klassischen“ mtPTP-Blocker Cyclosporin A (CsA) während der Rotenon/NMDA-Simultanbehandlung sollte Aufschluss über die Beteiligung der mtPTP als einen vermittelnden Mechanismus der Rotenon-Wirkung auf den NMDA-induzierten intrazellulären Kalziumanstieg geben.

Zellen, die zusätzlich zur Applikation von 10 nM Rotenon und 200 µM NMDA mit CsA (2 µM) 30 min vor Beginn des Experiments behandelt wurden, wiesen - wie die Kontrollgruppe bzw. wie die Rotenon-Behandlungsgruppe - einen raschen und hohen Anstieg der Fluoreszenz auf. Jedoch verblieb bei 13 Tage alten Kulturen die erhöhte Fluoreszenz nach dem Auswaschen nicht auf einem erhöhtem Plateau, wie es bei der Rotenonbehandlung ohne CsA der Fall war, sondern sank nach jeder NMDA-Stimulation stärker ab und verblieb nach 1400 s auf einem Wert von 37,87±14,89 % (Abb. 14).

7.1.4 Effekt von Minozyklin auf die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation

Daraufhin war zu klären, welchen Effekt das Tetrazyklin-Derivat Minozyklin auf die Rotenon-induzierte Permeabilitätstransition ausübt.

Dazu wurden wiederum 13 Tage alte Kulturen primär kultivierter kortikaler Neuronen 30 min vor Beginn des Experiments simultan mit 10 nM Rotenon und 100 µM Minozyklin vorbehandelt. Das Fluo-4-*Imaging* zeigte, dass die gleichzeitige Behandlung von Zellkulturen mit Rotenon/Minozyklin und NMDA zu einem ähnlich raschen und hohen Anstieg der Fluoreszenz führte, wie die NMDA-Stimulation der zuvor untersuchten Behandlungsgruppen. Dabei zeigte sich, dass sich bei den verwendeten Konzentrationen Minozyklin gegenüber CsA in Bezug auf die Rückkehr zur Basislinie als effektiver erwies, indem sich nach dreimaliger Stimulation mit 200 µM NMDA der Grad der Kalzium-Deregulation stärker verminderte (Abb. 14). Das Fluoreszenzsignal der Rotenonbehandlungsgruppe nahm nach jeder Auswaschphase stetig zu, erreichte bereits nach der zweiten Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung auf 51,45±2,68 % ($p<0,01$) und endete nach 1400 s bei 61,81±5,61 %. Die simultane Applikation von 2 µM CsA verringerte diesen Fluoreszenzanstieg um 15,9 % (auf 45,91±12,83 %) und unterschied sich damit nicht signifikant von der Rotenonbehandlungsgruppe. Minozyklin dagegen bewirkte

eine signifikante Fluoreszenzabsenkung und erreichte in der dritten Auswaschphase anders als CsA einen signifikanten protektiven Effekt (etwa 26 % ($p < 0,05$; auf $36,44 \pm 5,02$ %) im Vergleich zu alleiniger Gabe von Rotenon)).

In

Abb. 15 sind konfokalmikroskopische Bilder der verschiedenen Behandlungsgruppen zu Beginn des Kalzium-*Imaging*-Experiments (0 s), während des ersten Kalziumtransienten (200 s) und nach Auswaschen des letzten NMDA-Stimulus (1400 s) dargestellt. Die Aufnahmen zeigen die Kalzium-Deregulation in Rotenon-behandelten Zellen und verdeutlichen den protektiven Effekt von CsA und Minozyklin. Die nachstehende immunzytochemische Analyse hebt die neuronale Morphologie der einzelnen Kulturen hervor.

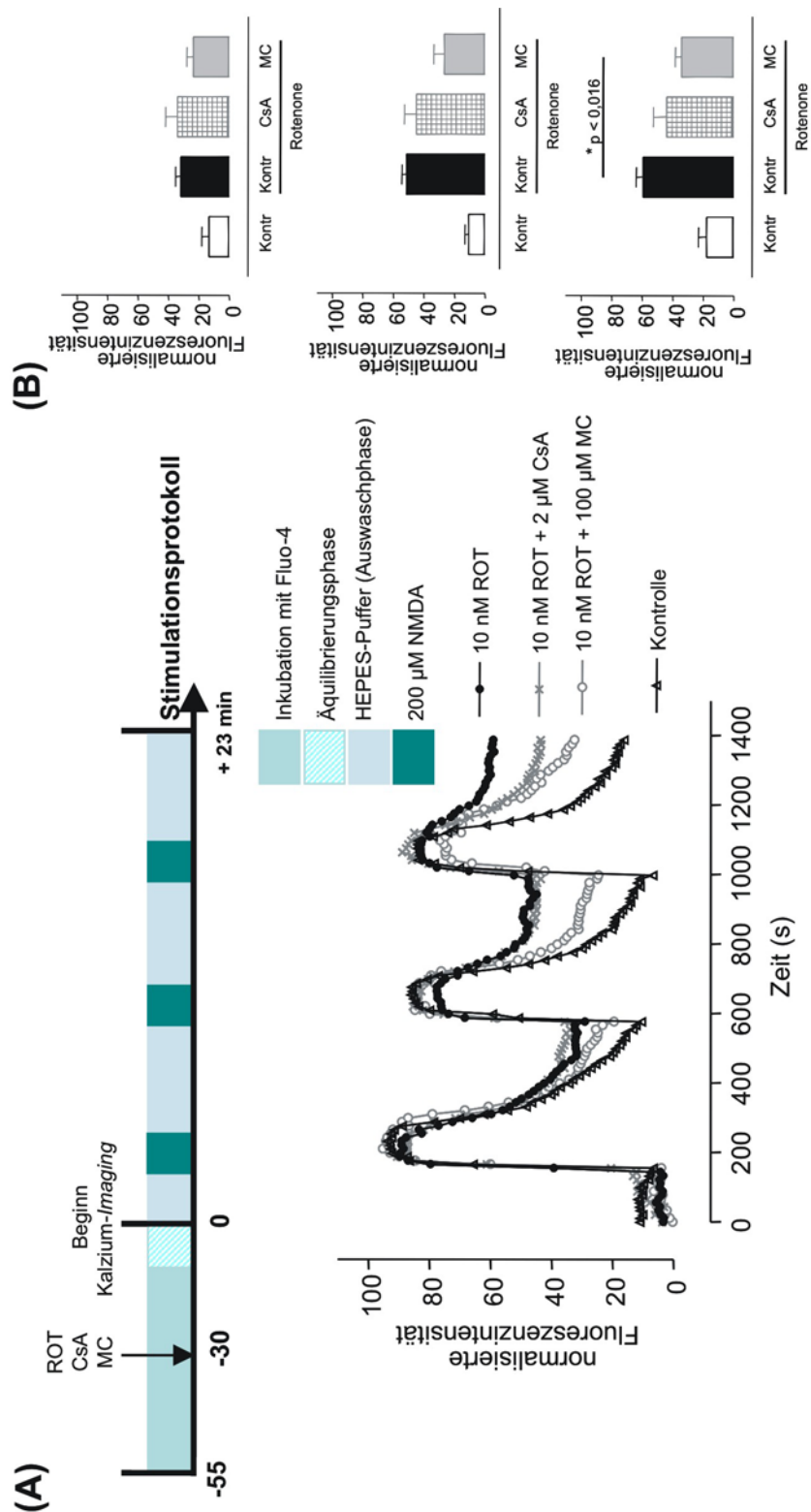


Abb. 14: NMDA-induzierte Kalziumtransienten in unterschiedlich behandelten 13 Tage alten Kortexkulturen. (A): Die Kurven zeigen die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Behandlungsgruppe für jeden einzelnen Messpunkt (auf Standardabweichungen wurde aufgrund der Übersichtlichkeit verzichtet). Rotenon-behandelte Zellen (ROT) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine veränderte Kalziumdynamik, indem die Fluoreszenzintensität nach Auswaschen des NMDA nicht wieder den Basalwert erreichte. Die simultane Gabe von 2 µM Cyclosporin A (CsA) verringerte zwar die Kalzium-Deregulation, allerdings in einem geringeren Maße als bei Gabe von Minozyklin (MC). Bei MC-Gabe näherte sich die Fluoreszenz-

tensität nach dem Auswaschen des NMDAs weitestgehend dem Basalwert an. Die Daten wurden normalisiert und als Mittelwerte±Standardfehler (n=5 Zellkulturen pro Behandlungs-Gruppe) ausgedrückt. **(B)**: Statistische Analyse der Kurven. Die letzten fünf Werte der Auswaschphase wurden für jede Behandlungsgruppe gemittelt und graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass es in der Auswaschphase der Rotenonbehandlungsgruppe zu einer signifikanten ($p < 0,016$) Fluoreszenzerhöhung gegenüber der Basislinie kommt. Durch Applikation von CsA konnte der Rotenon-Effekt nicht signifikant abgeschwächt werden. Dagegen verhinderte Minozyklin die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation deutlicher, ein Effekt, der mit der dritten Auswaschphase statistische Signifikanz erreichte.

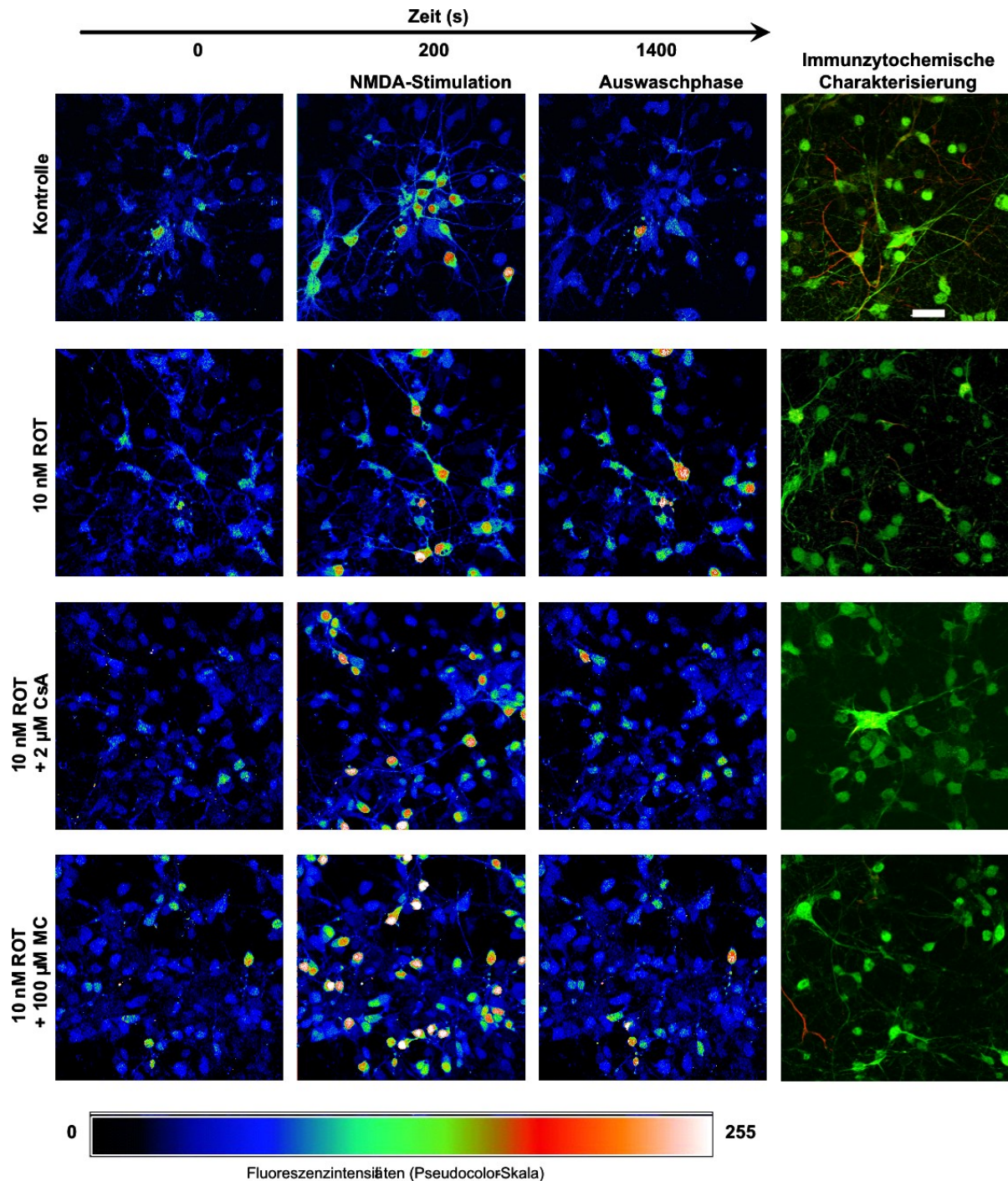


Abb. 15: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Kalziummessungen 13 Tage alter kortikaler Neurone unterschiedlicher Behandlungsgruppen. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitätswerte zu Beginn der Messung ohne NMDA-Stimulation (0 s), während der Stimulation mit 200 μ M NMDA (200 s) und nach der letzten Auswaschphase (1400 s). Die drei Teilbilder (horizontal) einer jeweiligen Behandlungsgruppe geben identische Gesichtsfelder wieder. Die immunzytochemische Analyse zeigt die vorwiegend neuronale Population (anti-SMI311=grün) der Kulturen und das einzelne Auftreten von Astrogliazellen (anti-GFAP=rot). Skala=20 μ M

7.2 Untersuchung der mitochondrialen Schwellung

Im Folgenden wurde der Einfluss von Rotenon auf den Öffnungszustand der mtPTP direkt an isolierten Mitochondrien untersucht. Die Öffnung der mtPTP resultiert in einem Anschwellen der Mitochondrien, da der kolloidosmotische Druck der Matrixproteine zu einem Wassereinstrom in die Mitochondrien führt. Diese Volumenzunahme kann durch Absorptionsmessungen in einem Spektrophotometer bestimmt werden.

7.2.1 Einfluss von Rotenon auf isolierte Hirnmitochondrien

Die Untersuchung einer Suspension von Hirnmitochondrien im kalziumfreien Medium zeigte über einen Zeitraum von 10 Minuten nur eine geringfügige Abnahme der Absorption. Auch unter Zugabe verschiedener Rotenonkonzentrationen (10 und 50 nM) konnte keine Absorptionsabnahme detektiert werden. Wurden dem Medium 2 min nach dem Start der Messung Kalziumionen zugegeben (Endkonzentration 50 μ M), induzierte dieser Stimulus eine Verringerung der Absorption auf $90,2 \pm 1,5$ % (Abb. 16 A). Bei Zugabe von 10 nM Rotenon verringerte sich die Absorption auf $87,55 \pm 3,04$ %. Die Applikation von 50 nM Rotenon verstärkte die Absorptionsabnahme nur geringfügig ($85,85 \pm 1,91$ %; Abb. 16 B).

Da neurale Mitochondrien in Abhängigkeit von Areal und Zelltyp, dem sie entstammen, in Hinblick auf Sensitivität gegenüber mtPTP-induzierenden Faktoren sehr heterogen sind, wurden zum Vergleich Mitochondrien aus Lebergewebe untersucht, die sich durch eine ausgeprägte Homogenität auszeichnen.

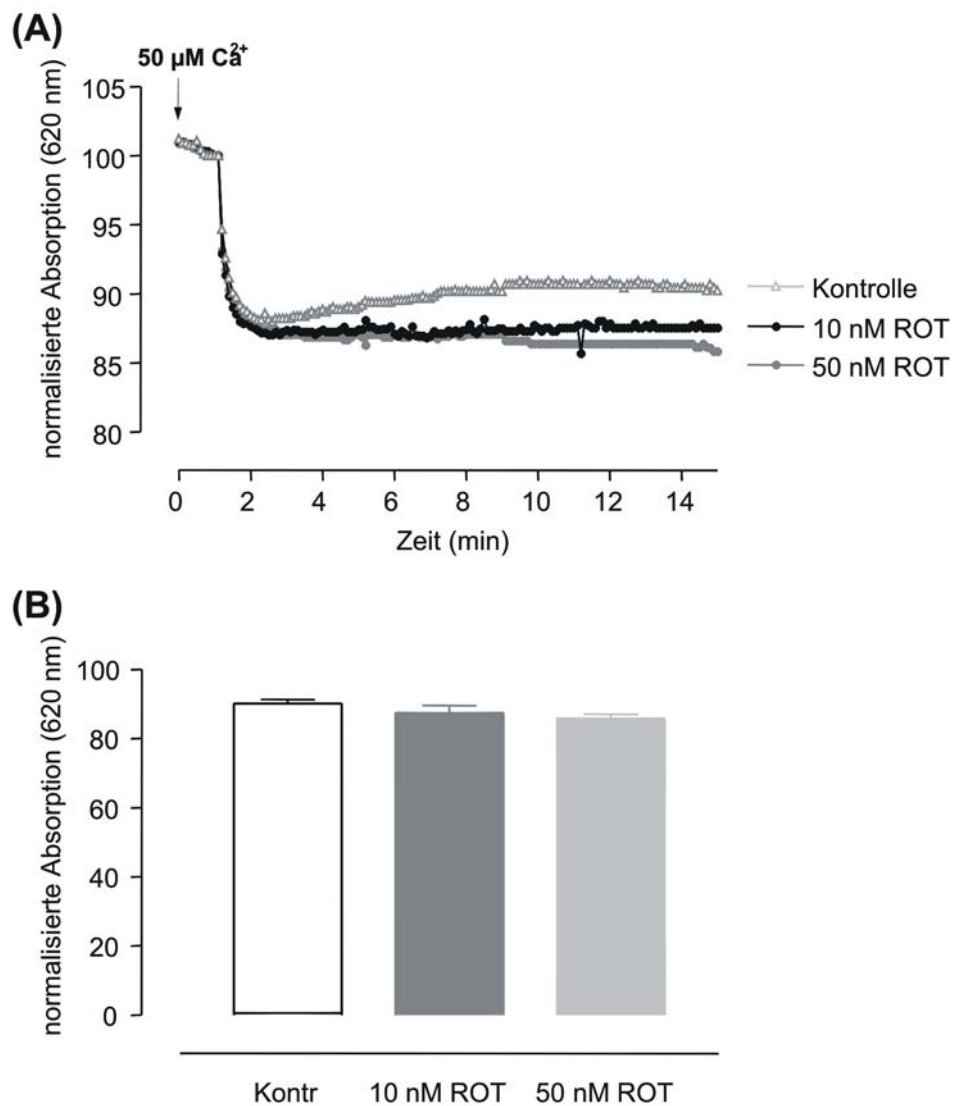


Abb. 16: Die dargestellten Kurvenverläufe in (A) demonstrieren die Ca^{2+} -induzierte Absorptionsabnahme einer Suspension von Hirnmitochondrien. Zugabe von $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ führte zu einer rapiden Abnahme der Absorption auf einen Endwert von etwa 90 % des Basalwertes. Zehn wie auch 50 nM Rotenon verstärkten diesen Effekt nicht signifikant, verdeutlicht durch das Säulendiagramm in (B) (Mittelwert \pm Standardfehler, n=3 unterschiedliche Präparationen).

7.2.2 *Effekt von Rotenon auf isolierte Lebermitochondrien und dessen Modulation durch CsA und Minozyklin*

Wurde auf die Zugabe von Kalzium verzichtet, erwies sich der Verlauf der Absorption wie bei Hirnmitochondrien als weitestgehend stabil. Die Zugabe von Kalzium induzierte eine signifikante Abnahme der Absorption auf $91,66 \pm 0,97 \%$ (Abb. 17 A). Sie ließ sich komplett aufheben, wenn dem Medium $1 \mu\text{M}$ des „klassischen“ mtPTP-Blockers CsA zusetzt wurde. Die Applikation von 10 nM Rotenon bewirkte eine weit stärkere Abnahme der Ab-

sorption auf $67,17 \pm 1,07$ % ($p < 0,001$) des Basalwertes ($97,83 \pm 3,1$ %; $p < 0,001$; Abb. 17 B). Dieser Vorgang konnte durch den mtPTP-Inhibitor CsA verhindert werden.

Bezüglich der Gabe von Minozyklin, scheinen die Werte in Abb. 17 anzudeuten, dass das Pharmakon ein im Vergleich zu CsA ähnlichen Effekt aufweist. Allerdings konnte schon während der Äquilibrationsphase beobachtet werden, dass Minozyklin allein (also ohne Kalzium-Zusatz zum Medium) eine Absorptionsabnahme verursacht. So zeigte sich in nachfolgenden Versuchen, dass 100 und 200 μM Minozyklin zu einer rapiden Absorptionsabnahme auf 76 bzw. 55 % des Basalwertes führen. Die Gabe von 10 μM Minozyklin dagegen hatte keinen Effekt auf die Absorption (Abb. 17 C).

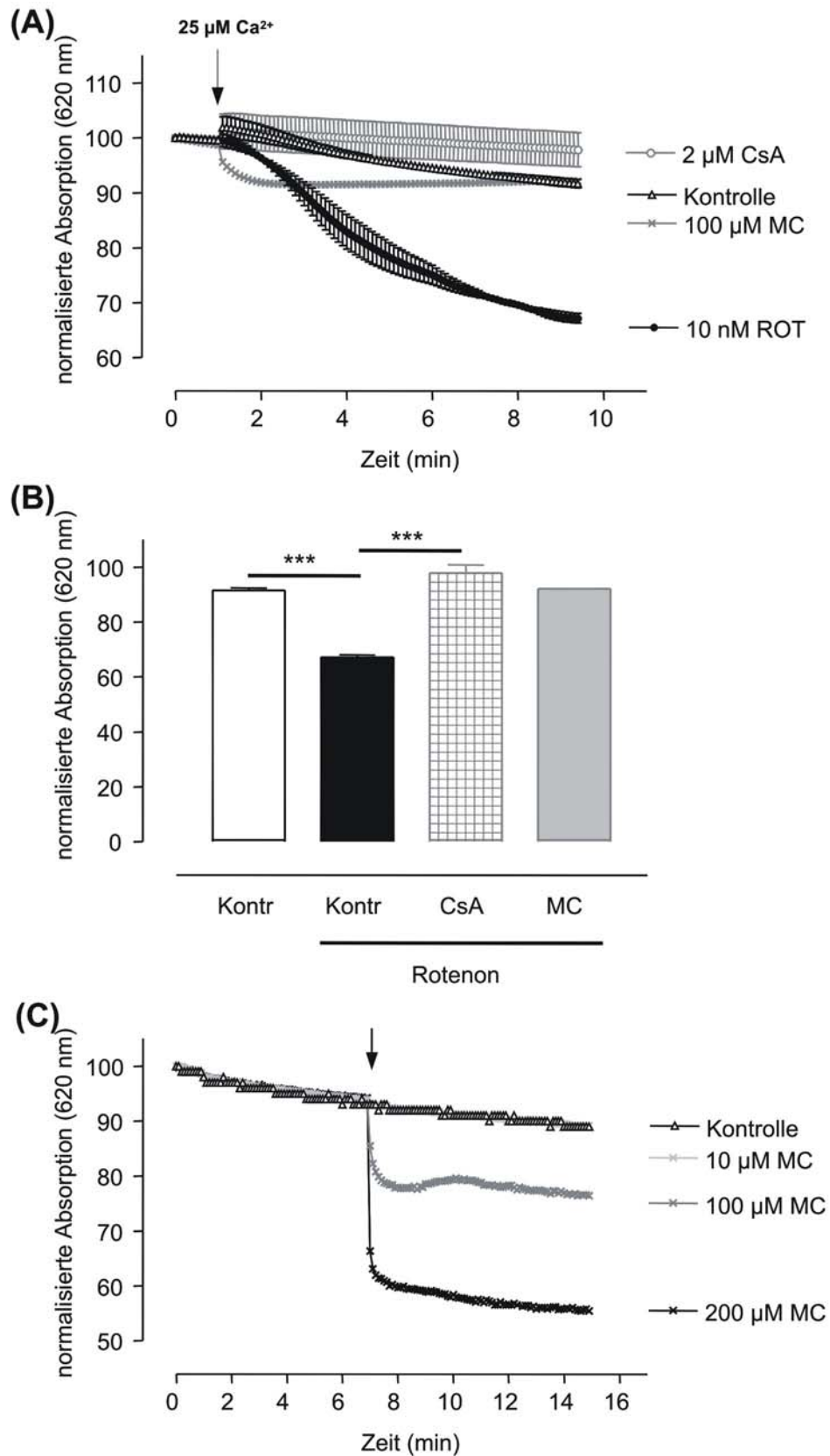


Abb. 17: Ca^{2+} -induzierte mitochondriale Schwellung von Lebermitochondrien. Die Zugabe von 25 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ führte zu einer Abnahme der Absorption auf ca. 92 % des Basalwertes (A). Die Applikation von 10 nM Rotenon verstärkte die kalziuminduzierte Schwellung signifikant um ca. 25 %. Die Anwesenheit von 1 $\mu\text{M CsA}$

verhinderte diesen Effekt. Die Endwerte der jeweiligen Behandlungsgruppen sind in dem Säulendiagramm in **(B)** graphisch aufgetragen. In **(C)** die Minozyklin-induzierte Absorptionsabnahme in Lebermitochondrien unter kalziumfreien Bedingungen. Die Gabe von 100 bzw. 200 μM Minozyklin führt zu einer dosisabhängigen mitochondrialen Schwellung, 10 μM Minozyklin blieb ohne Effekt. Gezeigt sind repräsentative Werte einer einzelnen Mitochondrienpräparation.

7.3 Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Minozyklin

7.3.1 Oxidation von DFF in primär kultivierten kortikalen Neuronen

Ein weiteres Ziel war es, die antioxidativen Eigenschaften von Minozyklin in lebenden Zellen mittels der bildgebenden Mikroskopie direkt zu verfolgen. Das Fluorogen H_2DFF kann in seiner Ester-Form ($\text{H}_2\text{DFF-DA}$) die Zellmembran passieren und wird durch unspezifische Esterasen in der Zelle deacetyliert. Die Oxidation zum stabilen und fluoreszierenden DFF ermöglicht dann dessen Detektion und damit die oxidative Kapazität der Zelle.

Die konfokalen Darstellungen in Abb. 18 A zeigen die verstärkte Oxidation von DFF, die in Kontrollzellen durch Applikation von 100 μM H_2O_2 verursacht wird. Diese Reaktion wird durch Vorbehandlung mit 100 μM Minozyklin weitgehend verhindert, ein Effekt der in den graphisch ausgewerteten Messreihen (Abb. 18 B) quantitativ ausgewiesen wird. Die Gabe von H_2O_2 erhöht das Fluoreszenzsignal in Kontrollzellen auf $167,91 \pm 0,6$ und erreicht in Minozyklin behandelten Zellen lediglich ein Niveau von $71,34 \pm 0,37$.

Die basale DFF-Fluoreszenzintensität in Kontrollzellen, aufgenommen in den ersten 100 s des *Imaging*-Experiments, unterscheidet sich signifikant von kortikalen Kulturen, die zuvor mit 100 μM Minozyklin (MC) vorbehandelt wurden. Dies deutet auf eine Abnahme an oxidativem Stress in mit Minozyklin vorbehandelten Zellen hin.

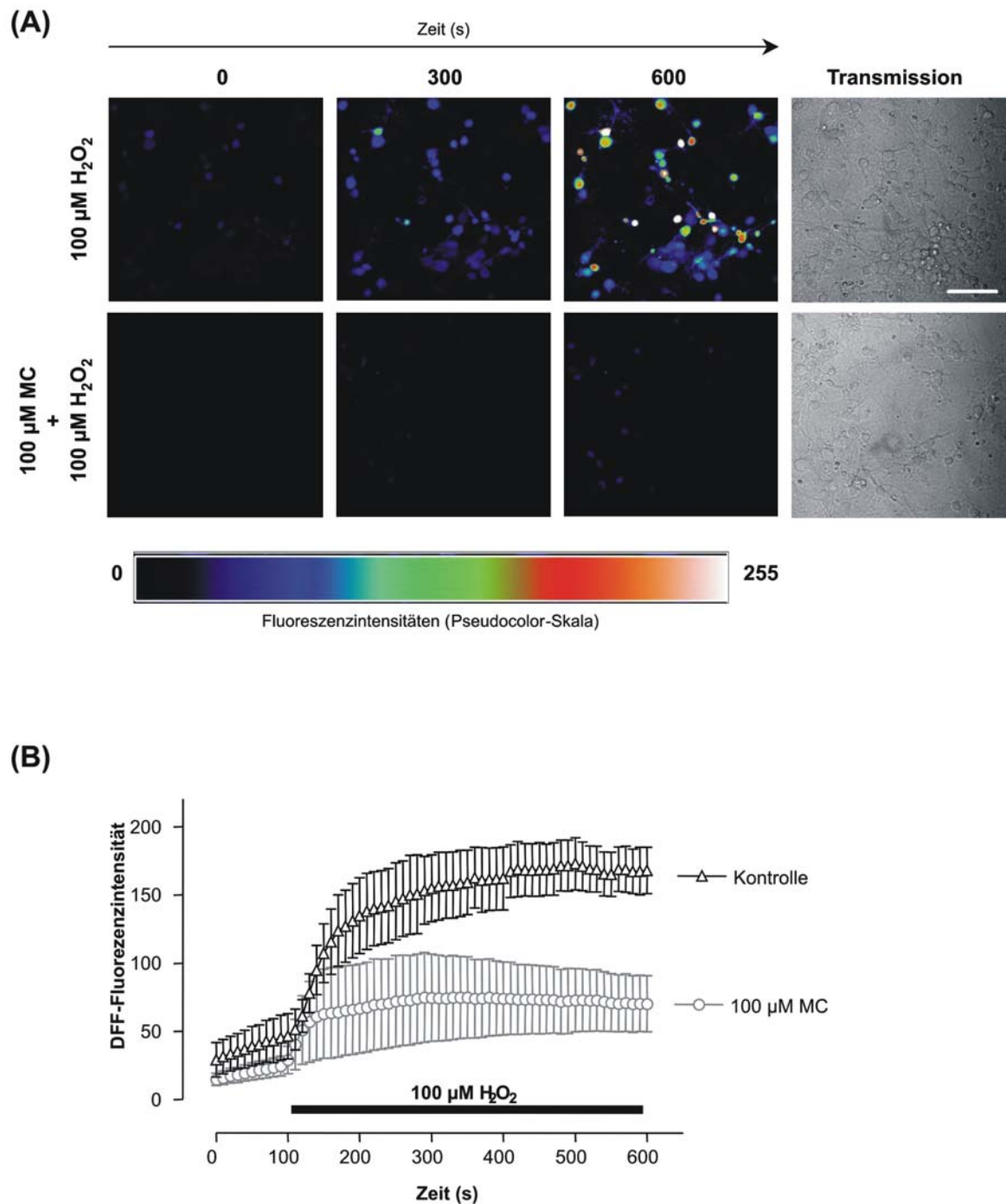


Abb: 18: DFF-Fluoreszenzintensitätsmessungen in primär kultivierten kortikalen Neuronen (13. DIV). **(A)** Konfokale Fluoreszenzbilder von Neuronen, die mit 100 μM H_2O_2 (oben) bzw. zusätzlich mit 100 μM Minozyklin (MC) behandelt wurden. Die Fluoreszenzsignale sind als Falschfarben repräsentiert, mit Intensitätswerten von 0 (schwarz=keine Fluoreszenz) bis 255 (weiß=höchste Fluoreszenz). **(B)** Entsprechende graphische Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitätsänderungen in unbehandelten und mit 100 μM MC (Zugabe erfolgte 30 min vor Beginn des Experimentes) inkubierten Kulturen ($n=3$). Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Skala=50 μM

7.3.2 Radikalfängereigenschaften von Minozyklin im DPPH-Experiment

DPPH ist ein artifizielles intensiv violettfarbenes und stabiles Radikal, das durch die Reaktion mit Antioxidantien entfärbt wird, wodurch sich die antioxidative Kapazität von Substanzen spektrophotometrisch detektieren lässt.

Minozyklin zeigte in dem Test sehr gute Radikalfängereigenschaften, ausgewiesen durch eine konzentrationsabhängige Absorptionsabnahme (Abb. 19). Die Substanz verhält sich hierbei ähnlich wie dem klassischen Referenzantioxidans Ascorbinsäure. Tetrazyklin, ein Mitglied derselben Gruppe von Antibiotika, der auch das Minozyklin zugeordnet wird, weist nur geringfügige Radikalfängereigenschaften auf.

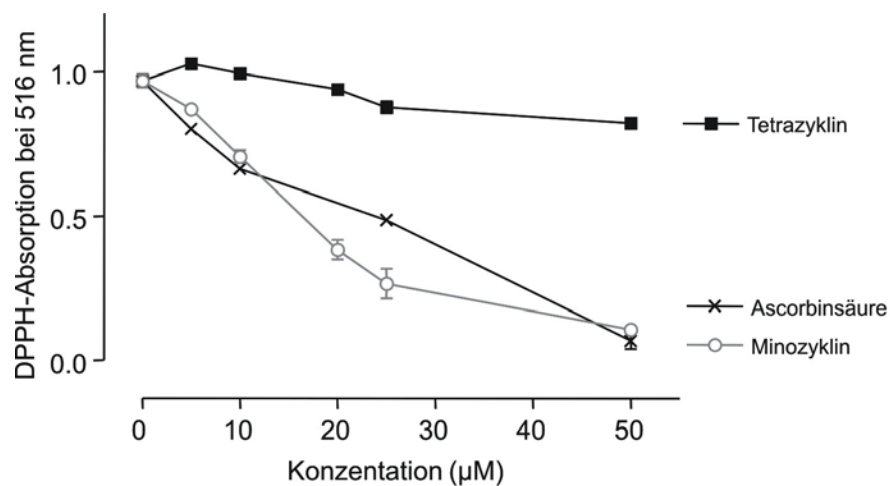


Abb. 19: Die Radikalfängereigenschaften von Minozyklin zeigte sich in einer deutlichen Absorptionsabnahme von DPPH, ähnlich der durch Ascorbinsäure verursacht. Die Grundsubstanz Tetrazyklin hingegen erwies sich als nahezu wirkungslos.

8 DISKUSSION

Neurodegenerative Erkrankungen sind oft mit Defiziten in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) verbunden. So ist verschiedentlich beobachtet worden, dass der Parkinson-Krankheit eine erhöhte Produktion an ROS/RNS, induziert durch eine mitochondriale Komplex I-Fehlfunktion, vorangeht (Tretter *et al.*, 2004). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit eine Komplex I-Inhibierung in primär kultivierten neokortikalen Neuronen über Veränderungen im oxidativen Stoffwechsel die Permeabilitätstransition zu induzieren vermag. Es ist davon auszugehen, dass eine Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon in Nervenzellen zu einer Störung der OXPHOS führt, was in einer erhöhten Produktion an ROS und einer Absenkung des ATP-Spiegels resultiert. Dies wiederum führt, zumal bei erhöhtem zytosolischem Kalziumgehalt, zur Formierung und damit zur Öffnung der mtPTP. Ausgehend von diesem, in der Literatur als „*two-hit hypothesis*“ (Brookes *et al.*, 2004) bezeichneten Mechanismus, entwickelten wir das im Methodenteil vorgestellte neuronale *In-vitro*-Schädigungsmodell, und untersuchten, inwieweit das Tetrazyklin-Derivat Minozyklin, wie in der Literatur des Öfteren beschrieben (Thernvath *et al.*, 2008; Kim and Suh, 2009), einen inhibitorischen Effekt auf das Öffnungsverhalten der mtPTP ausübt.

8.1 Das Schädigungsmodell

Die Behandlung primär kultivierter neokortikaler Neuronen mit dem von uns eingesetzten Glutamatrezeptor-Agonisten, dem natürlichen Transmitter Glutamat, wie auch dem synthetischen Analogon NMDA, resultierte in einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

Die Messung der dafür relevanten freien zytosolischen Kalziumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ ist durch den Einsatz von Indikatorfarbstoffen möglich. Diese Kalziumindikatoren, die in den 80er Jahren von Tsien und Mitarbeitern entwickelt wurden (Grynkiewicz *et al.*, 1985), werden von den Zellen aufgenommen und binden aufgrund ihrer negativen Ladungen das dort vorhandene freie Kalzium. Diese Bindung verändert die Eigenschaften des verwendeten Farbstoffes, die mikroskopisch detektiert werden können.

Der Ca^{2+} -Einstrom über den Glutamatrezeptor-gekoppelten Ionenkanal führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, was wiederum in einer kalziumabhängigen Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern in das Zytosol resultiert (Belan *et al.*, 1993; Verkhratsky and Shmigol, 1996; Usachev und Thayer, 1997, 1999a,b; Verkhratsky and Petersen, 1998; Aki-

ta and Kuba, 2000). Nach Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ sorgen komplexe Kalzium-Puffersysteme dafür, dass das überschüssige zytosolische Kalzium gebunden bzw. in die intrazellulären Kalziumspeicher zurückgepumpt wird (Werth and Thayer, 1994; Buchholz *et al.*, 1996; Werth *et al.*, 1996; Usachev and Thayer, 1999a; Pottorf *et al.*, 2000; Wuytack *et al.*, 2002). Daraufhin erreicht das Fluoreszenzsignal im Kalzium-*Imaging*-Versuch wieder das Normalniveau.

Die Behandlung mit Glutamat führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, allerdings verblieb diese selbst nach intensiver Auswaschphase auf einem hohen Niveau. Eine Überaktivierung von Glutamatrezeptoren in Neuronen führt darüber hinaus zum vermehrten Einstrom von Natrium in die Zelle. Hieraus resultierten eine Depolarisation der Zellmembran und schon dadurch eine Verschiebung der intrazellulären Kalzium-Homöostase (Mori und Mishina, 1995). Kalzium bewirkt die Induktion von Enzymen, z.B. die Stickoxidsynthase (NOS), und führt außerdem zu Proteinabbau, zur Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität, zur Erzeugung von ROS und schließlich zur Zelldegeneration (Hardingham and Bading, 2003). Glutamat erwies sich für unsere Untersuchungen aufgrund der Tatsache, dass es in den verwendeten Kulturen *per se* neurodegenerative Effekte zeigte, als nicht geeignet. Als Alternative wurde NMDA eingesetzt. NMDA agiert am ionotropen Glutamatrezeptor des NMDA-Subtyps. Auf die Stimulation mit NMDA reagierten deutlich weniger Zellen, jedoch handelte es sich dabei ausschließlich um Neuronen. Tatsächlich sind funktionale NMDA-Rezeptoren nur für Neuronen beschrieben worden. Gliazellen (Astrozyten) exprimieren zwar sowohl metabotrope Glutamatrezeptoren als auch AMPA-Rezeptoren (Seifert *et al.*, 1997, Seifert und Steinhauser, 1995), NMDA-Rezeptoren sind jedoch auf kultivierten Astrozyten nicht zu finden. Bergmann-Gliazellen reagieren zwar auf topisch appliziertes NMDA, aber der induzierte Ca^{2+} -Einwärtsstrom zeigt nicht die für NMDA-Rezeptoren typischen Eigenschaften (Müller *et al.*, 1993). Zudem ist die in diesen Zellen gemessene Antwort durch Tetrodotoxin blockierbar (Shao and McCarthy, 1997), was darauf hindeutet, dass die NMDA-vermittelte Antwort durch einen indirekten Mechanismus hervorgerufen wird.

Trotz der relativ selektiven neuronalen NMDA-Effekte wurden unsere Messergebnisse durch Gliazellen gestört, die sich in unseren Kulturen regelmäßig auch bei Anwendung eines serumfreien Mediums entwickelten. Die Kontamination mit Glia vermindert den Anteil der zu testenden Neuronen, vor allem aber stören sie durch Überwachsen der zu messenden Zellen. Wir berücksichtigten für die Messung ausschließlich Kulturen mit einem ausreichend hohen Anteil an Neuronen.

Ein weiteres Problem ergab sich daraus, dass mit den vorhandenen Techniken eine direkte Quantifizierung der $[Ca^{2+}]_i$ nicht möglich war. Sie setzt die Verwendung sogenannter ratiometrischer Kalziumindikatoren, wie dem Fura-PE 3, voraus. Farbstoffe dieser Art weisen für die gebundene bzw. ungebundene Form jeweils zwei Absorptionsmaxima auf, und bei entsprechender Anregung wird das Verhältnis aus den resultierenden Fluoreszenzsignalen bestimmt. Das Signal ist daher unabhängig von Farbstoffkonzentration, Zelldicke, Intensität des Anregungslichtes und Kamerasensitivität. Allerdings liegen die Anregungswellenlängen im Bereich des ultravioletten Lichts. Für die konfokale Mikroskopie sind dazu zwei UV-Laser notwendig, die uns jedoch nicht zur Verfügung standen. Ohnehin geht die dabei notwendige intensive UV-Exposition mit erhöhter Phototoxizität einher. Da in der vorliegenden Arbeit nur die Unterschiede der Kalzium-Antworten auf den NMDA-Stimulus insgesamt von Interesse waren, nämlich bezogen auf die zwischen Kontrollen und Rotenon-behandelten Kulturen, konnte auf die Differenzierung zwischen gebundenem und ungebundenem Kalzium verzichtet werden. Für unsere Fragestellung als geeignet erwies sich der Kalziumindikator Fluo-4.

Die Eignung von Inhibitoren des mitochondrialen Komplex I zur Erzeugung von Parkinson-Symptomen in Tiermodellen ist seit längerem bekannt (Sherer *et al.*, 2002). So führt auch die chronische Gabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon in Ratten zu entsprechenden Erkrankungsmerkmalen (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003). Damit übereinstimmend ist in verschiedenen Veröffentlichungen die Degeneration kultivierter Zellen durch eine Rotenon-vermittelte Toxizität beschrieben (Hartley *et al.* 1994; Wolvetang *et al.*, 1994; Betarbet *et al.* 2000). Rotenon ist ein natürlich vorkommendes, komplexes Keton, das aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft Zellmembranen leicht durchdringt und sich in subzellulären Substrukturen anreichert, so auch in Mitochondrien. Dort blockiert es den Komplex I der Atmungskette, indem es spezifisch an die PSST-Untereinheit des Multienzymkomplexes bindet (Schuler and Casida, 2001). Die PSST-Untereinheit ist im Elektronenübertragungsweg des Komplex I die letzte Proteinkomponente zwischen dem finalen Eisen-Schwefel-Zentrum und dem Chinon. Eine Anlagerung des Rotenons an diese Proteineinheit hemmt die Elektronenübertragung.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit eine Behandlung mit Rotenon im hier verwendeten Konzentrationsbereich zu einer entsprechenden Hemmung der mitochondrialen Atmung und damit einer beeinträchtigten Vitalität der Zellen führt. Der Grad der Reduktion von MTT in MTT-Formazan ist ein Indikator für den Redox-Status einer Zellpopulation und kann als Grad der metabolischen Aktivität und mit-

hin als Vitalitätsmaß interpretiert werden (Vistica *et al.*, 1991). Wir beobachteten mittels MTT-Tests eine dosiabhängige Verringerung der mitochondrialen Aktivität, wobei die LD50 für Rotenon bei 10 nM lag. Bei dieser Konzentration ist die respiratorische Aktivität der kultivierten Zellen zwar beeinträchtigt, die Funktionalität der Zellen bleibt jedoch weitgehend intakt. Das steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen fünfzigfach höhere Rotenon-Konzentrationen nötig waren, um eine neuronale Degeneration zu induzieren (Pei *et al.*, 2003). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch ist in der andersartigen Kultivierungsmethode und dem abweichendem Alter der verwendeten Kulturen zu suchen. Wir konnten zeigen, dass jüngere Kulturen in Hinblick auf die induzierte Rotenontoxizität wesentlich weniger empfindlich sind.

8.2 Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation

Die Gabe von Rotenon verursacht in kortikalen Neuronen eine Kalzium-Deregulation, ausgewiesen durch zeitlich verlängerte $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Zudem wurden die Ausgangswerte nicht wieder erreicht. Zur Messung der NMDA-induzierten Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ wurden ausschließlich morphologisch intakt erscheinende und mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 angemessen beladene Neuronen ausgewählt. Initial zu schwach oder zu stark fluoreszierende Zellen waren nicht in die Untersuchungen einbezogen worden, da diese bereits *per se* Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Kalzium-Homöostase und somit der Zellvitalität zeigten.

Die beobachtete Kalzium-Deregulation lässt vermuten, dass bei der Simultanbehandlung mit Rotenon NMDA-induzierte Kalziumtransienten zur Formierung und Öffnung der mtPTP führen. Mitochondrien agieren als Kalzium-Puffersystem, indem sie überschüssiges intrazelluläres Kalzium aus dem Zytosol aufnehmen (Kristian and Siesjö, 1998). Eine exzessiv hohe $[Ca^{2+}]_i$ im Zusammenhang mit einer Komplex I-Inhibierung bewirkt die Öffnung der mtPTP, was durch Freisetzung intramitochondrialer Komponenten unter anderem zu einer zusätzlichen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt (Crompton *et al.*, 1999; Petronilli *et al.*, 2001; Alano *et al.*, 2002). Daneben bewirkt die Aktivierung und Öffnung der mtPTP die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, wie Cyt c, AIF und Smac (Crompton *et al.*, 1999; Petronilli *et al.*, 2001; Boehning *et al.*, 2003). Die mtPTP spielt eine offenbar kausale Rolle bei neurodegenerativen Prozessen und ist sowohl am apoptotischen als auch am nekrotischen Zelltod beteiligt (Leist and Nicotera, 1998; Crompton *et al.*, 1999).

Die gleichzeitige Gabe des zyklischen Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) verhinderte teilweise die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation, indem es in geringen Konzentrationen an mitochondriales Cyclophilin D bindet und damit die Öffnung der Pore blockiert (Fournier *et al.*, 1987; Crompton *et al.*, 1988). Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass an der beobachteten $[Ca^{2+}]_i$ -Deregulation tatsächlich eine mtPTP-vermittelte Kalziumfreisetzung aus den Mitochondrien beteiligt ist und dass die kombinierte Anwendung von Rotenon und NMDA eine entsprechende Destabilisierung der Mitochondrien hervorruft. Allerdings war zu beobachten, dass die Rotenon-vermittelte Kalzium-Deregulation durch CsA nicht komplett verhindert wird, ein Indiz dafür, dass auch andere Mechanismen beteiligt sind. So können vermehrt entstehende ROS/RNS einen destabilisierenden Einfluss auf die Mitochondrien ausüben (Contestabile *et al.*, 2003; Jekabsone *et al.*, 2003) und damit zu einer potenziell proapoptotischen Akkumulation von Kalzium im Zytosol beitragen (Crompton *et al.*, 1999).

Die partielle Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch Rotenon führt zur Beeinträchtigung der OXPHOS. So formulierte Henneberry *et al.* 1989 in seiner Hypothese einer *energy-linked excitotoxicity*, wonach Einflussfaktoren, die die ATP-Produktion durch eine partielle Hemmung der mitochondrialen Atmung vermindern oder die glykolytische Aktivität der Zelle herabsetzen, zu einer Erhöhung der Vulnerabilität der Neuronen für Glutamattoxizität führen. Dementsprechend lässt der Abfall der ATP-Produktion, der einer Rotenon-bedingten Atmungshemmung folgt, sowie der resultierende Zusammenbruch des Membranpotentials eine Öffnung der mtPTP erwarten, die dann ihrerseits zu einer deregulierten $[Ca^{2+}]_i$ als ein Merkmal einer exitatorischen Situation führt (Solenski *et al.*, 2003).

8.3 Minozyklin verhindert die Rotenon-vermittelte Kalzium-Deregulation in kortikalen Neuronen

Minozyklin besitzt neben seiner antibiotischen Wirkung (Craven *et al.*, 1969) auch neuroprotektive Eigenschaften, die klinisch bei zerebraler sowie kardialer Ischämie genutzt werden (Scarabelli *et al.*, 2004; Koistinaho *et al.*, 2005). Die Schutzwirkung ist jedoch am deutlichsten in Tiermodellen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen nachzuweisen (Zhu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003) Bis heute wird die Wirkung von Minozyklin kontrovers diskutiert, wobei die zytoprotektiven Eigenschaften von Minozyklin mit antiinflammatorischen (Yrjänheikki *et al.*, 1998), antioxidativen (Kraus *et al.*, 2005) und an-

tiapototischen Eigenschaften (Scarabelli *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Castanares *et al.*, 2005) in Verbindung gebracht werden. Der antiapoptotische Effekt wird durch eine erhöhte Regulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Wang *et al.*, 2004; Castanares *et al.*, 2005), einer verminderten Caspase-Expression (Scarabelli *et al.*, 2004) sowie der blockierten Freisetzung proapoptotischer Proteine aus Mitochondrien erklärt. Für letzteres wird eine Blockade der Permeabilitätstransitions-pore durch Minozyklin vermutet (Zhu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Fuks *et al.*, 2005).

Eigene Ergebnisse zur neuroprotektiven Wirkung von Minozyklin auf Zellen mit einem mitochondrialen Komplex I-Defizit, wie es durch eine Punktmutation im mitochondrialen Genom in LHON (Lebersche Hereditäre Opticus-Neuropathie)-Zellen hervorgerufen wird, wurden in der Arbeit von Haroon und Mitarbeitern bereits 2007 veröffentlicht (Haroon *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang war es von großem Interesse zu untersuchen, inwieweit eine Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation in kortikalen Neuronen durch die Gabe von Minozyklin unterbunden werden kann. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die simultane Applikation von Rotenon und Minozyklin eine Rotenon-vermittelte Akkumulation zytosolischen Kalziums verhindert. Die Fähigkeit von Minozyklin, eine Formierung der mtPTP zu inhibieren, war bereits von anderen Forschergruppen durch Experimente an isolierten Hirn- und Lebermitochondrien beobachtet worden (Zhu *et al.*, 2002; Fernandez-Gomez *et al.*, 2005). Die Öffnung der mtPTP resultiert in einem Anschwellen der Mitochondrien, da der kolloidosmotische Druck der Matrixproteine über die Aquaporine zu einem Wassereinstrom in die Mitochondrien führt. Diese Volumenzunahme lässt sich durch Absorptionsmessungen spektrophotometrisch bestimmen (Kupsch *et al.*, 2006). Die direkte Messung an isolierten Mitochondrien bietet den Vorteil, dass Faktoren oder Mechanismen, die direkten oder indirekten Einfluss auf die mitochondriale Funktion haben könnten, ausgeblendet werden. Eine gleichzeitige Applikation von Rotenon und Kalzium an frisch isolierten Hirnmitochondrien resultierte in unseren Untersuchungen in einer nur geringfügigen Änderung der Absorption. Da neurale Mitochondrien in Hinblick auf Areal und Zelltyp, dem sie entstammen, sehr heterogen sind, ist die Sensitivität gegenüber mtPTP-induzierenden Faktoren möglicherweise unterschiedlich, und wird ohnehin als gering eingestuft. Aus diesem Grund haben wir zum Vergleich Lebermitochondrien eingesetzt, die eine ausgeprägte Homogenität aufweisen. Wurde isolierten Lebermitochondrien der Ratte Rotenon zusammen mit Kalziumionen zugesetzt, konnte eine Volumenzunahme der Organellen registriert werden, die sich durch Gabe von Cyclosporin A (CsA) verhindern ließ. Dieses Ergebnis kann als ein weiterer Beweis für die Rotenon-induzierte Öff-

nung der mtPTP gedeutet werden. Zwar konnte zunächst ein protektiver Effekt von Minozyklin in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, allerdings zeigte sich, dass Minozyklin allein schon zu einer Absorptionsänderung in der Mitochondriensuspension führt. Bei den Absorptionsmessungen wurden zunächst die Mitochondrien und die zu untersuchenden Substanzen in die Küvette pipettiert, die Kalziumionen aber erst nach einer Äquilibrierungsphase. Dabei fiel uns auf, dass Minozyklin bereits allein ein Anschwellen der Mitochondrien verursacht. In der eigenen Arbeitsgruppe (Kupsch *et al.*, 2009) wurde dieses Phänomen ausführlich untersucht, wobei sich zeigte, dass Minozyklin zwar in der Lage ist, die Ca^{2+} -induzierte Schwellung und Cytochrom c-Freisetzung von in Saccharose-Medium inkubierten Rattenlebermitochondrien zu verhindern, dass allerdings dieser Effekt nicht auf eine Blockade der mtPTP zurückzuführen war. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch die Gruppe um Mansson *et al.* (Mansson *et al.*, 2007), die an isolierten Mitochondrien ebenfalls keine direkte Inhibition der mtPTP durch Minozyklin zeigen konnten. Die Autoren bezweifeln daher das neuroprotektive Potenzial des Minozyklins. Zudem wiesen sie die auch anderweitig in der Literatur beschriebenen toxischen Effekte des Pharmakons nach.

8.4 Minozyklin besitzt antioxidative Eigenschaften

Eine alternative Erklärung für die neuroprotektive Eigenschaft des Minozyklins ergibt sich aus seiner antioxidativen Wirkung (Kraus *et al.*, 2005). Antioxidativ wirksame Substanzen sind in der Lage, die während des oxidativen Stoffwechsels kontinuierlich entstehenden ROS wegzufangen und somit eine mögliche Schädigung zellulärer Bestandteile zu verhindern. Die Radikalfängereigenschaften von Minozyklin wurden bereits 1986 von Miyachi (Miyachi *et al.* 1986) beschrieben und gaben erstmals einen Hinweis darauf, wie seine neuroprotektiven Eigenschaften zu erklären sind. Zur Untersuchung von antioxidativen Eigenschaften bietet sich eine Reihe von analytischen Verfahren und Messmethoden an. Generell beruhen die Messverfahren auf der Fähigkeit von Antioxidantien, freie Radikale zu binden. Wir nutzten die bildgebende Mikroskopie, um die antioxidativen Eigenschaften in lebenden Zellen direkt zu verfolgen. Dazu wurde das Fluorogen DFF in die Zellen eingebracht, das bei Anwesenheit von ROS zu DFF oxidiert und dadurch zur Fluoreszenz befähigt wird. Tatsächlich zeigte sich bei DFF-Fluoreszenzintensitätsmessungen in primär kultivierten Neuronen, dass eine H_2O_2 -verursachte Induzierung von oxidativem Stress durch Gabe von Minozyklin verhindert wird.

Des Weiteren wurde das Potential von Minozyklin als Radikalfänger mit der DPPH-Methode systematisch charakterisiert und mit denen des Tetrazyklins und eines Referenzmoleküls verglichen. Das stabile künstliche Radikal 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) wird durch Reaktion mit einem Antioxidans zum Hydrazin umgewandelt, was photometrisch bestimmt werden kann. Minozyklin zeigte, verglichen mit dem des natürlich vorkommenden Antioxidans Ascorbinsäure (Vitamin C), gute Radikalfängereigenschaften, wohingegen die Grundsubstanz Tetrazyklin zu keiner Farbveränderung der DPPH-Lösung führt. Die Radikalfängereigenschaft des Minozyklins beruht auf einem vielfach mit Keto- und Hydroxylgruppen substituierten Phenolring ähnlich dem der Ascorbinsäure. Minozyklin gehört damit zur Klasse der phenolischen Antioxidantien. Phenolische Antioxidantien sind dadurch effektiv, dass sie mit Radikalen eine stabile, d.h. wenig reaktionsfreudige Verbindung bilden. Minozyklin besitzt im Gegensatz zu Tetrazyklin einen Dimethylamino-Substituenten, der die Stabilisierung des Phenol-Radikal-Moleküls zusätzlich verstärkt (Kraus *et al.*, 2005).

Die Beobachtung, wonach die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation in kortikalen Neuronen durch simultane Gabe von Minozyklin effektiver verhindert wird als durch den mtPTP-Blocker CsA, ist möglicherweise mit der zusätzlichen antioxidativen Eigenschaft von Minozyklin zu begründen. Durch die pharmakologisch induzierte partielle Hemmung vom mitochondrialen Komplex I wird die Konzentration freier Radikale in der Zelle erhöht. Ihre Beseitigung durch Minozyklin verhindert offenbar eine zusätzliche Akkumulation zytolischen Kalziums.

Schlussfolgerung:

Die Rotenon-vermittelte Kalzium-Deregulation wird in kultivierten kortikalen Neuronen wesentlich durch die mitochondriale Permeabilitätstransition verursacht. Minozyklin, ein in der Literatur als vielversprechendes Zytoprotektivum postuliertes Tetrazyklin-Derivat, erwies sich als fähig, diesen Mechanismus zu verhindern. Für das Pharmakon konnte dementsprechend ein protektiver Effekt gezeigt werden, der zumindest teilweise aber auch mit seiner Eigenschaft als Radikalfänger zu erklären ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse regen zu weiteren Untersuchungen über die Verwendungsmöglichkeit von Minozyklin bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen an. Jedoch muss der zytotoxische Effekt dieser Substanz eingerechnet werden. Für die weitere klinische Anwendung ist daher, wie die vorgelegten Ergebnisse nahe legen, in Abhängigkeit von der Dosis und der Applikationsart eine präzisierte Nutzen-Schaden-Kalkulation zugrunde zu legen.

9 LITERATUR

Adam-Vizi V.: Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1140-9. Review.

Akita T, Kuba K.: Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca(2+) channels, and Ca(2+)-activated K(+) channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol*. 2000 Nov;116(5):697-720.

Alam M, Schmidt WJ.: Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res*. 2002 Oct 17;136(1):317-24.

Alano CC, Beutner G, Dirksen RT, Gross RA, Sheu SS.: Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J Neurochem*. 2002 Feb;80(3):531-8.

Allen KL, Almeida A, Bates TE, Clark JB.: Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia. *J Neurochem*. 1995 May;64(5):2222-9.

Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB.: A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14014-9.

Belan PV, Kostyuk PG, Snitsarev VA, Tepikin AV.: Calcium clamp in single nerve cells. *Cell Calcium*. 1993 Jun;14(6):419-25.

Benmoyal-Segal L, Soreq H.: Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease. *J Neurochem*. Jun;97(6):1740-55. Review.

Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT.: Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol*. 2002 Oct;12(4):499-510. Review

Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT.: Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol*. 2005 Feb;191 Suppl 1:S17-27. Review.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT.: Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000 Dec;3(12):1301-6.

Blandini F, Greenamyre JT.: Protective and symptomatic strategies for therapy of Parkinson's disease. *Drugs Today* 1999 (Barc). Jun;35(6):473-83.

Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. : Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2003 Dec;5(12):1051-61.

- Bonelli RM, Hödl AK, Hofmann P, Kapfhammer HP. : Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. *Int Clin Psychopharmacol.* 2004 Nov;19(6):337-42.
- Bonifati V, Oostra BA, Heutink P.: Unraveling the pathogenesis of Parkinson's disease--the contribution of monogenic forms. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jul;61(14):1729-50. Review.
- Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S.: Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005 Jul;2(3):484-94.
- Bowling AC, Beal MF.: Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 1995;56(14):1151-71. Review.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E.: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr; 24(2):197-211.
- Brookes, PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS.: Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 287 (4):C817-33.
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR.: Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect.* 2005 Sep;113(9):1250-6. Review.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW.: Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain.* 2002 Jun;125(Pt 6):1297-308.
- Búa J, Aslund L, Pereyra N, García GA, Bontempi EJ, Ruiz AM: Characterisation of a cyclophilin isoform in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jun 12;200(1):43-7.
- Buchholz J, Tsai H, Foucart S, Duckles SP.: Advancing age alters intracellular calcium buffering in rat adrenergic nerves. *Neurobiol Aging.* 1996 Nov-Dec;17(6):885-92
- Caboni P, Sherer TB, Zhang N, Taylor G, Na HM, Greenamyre JT, Casida JE.: Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol.* 2004 Nov;17(11):1540-8
- Castanares M, Vera Y, Erkkilä K, Kytönen S, Lue Y, Dunkel L, Wang C, Swerdloff RS, Hikim AP.: Minocycline up-regulates BCL-2 levels in mitochondria and attenuates male germ cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 18;337(2):663-9.
- Chung KK, Dawson VL, Dawson TM.: The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2001 Nov;24(11 Suppl):S7-14. Review
- Conley SC, Kirchner JT. : Medical and surgical treatment of Parkinson's disease. Strategies to slow symptom progression and improve quality of life. *Postgrad Med.* 1999 Aug;106(2):41-4, 49, 52. Review.

- Contestabile A, Monti B, Contestabile A, Ciani E.: Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. *Curr Med Chem*. 2003 Oct;10(20):2147-74. Review.
- Coyle JT, Puttfarcken P.: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):689-95. Review.
- Craven GR, Gavin R, Fanning T.: The transfer RNA binding site of the 30 S ribosome and the site of tetracycline inhibition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1969;34:129-37
- Crompton M, Ellinger H, Costi A.: Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988 Oct 1;255(1):357-60.
- Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM. : The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*. 1999;66:167-79.
- Cross AK, Woodrooffe MN. : Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc Res Tech*. 2001 Jul 1;54(1):10-7.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A.: Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. *Neurology* 2000 54(11 Suppl 5), 21-23.
- Di Monte DA.: The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol*. 2003 Sep;2(9):531-8. Review.
- DiDonato S, Zeviani M, Giovannini P, Savarese N, Rimoldi M, Mariotti C, Girotti F, Caraceni T.: Respiratory chain and mitochondrial DNA in muscle and brain in Parkinson's disease patients. *Neurology*. 1993 Nov;43(11):2262-8.
- Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM.: Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14669-74.
- Fernandez-Gomez FJ, Galindo MF, Gomez-Lazaro M, González-García C, Ceña V, Aguirre N, Jordán J.: Involvement of mitochondrial potential and calcium buffering capacity in minocycline cytoprotective actions. *Neuroscience*. 2005;133(4):959-67.
- Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF.: Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res*. 1997 Apr 4;753(1):157-62.
- Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA.: Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(5):1314-26.

- Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. (2005) Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx*. Jul;2(3):495-503.
- Fournier N, Ducet G, Crevat A.: Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*. 1987 Jun;19(3):297-303.
- Freeman K.: Therapeutic focus. Minocycline in the treatment of acne. *Br J Clin Pract*. 1989 Mar;43(3):112-5. Review.
- Fuks B, Talaga P, Huart C, Hénichart JP, Bertrand K, Grimée R, Lorent G: In vitro properties of 5-(benzylsulfonyl)-4-bromo-2-methyl-3(2H)-pyridazinone: a novel permeability transition pore inhibitor. *Eur J Pharmacol*. 2005 Sep 5;519(1-2):24-30.
- Gandhi S, Wood NW.: Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:2749-2755.
- Gordon PH, Moore DH, Gelinas DF, Qualls C, Meister ME, Werner J, Mendoza M, Mass J, Kushner G, Miller RG: Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1845-7.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ.: The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*. 1998 May;50(5):1346-50.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE.: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp*. 1999;66:85-97.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
- Halestrap AP. : Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006 Apr;34(Pt 2):232-7. Review.
- Halliwell B.: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992 Nov;59(5):1609-23. Review.
- Hardingham GE, Bading H.: The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*. 2003 Feb;26(2):81-9. Review
- Haroon MF, Fatima A, Schöler S, Gieseler A, Horn TF, Kirches E, Wolf G, Kreutzmann P.: Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): studies of cybrid cells bearing 11,778 mutation. *Neurobiol Dis*. 2007 Dec;28(3):237-50.
- Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH.: Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1994 Nov;63(5):1987-90.
- Hatefi Y.: The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:1015-69. Review.

Henneberry RC, Novelli A, Cox JA, Lysko PG.: Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;568:225-33.

Hirsch EC, Orioux G, Muriel MP, Francois C, Feger J.: Nondopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 2003;91:29-37.

Höglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombès A, Ruberg M, Friguet B, Hirsch EC.: Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2003 Sep;86(5):1297-307

Holdorff B.: Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci.* 2002 Mar;11(1):19-28.

Huang TY, Chu HC, Lin YL, Lin CK, Hsieh TY, Chang WK, Chao YC, Liao CL.: Minoxycycline attenuates experimental colitis in mice by blocking expression of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 May 15;237(1):69-82

Ilivicky J, Casida JE.: Uncoupling action of 2,4-dinitrophenols, 2-trifluoromethylbenzimidazoles and certain other pesticide chemicals upon mitochondria from different sources and its relation to toxicity. *Biochem Pharmacol.* 1969 Jun;18(6):1389-401.

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. : Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Apr;82(7):2173-7.

Jekabsone A, Ivanoviene L, Brown GC, Borutaite V: Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Jul;35(7):803-9.

Jellinger KA.: Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol.* 1991 Jun;14(3):153-97. Review.

Jenner P, Olanow CW.: Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S72-84. Review.

Jenner P.: Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1998;13 Suppl 1:24-34. Review.

Kahle PJ, Haass C, Kretschmar HA, Neumann M.: Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem.* 2002 Aug;82(3):449-57.

Kamel F, Moreno T, Rowland AS, Stallone L, Ramírez-Garnica G, Sandler DP: Recruiting a community sample in collaboration with farmworkers. *Environ Health Perspect.* 2001 Jun;109 Suppl 3:457-9.

- Kim HS, Suh YH.: Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res.* 2009 Jan 23;196(2):168-79.
- Kim ST, Choi JH, Kim D, Hwang O.: Increases in TH immunoreactivity, neuromelanin and degeneration in the substantia nigra of middle aged mice. *Neurosci Lett.* 2006 Apr 3;396(3):263-8.
- Kindler DD, Thiffault C, Solenski NJ, Dennis J, KostECKI V, Jenkins R, Keeney PM, Bennett JP Jr.: Neurotoxic nitric oxide rapidly depolarizes and permeabilizes mitochondria by dynamically opening the mitochondrial transition pore. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Aug;23(4):559-73.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N.: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998 Apr 9;392(6676):605-8.
- Klein NC, Cunha BA.: Tetracyclines. *Med Clin North Am.* 1995 Jul;79(4):789-801. Review
- Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, Goldsteins G, Starckx S, Kauppinen RA, Opdenakker G, Koistinaho J.: Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Apr;25(4):460-7.
- Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW.: Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem.* 2005 Aug;94(3):819-27.
- Kristián T, Siesjö BK.: Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998 Mar;29(3):705-18. Review.
- Kupsch K, Hertel S, Kreutzmann P, Wolf G, Wallesch CW, Siemen D, Schönfeld P.: Impairment of mitochondrial function by minocycline. *FEBS J.* 2009 Mar;276(6):1729-38.
- Kupsch K, Parvez S, Siemen D, Wolf G.: Modulation of the permeability transition pore by inhibition of the mitochondrial K(ATP) channel in liver vs. brain mitochondria. *J Membr Biol.* 2007 Feb;215(2-3):69-74. Epub 2007 Apr 6.
- Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL.: Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem.* 2001 Dec 14;276(50):47379-86
- Lang AE, Lozano AM. (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med.* Oct 15;339(16):1130-43. Review.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D.: Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol.* 1999 Oct;46(4):598-605.

- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG.: Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999 Apr;53(3):122-30. Review.
- Le Couteur DG, Muller M, Yang MC, Mellick GD, McLean AJ.: Age-environment and gene-environment interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev Environ Health.* 2002 Jan-Mar;17(1):51-64. Review.
- Le W, Appel SH. : Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 Feb;4(1):79-84.
- Leist M, Nicotera P.: Apoptosis versus necrosis: the shape of neuronal cell death. *Results Probl Cell Differ.* 1998;24:105-35. Review.
- Leist M, Nicotera P.: Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1998;132:79-125. Review.
- Li J, Zuo L, Shen T, Xu CM, Zhang ZN.: Induction of apoptosis by sodium selenite in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells: involvement of oxidative stress and mitochondria. *J Trace Elem Med Biol.* 2003;17(1):19-26.
- Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow MR, Paul SM, Du Y. : Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2001 Nov 23;315(1-2):61-4
- Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. : Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 1999 Feb 15;19(4):1284-93.
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH.: Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem.* 2005 Feb;92(3):494-504.
- Månsson R, Hansson MJ, Morota S, Uchino H, Ekdahl CT, Elmér E.: Re-evaluation of mitochondrial permeability transition as a primary neuroprotective target of minocycline. *Neurobiol Dis.* 2007 Jan;25(1):198-205. Epub 2006 Oct 24.
- Marey-Semper I, Gelman M, Lévi-Strauss M.: A selective toxicity toward cultured mesencephalic dopaminergic neurons is induced by the synergistic effects of energetic metabolism impairment and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1995 Sep;15(9):5912-8
- Martinou JC, Green DR: Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):63-7.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG.: Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988 Aug;38(8):1285-91.
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y: Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol.* 1986 Apr;86(4):449-53.

- Mizuno Y, Hattori N, Mori H. (1999) Genetics of Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* Apr;53(3):109-16. Review.
- Mizuno Y, Sone N, Suzuki K, Saitoh T.: Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) against mitochondria of mouse brain. *J Neurol Sci.* 1988 Aug;86(1):97-110.
- Mori H, Mishina M.: Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology.* 1995 Oct;34(10):1219-37. Review.
- Müller T, Grosche J, Ohlemeyer C, Kettenmann H.: NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport.* 1993 Jun;4(6):671-4
- Murphy AN, Fiskum G, Beal MF.: Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Mar;19(3):231-45. Review.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A.: Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000;(58):143-51. Review.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE.: Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985 Jul 1;36(26):2503-8.
- Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P.: Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2185-92.
- Nieminen AL.: Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol.* 2003;224:29-55. Review.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P.: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65.
- Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK: Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1989 Dec;26(6):719-23
- Parkinson J.: *An Essay on the Shaking Palsy.* originally published as a monograph by Sherwood, Neely, and Jones (London, 1817). *Neuropsychiatry Clin Neurosci* © 2002 American Psychiatric Press, Inc. May 2002, 14:223-236.
- Pei W, Liou AK, Chen J.: Two caspase-mediated apoptotic pathways induced by rotenone toxicity in cortical neuronal cells. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):520-2.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F.: The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):12030-4.
- Pottorf WJ, Duckles SP, Buchholz JN.: Mechanisms of calcium buffering in adrenergic neurones and effects of ageing: testing the limits of homeostasis. *J Auton Pharmacol.* 2000 Apr;20(2):63-75. Review.

Radi R, Cassina A, Hodara R.: Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem.* 2002 Mar-Apr;383(3-4):401-9.

Ren Y, Zhao J, Feng J.: Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci.* 2003 Apr 15;23(8):3316-24.

Salach JJ, Singer TP, Castagnoli N Jr, Trevor A.: Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Dec 14;125(2):831-5.

Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Gitti G, Townsend P, Lawrence K, Chen-Scarabelli C, Saravolatz L, Latchman D, Knight R, Gardin J.: 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.* 2004 Mar 3;43(5):865-74.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD.: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990 Mar;54(3):823-7.

Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD.: Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990 Dec;55(6):2142-5.

Schuler F, Casida JE.: The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci.* 2001 Oct;57(10):932-40.

Schuler, F., Casida, J.E.: Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labelling. *Biochim Biophys Acta* 2001 1506: 79-87).

Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Masterman D, Mastaglia F, Laing NG, Stajich JM, Slotterbeck B, Booze MW, Ribble RC, Rampersaud E, West SG, Gibson RA, Middleton LT, Roses AD, Haines JL, Scott BL, Vance JM, Pericak-Vance MA.: Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA.* 2001 Nov 14;286(18):2239-44

Seifert G, Steinhäuser C.: Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci.* 1995 Sep 1;7(9):1872-81.

Seifert G, Zhou M, Steinhäuser C.: Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol.* 1997 Dec;78(6):2916-23.

Shao Y, McCarthy KD.: Responses of Bergmann glia and granule neurons in situ to N-methyl-D-aspartate, norepinephrine, and high potassium. *J Neurochem.* 1997 Jun;68(6):2405-11.

Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT.: Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist.* 2002 Jun;8(3):192-7. Review

Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT.: Pathogenesis of Parkinson's disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 May;2(5):657-62. Review.

Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT.: An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*. 2002 Aug 15;22(16):7006-15.

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH et al. (2003): Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 23 (34), 10756-64.
Sherer TB, Greenamyre JT.: Oxidative damage in Parkinson's disease.

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT.: Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*. 2003 Jan;179(1):9-16.

Sherer TB, Trimmer PA, Borland K, Parks JK, Bennett JP Jr, Tuttle JB.: Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res*. 2001 Feb 9;891(1-2):94-105.

Sian J, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P.(1999) Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. *J Neural Transm*. 106(5-6):443-76. Review

Smith K, Leyden JJ.: Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clin Ther*. 2005 Sep;27(9):1329-42.

Solenski NJ, KostECKI VK, Dovey S, Periasamy A.: Nitric-oxide-induced depolarization of neuronal mitochondria: implications for neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Dec;24(4):1151-69

Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W.: Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist*. 2005 Aug;11(4):308-22.

Theruvath TP, Zhong Z, Padiaditakis P, Ramshesh VK, Currin RT, Tikunov A, Holmuhamedov E, Lemasters JJ.: Minocycline and N-methyl-L-isoleucine cyclosporin (NIM811) mitigate storage/reperfusion injury after rat liver transplantation through suppression of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):236-46.

Thiffault C, Langston JW, Di Monte DA.: Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. *Brain Res*. 2000 Dec 8;885(2):283-8.

Thomas M, Le WD.: Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*. 2004;10(6):679-86. Review.

Tilley BC, Alarcón GS, Heyse SP, Trentham DE, Neuner R, Kaplan DA, Clegg DO, Leisen JC, Buckley L, Cooper SM, Duncan H, Pillemer SR, Tuttleman M, Fowler SE.: Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group. *Ann Intern Med*. 1995 Jan 15;122(2):81-9.

- Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V.: Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2004 Mar;29(3):569-77.
- Usachev YM, Thayer SA.: All-or-none Ca²⁺ release from intracellular stores triggered by Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels in rat sensory neurons. *J Neurosci.* 1997 Oct 1;17(19):7404-14.
- Usachev YM, Thayer SA.: Ca²⁺ influx in resting rat sensory neurones that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores. *J Physiol.* 1999 Aug 15;519 Pt 1:115-30.
- Usachev YM, Thayer SA.: Controlling the urge for a Ca(2+) surge: all-or-none Ca(2+) release in neurons. *Bioessays.* 1999 Sep;21(9):743-50. Review
- Uversky VN.: Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 2004 Oct;318(1):225-41. Review
- Verkhatsky A, Shmigol A.: Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium.* 1996 Jan;19(1):1-14. Review.
- Verkhatsky AJ, Petersen OH.: Neuronal calcium stores. *Cell Calcium.* 1998 Nov-Dec;24(5-6):333-43. Review.
- Vierregge P, Friedrich HJ, Röhl A, Ulm G, Heberlein I.: [Multifactorial etiology of idiopathic Parkinson disease. A case-control study]. *Nervenarzt.* 1994 Jun;65(6):390-5. German.
- Vierregge P.: Genetic factors in the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1994;8(1-2):1-37. Review.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR: Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991 May 15;51(10):2515-20.
- Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z.: Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):19948-54.
- Werth JL, Thayer SA.: Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons.
- Werth JL, Usachev YM, Thayer SA.: Modulation of calcium efflux from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 1996 Feb 1;16(3):1008-15.
- Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW.: Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* 1994 Feb 14;339(1-2):40-4.
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L.: Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 2002 Nov-Dec;32(5-6):279-305. Review.

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y.: Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):2696-701

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J.: Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15769-74

Zhang ZX, Román GC.: Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology*. 1993;12(4):195-208.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM.: Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002 May 2;417(6884):74-8.

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch tatkräftige Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Vor allem sind es die Mitarbeiter des heutigen Institutes für Zellbiologie und Biochemie, vormals Institut für Medizinische Neurobiologie, das bis 2008 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Gerald Wolf gestanden hat. Ihnen allen habe ich für die herzliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre zudanken.

Insbesondere danke ich Herrn Professor Dr. Gerald Wolf für die Vergabe des interessanten Arbeitsthemas, für die hervorragende Betreuung und sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit. Nicht nur sein umfangreiches Fachwissen, sondern auch sein großer beruflicher Erfahrungsschatz brachte mir das wissenschaftliche Denken und Handeln näher.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Detlef Siemen für die Möglichkeit, Experimente in seinem Institut durchzuführen, für sehr lehrreiche Diskussionen sowie die gute Zusammenarbeit beim Publizieren meiner Daten.

Herrn Dr. Thomas Horn danke ich für die Einarbeitung in das Thema sowie für die Einführung in konfokalmikroskopische Methoden, Herrn Dr. Peter Kreutzmann für die fachliche Betreuung, seine allzeit offene Tür und für viele außerordentlich hilfreiche Hinweise bei der Laborarbeit und Frau Dr. Karin Richter, Frau Professor Dr. Gerburg Keilhoff und Herrn Professor Dr. Mario Engelmann für die zahlreichen Ratschläge und fruchtbaren Diskussionen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Siegfried Kropf für die großzügige Hilfe bei der statistischen Analyse meiner Daten.

Meiner Kollegin Julia Noack danke ich von ganzem Herzen für ihre fortwährende Freundschaft, für Unterstützung und Geduld, ich habe ihre tolle Persönlichkeit schätzen gelernt. Es ist schön, dass es dich gibt!

Ich danke den technischen Assistentinnen für die Unterstützung im Labor, Heike Baumann und Leona Bück für die Hilfe bei zellkulturtechnischen Problemen, Irmgard Leschka und Andrea Mohrmann für die Hilfe bei der Anwendung der Immunzytochemie sowie Gudrun Schmidt und Karla Klingenberg für die Arbeit mit den Versuchstieren.

Ein großer Dank gilt auch meinem Kollegen und Leidensgenossen Dr. Fahad Haroon für die unermüdliche Hilfe bei technischen Schwierigkeiten, gleichermaßen den Kolleginnen Dr. Kathleen Kupsch und Dr. Ambrin Fatima für die umfangreiche Unterstützung bei wissenschaftlichen und mitunter auch persönlichen Problemen.

Außerdem möchte ich den fleißigen Heinzelmännchen des Sekretariats danken: Julia Czerney und Beate Zörner. Ohne euch wäre die eine oder andere organisatorische Hürde nicht zu bewältigen gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, insbesondere Jacqueline Hein und Ulrike Händel, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützten, in Phasen des Zweifelns aufbauten und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ohne die stete und außergewöhnliche Hilfe meiner Eltern, Christiane und Hans-Joachim Gieseler, sowie meiner Schwester Dr. Steffi Gieseler wäre die vorgelegte Arbeit nicht durchführbar gewesen. Eure moralische wie finanzielle Unterstützung ermöglichte mir mein Studium. Eure unendliche Zuneigung, Anteilnahme und Wärme haben es stets geschafft, mich aus so manchem Tal der Verzweiflung herauszuholen. Danke dafür!