

Intrazelluläre Glutathionhomöostase

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Jan Seyfried

Tag der mündlichen Prüfung:

21. 11. 2001

Dekan:

Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

PD Dr. U. Wüllner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. K.-A. Kovar

For a long time I felt without style or grace

wearing shoes with no socks in cold weather

David Byrne

Mein Dank gilt allen, die mich bei dieser Dissertation unterstützten:

Herrn Professor Dr. T. Klockgether für die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit, diese unter seiner Leitung im Labor anfertigen zu können.

Herrn Professor K. A. Kovar für die Übernahme der naturwissenschaftlichen Zweitbetreuung und die Hilfe bei der Organisation des Rigorosums.

Herrn PD Dr. U. Wüllner für die Betreuung der Experimente, stete Diskussionsbereitschaft, ungezählte Anregungen und permanente Offenheit.

Herrn PD Dr. J. B. Schulz für die unkomplizierte Fortführung der Arbeit und Zusammenarbeit im Tübinger Labor.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährte Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“.

Allen Mitarbeitern der Tübinger und Bonner Neurologie-Labore, neben vielen anderen Bernd Ewert, Aleks Gleichmann, Frank P.H. Söldner für das angenehme und konstruktive Arbeitsklima, denn: „Mit vergnüglichen Experimenten macht auch die Wissenschaft Spaß“.

Schließlich meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums unterstützte, auch durch Korrekturlesen, Versorgung mit Literatur und Informationen, Überlassung von Autos und vieles mehr.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Reber U, Wullner U, Trepel M, Baumgart J, Seyfried J, Klockgether T, Dichgans J, Weller M.
Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine sulfoximine
in human malignant glioma cells: the role of bcl- 2.
Biochem Pharmacol. 1998; 55 (3): 349-59.

Wullner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M,
Loschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T.
Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and
mitochondrial function.
Brain Res. 1999; 826 (1): 53-62.

Seyfried J, Soldner F, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA, Wullner U.
Differential effects of L-buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on glutathione levels and
mitochondrial function in PC12 cells.
Neurosci Lett. 1999; 264 (1-3): 1-4.

Seyfried J, Soldner F, Kunz WS, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA, Wüllner U.
Effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium on glutathione in rat pheochromocytoma PC 12 cells.
Neurochem. Int. 2000; 36 (6): 489-497.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J.
Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.
Eur. J. Biochem. 2000; 267 (16): 4904-4911.

Seyfried J, Evert BO, Rundfeldt C, Schulz JB, Kovar KA, Klockgether T, Wullner U.
Flupirtine and retigabine prevent L-glutamate toxicity in rat pheochromocytoma PC 12 cells.
Eur. J. Pharmacol. 2000; 400 (2-3): 155-166.

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 4 |
| 2 | EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 | Glutathion | 5 |
| 2.2 | Transport von Glutathion | 6 |
| 2.3 | Oxidativer Streß | 10 |
| 2.3.1 | Reaktive Sauerstoffspezies | 10 |
| 2.3.2 | Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies | 12 |
| 2.3.3 | Antioxidative Verteidigungsmechanismen | 13 |
| 2.4 | Neurodegeneration | 14 |
| 2.4.1 | Mitochondrien | 18 |
| 2.4.2 | Alterungsprozesse | 19 |
| 2.5 | Problemstellung | 20 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 22 |
| 3.1 | Materialien | 22 |
| 3.2 | Geräte | 22 |
| 3.3 | Zellkulturen | 23 |
| 3.3.1 | Kultivierungsbedingungen | 24 |
| 3.3.2 | Messung der Überlebensrate | 25 |
| 3.3.3 | Messung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Streß | 26 |
| 3.3.4 | Glutathionbestimmung | 27 |
| 3.3.5 | Proteinbestimmung | 29 |
| 3.3.6 | Enzymaktivitäten | 30 |
| 3.3.7 | Messung des mitochondrialen Membranpotentials | 34 |
| 3.3.8 | Morphologische Charakterisierung des Zelltodes durch Transmissionselektronenmikroskopie und TUNEL-Färbung | 34 |
| 3.4 | Gewinnung mitochondrialer Fraktionen | 37 |
| 3.4.1 | Isolierung mitochondrialer Fraktionen aus Zellkulturen | 37 |
| 3.4.2 | Isolierung mitochondrialer Fraktionen aus Rattengehirnen | 43 |
| 3.5 | Messung des mitochondrialen Glutathiontransports | 52 |
| 3.6 | Statistik | 54 |
| 4 | ERGEBNISSE | 55 |
| 4.1 | Toxizität von L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure | 55 |
| 4.2 | Die Auswirkung von Komplex I-Inhibtion auf die zelluläre Glutathionhomöostase | 63 |
| 4.3 | Mitochondrialer Glutathiontransport | 76 |
| 4.4 | Antioxidative Protektion gegen durch L-Glutamat verursachten oxidativen Streß | 85 |
| 5 | DISKUSSION | 103 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.1 | Vergleich der Toxizität von L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure | 103 |
| 5.2 | Komplex I-Aktivität und oxidativer Streß: Ursache oder Wirkung | 108 |
| 5.3 | Mitochondrialer Glutathiontransport in Neuronen | 116 |
| 5.4 | Antioxidative Protektion gegen durch L-Glutamat verursachten oxidativen Streß | 123 |
| 5.5 | Fazit und Ausblick | 129 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 131 |

Verzeichnis häufig gebrauchter Abkürzungen:

| | |
|------------------|---|
| ABTS | 2,2'-Azinodi-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BSA | (engl.) bovine serum albumine, Rinderserumalbumin |
| BSO | L-Buthioninsulfoximin |
| CS | Citratsynthase |
| DCF | 2,7-Dichlorofluorescein |
| DMSO | Dimehtylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, cDNA: (engl.) komplementär-DNA |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagenz |
| dUTP | Deoxiuridin-5'-triphosphat |
| Dx | Dextran |
| EA | Etacrynsäure, 2,3-Dichlor-4-(2-ethylacryloyl)-phenoyl-essigsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| FCCP | Carbonylcyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon |
| GABA | γ-Aminobuttersäure |
| γ-GC | γ-Glutamylcystein |
| γ-GCS | γ-Glutamylcysteinylsynthetase |
| γ-GT | γ-Glutamyltransferase |
| GSH | γ-Glutamylcysteinylglycin, Glutathion; der Ausdruck „reduziertes Glutathion“ ist strenggenommen redundant |
| GSSG | Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[4-butansulfonsäure] |
| JC-1 | 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MDA | Malondialdehyd |
| MOPS | 3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure |
| MPP ⁺ | 1-Methyl-4-phenylpyridinium |
| MPTP | 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form), NAD ⁺ : oxidierte Form |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form), NADP ⁺ : oxidierte Form |
| NGF | (engl.) nerve growth factor |
| NMDA | N-methyl-D-aspartat |
| PC (12) | Phäochromocytom |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PBS | (engl.) phosphate-buffered-saline, 10 mM Na-Phosphat pH 7,4, 0,9 % NaCl |
| RNA | Ribonukleinsäure, mRNA: (engl.) messenger RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| SSA | 5-Sulfosalicylsäure |
| TBARS | Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen |
| Tris | Trihydroxymethylaminomethan |
| TUNEL | (engl.) <u>t</u> erminal deoxynuceotidyl-transferase mediated deoxy <u>U</u> ridintriphosphat <u>n</u> ick <u>e</u> nd labeling |

1 Zusammenfassung

In der Pathogenese vieler neurodegenerativer Prozesse im Rahmen von Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Schlaganfall wird oxidativem Streß eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Das Glutathionsystem ist als zentrale antioxidative Verteidigung der Zelle gegen reaktive Sauerstoffspezies von potentiell therapeutischem Interesse für diese degenerativen Prozesse, auch wenn die initiale Ursache des oxidativen Streß nicht in einer Dysfunktion des Glutathionsystems selbst liegt.

Experimente an neuronalen Zellkulturen demonstrierten, daß innerhalb der Zelle ein separat regulierter mitochondrialer Glutathionpool existiert, welchem herausgehobene Bedeutung in einer Glutathionmangelsituation der Zelle zukommt. Unter solchen Bedingungen sind Mitochondrien als Ort der oxidativen Phosphorylierung Ausgangspunkt einer oxidativen Zellschädigung. Im weiteren konnte gezeigt werden, daß eine milde Inhibition der mitochondrialen Atmung im Zellkulturmodell keinen oxidativen Streß und Verminderung der Glutathiongehalte verursacht. Dagegen erwies sich die Funktion des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette als sehr anfällig gegenüber thiol-inaktivierenden Molekülen und oxidativem Streß. Diese Befunde lassen eine Störung der Glutathionhomöostase, speziell auf mitochondrialer Ebene als Ursache einer oxidativen Zellschädigung wahrscheinlicher erscheinen als eine schleichende mitochondriale Dysfunktion. Die Existenz eines Glutathiontransports durch Mitochondrien isoliert aus Rattenhirngewebe wurde verifiziert und dessen Kinetik untersucht. Die erhaltenen Daten favorisieren ein Zusammenspiel mehrerer verschiedener Transportsysteme oder Untereinheiten gegenüber der Hypothese eines spezifischen Glutathiontransportproteins. Für das Überleben von Nervenzellen unter oxidativem Streß ist darüber hinaus auch das Zusammenwirken mit anderen Zelltypen im Hirngewebe von Bedeutung. In einem weiteren Modell von oxidativem Zelltod wurde der Nachweis erbracht, daß L-Glutamat, welches einigen Nervenzelltypen als Neurotransmitter dient, bei anderen Nervenzelltypen oxidativen Streß und Zelltod auszulösen vermag. Bei dieser Schadenskaskade üben offenbar geringe Mengen reaktiver Sauerstoffspezies eine Signal- und Verstärkerfunktion aus, die durch niedrige Konzentrationen der antioxidativ wirkenden Pharmaka Flupirtin (Analgetikum) und Retigabin (Antiepileptikum) aufgehalten werden kann. Diese antioxidative, neuroprotektive Wirkkomponente dieser Medikamente könnte auch für den therapeutische Einsatz bedeutsam sein.

2 Einleitung

2.1 *Glutathion*

Glutathion (GSH) ist ein ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vorkommendes Tripeptid γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, welches erstmals 1888 durch de Rey Pailhade beschreiben [1] und 1921 von Hopkins und Kendall aus Muskeln und Hefezellen isoliert und später auch synthetisiert wurde [2; 3]. Es stellt die überwiegende Menge an freien Thiolgruppen und ist gleichzeitig das häufigste niedermolekulare Peptid einer Zelle. In der Natur kommt ausschließlich die L,L-Form vor. Die zwei strukturellen Charakteristika des Glutathionmoleküls, seine γ -Glutamyl-Bindung und die Thiolgruppe, determinieren seine intrazelluläre Stabilität und seine zellulären Funktionen. GSH geht durch reversible Oxidation in Glutathiondisulfid (GSSG) über und stellt dadurch ein Puffersystem für das Redoxmilieu einer Zelle dar. Das Thiol-Disulfid Gleichgewicht innerhalb der Zelle reguliert verschiedenste zelluläre Prozesse, hierzu zählen die Aktivitäten von Enzymen und Transportproteinen und die Expression von Genen durch Modulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren. Für die Konformation von Proteinen essentielle Thiol-Gruppen werden durch GSH geschützt bzw. durch Reduktion, katalysiert von Glutathion-transhydrogenasen (EC 1.8.5.1), wiederhergestellt. Ebenso werden Peroxide und Radikale unter Katalyse der Selen-haltigen Glutathionperoxidase (EC 1.11.1.9) und verschiedener Glutathion-S-transferasen (EC 2.5.1.18) reduziert und entgiftet. Durch die NADPH-abhängige, Flavin-haltige Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2) wird GSSG wieder zu GSH reduziert. Die Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe durch Eliminierung als meist wasserlösliche, nichttoxische S-substituierte Acetylcysteinderivate wird durch Glutathion-S-transferasen (EC 2.5.1.18) eingeleitet. Diese katalysieren die nukleophile Reaktion der Thiolgruppe des Glutathions mit einer ganzen Anzahl von Verbindungen, die elektrophile Zentren aufweisen. Obwohl diese Reaktion einerseits der Entgiftung zahlreicher Xenobiotika dient, wirken andererseits manche GSH-Konjugate entweder direkt oder nach Abbau zum L-Cysteinylderivat, nach Abspaltung von L-Glutaminsäure und Glycin, toxisch [4]. Eine wichtige Rolle spielt GSH auch als Cofaktor bei der Biosynthese von Leukotrienen. Neuere Untersuchungen spekulieren über eine Funktion des Glutathions bei Neurotransmission im Zentralnervensystem [5], entweder als Ligand von synaptischen Rezeptorproteinen oder durch Modulation der Spezifität und Erregbarkeit von Rezeptorproteinen über redox-sensitive, Thiolgruppen-haltige Domänen dieser Rezeptoren.

2.2 Transport von Glutathion

Der von A. Meister aufgeklärte γ -Glutamyl-Zyklus ermöglicht über Synthese und Abbau von GSH den energiegetriebenen Transport von Aminosäuren und niedermolekularen Peptiden in die Zelle [6]. GSH wird durch enzymatische Verknüpfung der Aminosäuren L-Glutaminsäure und L-Cystein durch das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase (EC 6.3.2.2) und die darauffolgende Kondensation mit Glycin durch Glutathionsynthetase (EC 6.3.2.3) synthetisiert. Bei beiden Schritten wird die nötige freie Enthalpie durch gekoppelte Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen. Die ungewöhnliche Verknüpfung des aminoterminalen L-Glutamat über die γ -Carboxylgruppe verleiht dem Tripeptid eine hohe Stabilität gegen Hydrolyse durch intrazelluläre Peptidasen. Extrazelluläres GSH wird durch das auf der Außenseite der Zellmembran lokalisierte Enzym γ -Glutamyl-transpeptidase (EC 2.3.2.2) gespalten, welches die γ -Glutamylgruppe auf eine andere (externe) Aminosäure überträgt. Die neugebildete γ -Glutamylaminosäure kann ebenso wie das verbliebene Cysteinyglycin-Dipeptid von der Zelle aufgenommen werden und wird dort durch γ -Glutamyl-cyclotransferase in die entsprechende Aminosäure und 5-Oxo-L-prolin gespalten. Die Hydrolyse von 5-Oxo-L-prolin zu L-Glutamat durch 5-Oxo-prolinase ist wiederum ATP-abhängig.

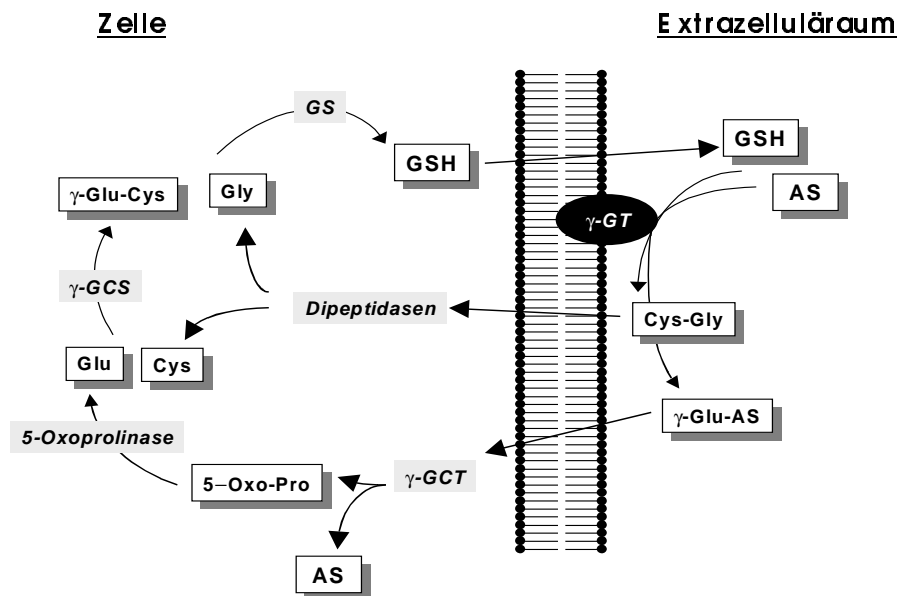


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des γ -Glutamylzyklus nach Meister et al [6]. γ -GCS: γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase, GS: Glutathion-Synthetase, γ -GT: γ -Glutamyl-Transpeptidase, γ -GCT: γ -Glutamyl-Cyclotransferase, AS: Aminosäure

Während die intrazellulären GSH-Konzentrationen in Säugerzellen im millimolaren Bereich liegen (0,5-10 mM), finden sich im Blutplasma micromolare Konzentrationen. Eine markante Erhöhung der GSH-Plasmaspiegel wird erzielt durch intravenöse Gabe von Inhibitoren der γ -Glutamyl-transpeptidase in Tieren [7] und wurde ebenso im Fall eines Defekts dieses Enzyms im Menschen festgestellt [8]. Zusammen mit dem Befund einer Erniedrigung der GSH-Plasmaspiegel nach Gabe von Inhibitoren der GSH-Synthese in Nagern [4] deuten diese Studien daraufhin, daß es einen hohen Umsatz von GSH im Blutkreislauf gibt, und daß GSH in Form der Produkte der Spaltung durch γ -Glutamyl-transpeptidase aufgenommen wird. Die Hauptquelle des GSH im Plasma ist die Leber, auf bereits bekannte Transportproteine in den verschiedenen Zelltypen der Leber wird nachfolgend noch genauer eingegangen. Alle Zelltypen, welche eine hohe γ -Glutamyl-transpeptidase-Aktivität aufweisen, können somit GSH, bzw. die nach Spaltung durch γ -Glutamyl-transpeptidase entstehenden einzelnen Aminosäuren und γ -Glutamyl-Aminosäure-konjugate aus dem Blut verwerten. Ein großer Teil des in das Plasma exportierten GSH wird von den Nieren verbraucht, diese sind ebenso wie die Leber Ort vieler Entgiftungsreaktionen.

Unter normalen, physiologischen Bedingungen liegt innerhalb einer Zelle über 99 % des Gesamt-Glutathions als reduzierte Form mit freier Thiolgruppe (GSH) vor, der Rest als oxidiertes Disulfid GSSG, im Plasma beträgt der Anteil von GSH über 90 % [9]. Dieses Verhältnis ist unter Bedingungen von oxidativem Streß zu höheren Anteilen von GSSG verschoben. Da GSSG im Überschuß selbst Thiolgruppen oxidieren und somit schädlich für viele zelluläre Funktionen und Proteine wirken kann, existiert in einigen Zelltypen ein ATP-abhängiger Exportmechanismus für GSSG, am besten charakterisiert in Erythrozyten [10], dem Epithel der Linse [11] und in Hepatozyten [12]. Insbesondere Erythrozyten benötigen hohe Spiegel an GSH um das bei Oxidation des Eisenatoms des Hämoglobins entstehende Superoxid zu entgiften. Die Hauptexportform ist in Säugerzellen jedoch GSH, dieser Mechanismus dient dem Austausch und Transport von L-Cystein bzw. des Schwefels zwischen Organen und Zelltypen. Für viele Stoffwechselschritte, unter anderem auch für die Synthese von GSH, ist L-Cystein die limitierende Aminosäure. L-Cystein selbst ist in hohen (millimolaren) Konzentrationen toxisch und empfindlich gegenüber Autooxidation, es wird daher als GSH oder weniger reaktives Disulfid Cystin zwischen Organen und Zellen transportiert Innerhalb der Zelle hat GSH auch die Funktion einer stabilen Speicherform für L-Cystein [4].

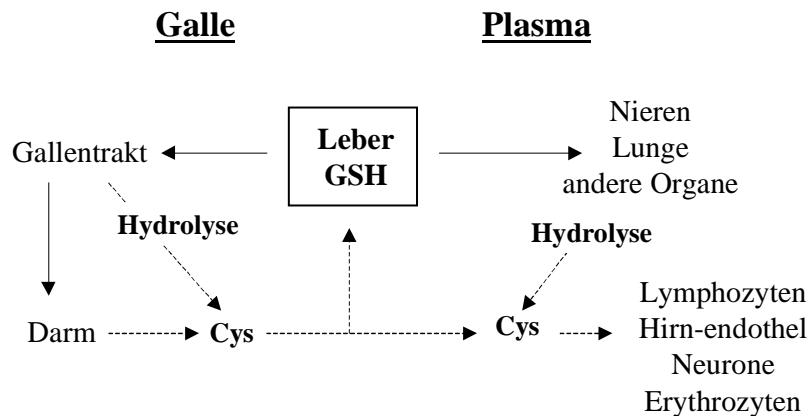


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der zentralen Rolle der Leber für die Interorganhomöostase von Glutathion und L-Cystein. Die Leber exportiert GSH in die Gallenflüssigkeit und in den Blutkreislauf, darüberhinaus dienen die Hydrolyseprodukte der Versorgung anderer Zelltypen mit Cystein.

Es sind bislang zwei plasmamembranständige vermeintliche GSH-Transportproteine in Hepatozyten beschrieben [13; 14], die sich bezüglich ihrer Lokalisation hinsichtlich der Polarität der Leberzelle, ihrer Kinetik und der Inhibition durch verschiedene GSH- und Cystein-Analoga unterscheiden. Die Sequenzanalyse von aufgereinigter mRNA, welche die Expression dieser GSH-Transport-assoziierten Polypeptide in *Xenopus laevis* Eizellen vermittelt, ergab eine hohe Homologie zwischen beiden Proteinen und ein Hydropathiemuster ähnlich dem integraler Membranproteine, aber keine Homologien zu anderen, bekannten (Membran)Proteinen. Auf Transkriptionsebene konnte die mRNA des basolateralen (sinusoidalen) vermeintlichen GSH-Transporters ausschließlich in der Leber nachgewiesen werden, wogegen das Transkript des apical lokalisierten (canalicularen) vermeintlichen GSH-Transporters in vielen Gewebetypen gefunden wurde. Dies erscheint insofern plausibel, da der sinusoidale GSH-Export der Leber wesentlich den GSH-Plasmaspiegel des Blutes aufrecht erhält. Ein GSH-Transport über Plasmamembranen ist ebenso im Epithel der Niere, alveolaren Zellen, dem Bluthirnschrankenendothel [15] und im Epithel der Linse [16] beobachtet worden. Die Funktion solcher Transporter wäre in der Aufnahme von GSH aus dem Plasma (micromolare Konzentrationen) in die Zelle (millimolare Konzentrationen) zu vermuten. Jedoch ist bislang noch kein solches GSH-spezifisches Transportprotein molekular bzw. biochemisch identifiziert worden. Es bleibt also die Möglichkeit offen, daß ein Transport

von GSH durch Membranproteinkomplexe bewerkstelligt wird, die aus Untereinheiten bekannter Transporter zusammengesetzt sind. Deren Spezifität würde durch unterschiedliche Komposition solcher Untereinheiten reguliert. Eine GSH-Transport-vermittelnde mRNA Spezies könnte demnach für eine bislang nicht bekannte Untereinheit eines anderen, multifunktionellen Transporters kodieren.

Für die intrazelluläre Glutathionhomöostase gilt, daß eine Reihe von biochemischen Befunden [17], insbesondere die deutlich verschiedenen Halbwertszeiten von mitochondrialem und cytosolischem Glutathion [18], die Existenz eines separaten mitochondrialen Glutathionpools nahelegen. Mit Hinblick auf oxidativen Streß besonders bedeutsam könnte ein mitochondrial lokalisierter GSH-Transporter sein, der ebenfalls aufgrund von mRNA-Expressionsstudien an *Xenopus laevis* Oocyten vermutet wird [19; 20]. Funktionell wurde dieser Transport bislang an Mitochondrien aus der Leber [21][19] und aus der Niere [22; 23] charakterisiert. Kinetische und pharmakologische Daten ergeben ein von bekannten, plasmamembranständigen GSH-Transportern abweichendes Bild. Ein solcher mitochondrialer Glutathionvorrat hätte erhebliche Bedeutung für die Verteidigung der gesamten Zelle gegen oxidativen Streß, da:

1. Mitochondrien zur Entgiftung der durch normale Respiration entstehenden, basalen Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere H_2O_2 in hohem Maße von GSH abhängen,
2. Mitochondrien (und somit die zelluläre ATP-Produktion) empfindlich gegen oxidativen Streß sind und viele Toxine oder toxische Metaboliten die mitochondriale Elektronentransportkette schädigen und so ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies verursachen.

Dies gilt besonders für Nervenzellen: Neurone haben eine vergleichsweise hohe Rate an oxidativem Stoffwechsel und zahlreiche Studien belegen die Vulnerabilität von Neuronen gegen experimentell herbeigeführte Verminderung der zellulären Glutathionspiegel *in vitro* und *in vivo*. Innerhalb des Gehirns spielen Astrogliazellen eine wichtige Rolle bei der Versorgung neuronaler Zellen mit GSH. Diese Zellen enthalten wesentlich mehr GSH und höhere Aktivitäten der Enzyme des γ -Glutamylzyklus bzw. der Glutathionsynthese als Neuronen [24; 25]. Zudem können Nervenzellen extrazelluläres GSH und auch Cystin nur in geringem Ausmaß verwerten, so daß sie hauptsächlich Vorstufen wie Cysteinyl-Glycin und die einzelnen Aminosäuren aufnehmen, welche im Interstitium durch Hydrolyse von astroglial exportiertem GSH entstehen [26]. Durch diesen Mechanismus werden wiederum hohe Konzentrationen von L-Cystein vermieden, die insbesondere für dopaminerge Neurone

toxisch sind, da Zwischenstufen der Dopaminsynthese wie Semichinone über das Schwefelatom des L-Cysteins toxische Addukte bilden können [27].

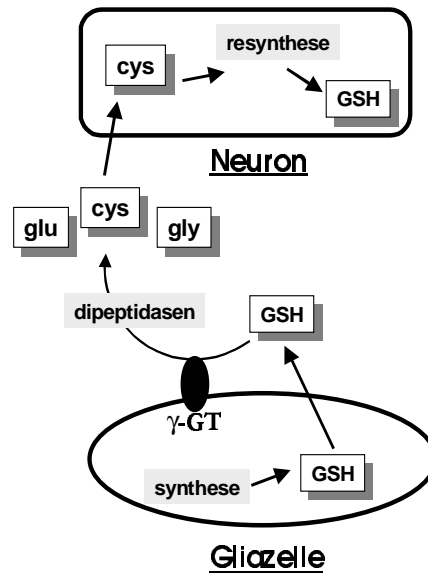


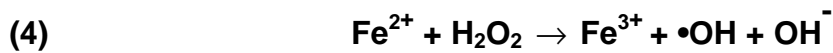
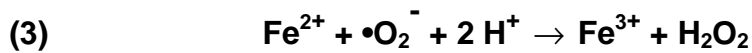
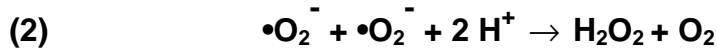
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Interaktion von Nervenzellen und Gliazellen bei der Aufrechterhaltung neuronalen GSHs. Gliazellen exportieren GSH, nach Hydrolyse durch γ -Glutamyltransferase (γ GT) und Dipeptidasen sind Neurone in der Lage, dipeptidische Vorstufen und Aminosäuren wiederaufzunehmen.

2.3 Oxidativer Streß

2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Die oxidative Phosphorylierung gewinnt Energie aus der Übertragung von Wasserstoff auf Sauerstoff. Die Enzyme der mitochondrialen Elektronentransportkette oxidieren Reduktionsequivalente in Form von NADH und Succinat und bilden im letzten Schritt, katalysiert durch Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV), aus molekularem Sauerstoff in einer Vierelektronenreduktion Wasser. Man schätzt, daß ca. 1,5 % der transportierten Elektronen jedoch von den mobilen Elektronenüberträgermolekülen in der inneren Mitochondrienmembran (Ubichinon, Cytochrom C) in Ein-Elektronen-Übertragungsreaktionen auf molekularen Sauerstoff gelangen (Gleichung 1) [28]. Dadurch entsteht das Superoxid-Radikalanion, dieses ist der Ausgangspunkt für eine ganze Reihe von

Radikal-Übertragungs- und Oxidationsreaktionen, die weitere reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) hervorbringen [29]:



Das Superoxid-Radikalanion $\bullet\text{O}_2^-$ ist bei physiologischem pH-Wert wenig reaktiv, zudem ist seine Diffusion durch lipophile Membranen innerhalb der Zelle infolge der Ladung des Moleküls sehr eingeschränkt. Hinzu kommt, daß es sehr schnell spontan oder enzymkatalysiert durch Superoxid-Dismutasen nach Gleichung (2) disproportioniert, so daß seine direkte Toxizität auf die unmittelbare zelluläre Umgebung seiner Entstehung beschränkt bleibt [30].

Wasserstoffperoxid H_2O_2 weist kein einfach besetztes Molekülorbital auf, ist also kein Radikal im Sinne der Definition, kann jedoch eine Vielzahl biologischer Verbindungen oxidieren und ist als ungeladenes Molekül vergleichsweise gut membrangängig. Daher wird es ebenfalls in der Bezeichnung „reaktive Sauerstoffspezies“ eingeschlossen. Unter Katalyse von Übergangsmetallkationen kann Wasserstoffperoxid heterolytisch in ein Hydroxylanion und ein Hydroxylradikal gespalten werden, im Falle von zweiwertigem Eisen spricht man von der „Fenton-Reaktion“ [31].

Das Hydroxylradikal $\bullet\text{OH}$ ist das bei weitem reaktivste Molekül dieser Reihe. $\bullet\text{OH}$ diffundiert in der Umgebung einer Zelle nur wenige Moleküldurchmesser weit, bevor es eine Reaktion eingeht, die häufig in der Abstraktion eines Wasserstoffradikals oder der Oxidation einer Doppelbindung besteht [32]. Da viele biologischen Makromoleküle, d.h. DNA, Proteine, membranständige Lipide, bei physiologischem pH negativ geladene Gruppen tragen, an denen wiederum Metallkationen komplexiert vorliegen, findet oft die Zersetzung des Wasserstoffperoxids und die darauffolgende Reaktion des Hydroxylradikals am selben Ort innerhalb der Zelle statt, sog. „site specific reactions“ [33].

Stickstoffmonooxid $\bullet\text{NO}$ ebenfalls ein Radikal, ist als Botenstoff an zahlreichen wichtigen physiologischen Funktionen beteiligt. Dazu zählen Modulation des Gefäßtonus durch Regulation der Kontraktion endothelialer Muskelzellen, transsynaptische Regulation komplexer Nervenzellfunktion wie synaptischer Plastizität und Langzeitpotenzierung sowie die Phagozytierung von Fremdorganismen durch aktivierte Makrophagen [34; 35]. Im Gegensatz zu anderen reaktiven Sauerstoffspezies wird es durch ein spezielles Synthesenzym, Stickstoffmonooxid-Synthase, aus der Aminosäure Arginin unter Entstehung von Citrullin gebildet. Von diesem Enzym existieren gewebsspezifische Isoformen. Seine Funktionen als Botenstoff kann Stickstoffmonooxid ausüben, weil es als ungeladenes Molekül gut durch Membranen diffundieren kann. Bei der Immunantwort bildet es zusammen mit Superoxid, welches z. B. ebenfalls von aktivierten Makrophagen erzeugt wird, Peroxynitrit ONOO^- (Gleichung 6) [36]. Nach Protonierung kann dieses Molekül leicht homolytisch in Stickstoffdioxid und ein Hydroxylradikal gespalten werden. Diese somit hochtoxische Verbindung wird auch in vielen pathologischen Prozessen, vor allem bei Beteiligung des Immunsystems (Autoimmunerkrankungen, septischer Schock) als zentrale Komponente einer oxidativen Zellschädigung vermutet. Prinzipiell kann dies aus einer Überaktivität einer Stickstoffmonooxid-Synthase oder einer exzessiven Bildung von Superoxid herrühren, in vielen Erklärungsmodellen von Erregungstoxizität in Neuronen oder überschießenden Entzündungsreaktionen werden beide Mechanismen als synergistisch wirkend angesehen.

Neben den Enzymkomplexen der mitochondrialen Atmungskette und den verschiedenen Stickstoffmonooxid-synthetisierenden Enzymen existieren im Organismus noch weitere Quellen reaktiver Sauerstoffspezies. Zu nennen sind hier metabolischen Schritte unter Beteiligung von Oxidasen wie Xanthin-Oxidase, Cytochrom-P450-Oxidasen und NADPH-Oxidasen. Für catecholaminerger Neuronen insbesondere bedeutsam könnte das Enzym Monoamin-Oxidase sein. Es katalysiert die oxidative Desaminierung primärer Amine zu Aldehyden, dabei wird aus Sauerstoff in einer Zweielektronen-Reduktion Wasserstoffperoxid gebildet. Wie bereits erwähnt, ist Wasserstoffperoxid in der Lage, durch Membranen zu diffundieren, zusammen mit der Lokalisation des Enzyms in der äußeren Mitochondrienmembran wird dieses Enzym als eine Ursache für die besondere Vulnerabilität bestimmter dopaminerger Neuronen vermutet.

2.3.2 Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies

Die chemische Natur eines radikalischen Moleküls oder Atoms ist sein starkes Bestreben, das ungepaarte, einzelne Elektron in ein zweifach besetztes Orbital zu überführen. Diese hohe und

dadurch unselektive Reaktivität macht ein Radikal ungeachtet seiner sonstigen Struktur zu einem zwangsläufig schädlichen Teilchen innerhalb eines komplexen und in hohem Maße untereinander verknüpften Systems wie dem der lebenden Zelle. Man kennt heute einige der Reaktionen und Reaktionsprodukte, die zwischen Zellbestandteilen und reaktiven Sauerstoffspezies ablaufen. Das Grundgerüst aller Biomembranen wird aus Ketten (mehrfach) ungesättigter Fettsäuren aufgebaut, sie sind häufig Reaktionspartner von ungeladenen Molekülen wie $\bullet\text{OH}$ und H_2O_2 . Der erste Schritt ist die Abstraktion eines Wasserstoffradikals oder die Oxidation/Epoxidierung einer Doppelbindung der Fettsäurekette. Weitere Reaktionen bilden dann Alkyl/Alkenradikale und radikalische Peroxide, am Ende dieses oxidativen radikalischen Abbaus der Fettsäurekette stehen kurzkettige, z.T. bifunktionelle Aldehyde wie Malondialdehyd. Der Verlust von Doppelbindungen in der Fettsäurekette eines Membranlipids bedingt einen Anstieg des Schmelzpunktes und somit einen Verlust der Fluidität der Membran, welche Bedingung für nahezu alle Austauschprozesse zwischen Zellen und Kompartimenten innerhalb einer Zelle ist. Weiterhin können auch reaktive Produkte der Lipidperoxidation Zellschäden nach sich ziehen, insbesondere Aldehyde wie das Zwischenprodukt 4-Hydroxynonenal sind in der Lage, Amino- oder Thiol-Gruppen von Proteinen zu alkylieren und zu oxidieren mit der Folge des Verlusts der Konformation oder Aktivität des betreffenden Proteins. Schäden an der Peptidkette von Strukturproteinen oder Enzymen können ebenso von reaktiven Sauerstoffspezies direkt verursacht werden. Primäre Oxidation vor allem durch $\bullet\text{OH}$ kann weiterhin Punktmutationen der DNA erzeugen und auch die Struktur der DNA-Doppelhelix verändern. Die Folge sind Funktionsverlust oder völliges Fehlen der Genprodukte. Wenn das Ausmaß der Schäden eine bestimmte Grenze, im Falle der DNA z.B. die Kapazität von Reparaturenzymen im Zellkern, überschreitet, so lösen viele Zelltypen Apoptose aus. Dieser programmierte Zelltod entspricht einem kontrollierten Selbstabbauprozess, der entzündliche Reaktionen im Gewebe vermeiden soll. Es sind unzählige Stimuli für Apoptose in den verschiedensten Zelltypen beschrieben, neben der Akkumulation von Reaktionsprodukten reaktiver Sauerstoffspezies wird auch eine direkte Interaktion von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren mit reaktiven Sauerstoffspezies als Auslöser von Apoptose diskutiert.

2.3.3 Antioxidative Verteidigungsmechanismen

Eukaryontische Zellen haben eine Reihe von antioxidativen Schutzmechanismen gegen die toxische Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels entwickelt. Zum einen sind dies Enzyme, welche detoxifizierende Reaktionen reaktiver Sauerstoffspezies katalysieren, zum anderen

niedermolekulare Antioxidantien, welche direkt mit reaktiven Sauerstoffspezies reagieren. Superoxid-Dismutasen katalysieren die Disproportionierung zweier Superoxidradikale nach Gleichung (2). Diese Enzyme finden sich evolutionär konserviert in allen eukaryontischen Zellen, was die Notwendigkeit der Neutralisierung von Superoxid für aerobes Leben belegt. Neben einer cytosolischen Isoform, die ein Kupfer- und ein Zink-Atom im aktiven Zentrum trägt, existiert eine in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Isoform, welche ein Mangan-Atom im katalytischen Zentrum aufweist. Das bei der Reaktion (Gleichung 2) anfallende Wasserstoffperoxid kann durch zwei Enzyme entgiftet werden: Glutathion-Peroxidasen (GPX) und Katalase. Erstere katalysieren die Reduktion von Peroxiden zu Wasser bzw. Alkoholen unter Oxidation von zwei Molekülen reduziertem Glutathion (GSH) zu einem Molekül oxidiertem Glutathiondisulfid (GSSG). Die Regeneration des oxidierten Glutathions geschieht, wie bereits erwähnt, durch Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH. Eine Isoform der Glutathion-Peroxidase mit einer Präferenz für wasserlösliche Peroxide, insbesondere H_2O_2 , wurde bislang in allen Zellkompartimenten nachgewiesen, daneben existieren aber noch weitere Isoformen unter anderem in Phospholipidmembranen. Katalase katalysiert ausschließlich die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Dieses Enzym ist hauptsächlich in Peroxisomen gefunden worden, in diesen Zellorganellen findet auch ein Großteil der β -Oxidation von Fettsäuren statt. Auch Mitochondrien bauen oxidativ Fettsäuren ab, dort wurde jedoch in geringerem Ausmaß Katalase-Aktivität nachgewiesen. Für die Detoxifikation von Peroxiden in Cytosol und Mitochondrien scheinen daher Glutathion-Peroxidasen und Glutathion das bedeutsamste Enzymsystem zu sein.

Neben diesen Enzymsystemen existieren eine Reihe niedermolekularen Antioxidantien: Ascorbat und α -Tocopherol, weiterhin β -Carotinoide, Thioctsäure, Flavonoide sowie Metaboliten wie Harnsäure und Bilirubin. Während Thioctsäure eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann, beruht die Schutzwirkung der übrigen Substanzen auf ihrem Vermögen, ein nach Oxidation durch ein Radikal verbliebenes einzelnes Elektron in einem System konjugierter π -Elektronen mesomeriestabilisieren zu können. So wirkt das lipophile α -Tocopherol (Vitamin E) gleichsam als Kettenabbruchsreagenz der Lipidperoxidation von Membranen, an der Grenzschicht zur wässrigen Phase kann es durch Ascorbat (Vitamin C) regeneriert werden.

2.4 Neurodegeneration

Das Gehirn verbraucht im Ruhezustand etwa 20 % des aufgenommenen Sauerstoffs eines Erwachsenen, obwohl es nur ca. 2 % des Körpergewichts ausmacht. Das Hirngewebe und insbesondere Nervenzellen zeichnen sich also gegenüber anderen Organen und Zelltypen durch eine hohe Respirationsgeschwindigkeit aus und sind daher sehr empfindlich gegenüber Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks und Glukosespiegels des Blutes. Diese hohe Rate an oxidativem Metabolismus bedeutet einerseits ein hohes basales Niveau an reaktiven Sauerstoffspezies wie auch einen entsprechenden Bedarf an Verteidigungsmechanismen wie antioxidativ wirkenden Molekülen und Enzymen und eine besondere Vulnerabilität gegenüber einem Mangel oder Nichtfunktionieren solcher Schutzfunktionen. Gerät das Verhältnis von reaktiven Sauerstoffspezies und zellulären Verteidigungsmechanismen aus dem Gleichgewicht des Normalzustands, resultiert eine vermehrte Schädigung von Zellbestandteilen durch reaktive Sauerstoffspezies: oxidativer Streß. Es gibt zahlreiche Belege für das Auftreten von oxidativem Streß bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen [37]. Diese Vielzahl solch unterschiedlicher Erkrankungen mit verschiedenen betroffenen Nervenzellpopulationen schließt jedoch gleichzeitig oxidativen Streß als einzige oder primäre Ursache aus. Beispiele hierfür sind:

| Krankheit | Betroffene Zellpopulationen | Epidemiologie / Genetik | Belege für oxidativen Streß |
|----------------------------------|--|--|---|
| Huntingtonsche Erkrankung | γ -Aminobuttersäure- (GABA)-erge Projektionsneurone des Striatums | Autosomal-dominante Vererbung einer Polyglutaminrepeat-Expansion des <i>Huntingtin</i> -Gens | DNA-Schädigung: 8-Hydroxy-2-deoxyguanosin (8OHdG) [38], Protein- und Lipidoxidationsprodukte [39; 40] |
| Parkinsonsche Erkrankung | Dopaminerge Neurone der Substantia nigra | Sporadische Form: über 60 %, polygenetisch ? | Glutathionspiegel vermindert, Lipidperoxidation, gesteigerter Eisengehalt, DNA-Schädigung (8-OHdG) [41; 42] |
| Multisystematrophie (MSA) | (u.a.) Neurone der Basalganglien, des Cerebellums und des Rückenmarks. Gliose mit Einschlüssen in Oligodendrocyten | Sporadisch, polygenetisch ? | Lipidperoxidationsprodukte, oxidative Modifikation von Proteinaggraten (Einschlüsse) [43; 44] |
| Friedreichs Ataxie | Atrophie der Kleinhirnrinde, der Pyramidenbahn und spino-zerebellärer Bahnen | Autosomal-rezessive Vererbung einer GAA-Repeatexpansion des <i>Frataxin</i> -Gens | DNA-Schädigung (8OHdG), Störung der mitochondrialen Eisenhomöostase [45; 46] |

Tabelle 2-1: Einige neuronale Erkrankungen mit unterschiedlichen, betroffenen Zellpopulationen unter Auftreten von oxidativem Stress.

Neuere Erkenntnisse über den spezifischen Metabolismus und die unterschiedlichen Genexpressionsmuster solcher Nervenzellpopulationen und Hirngebiete weisen auf genetische Faktoren (Mutationen) als Determinanten für die selektive Schädigung bestimmter Nervenzelltypen in den jeweiligen Krankheitsbildern hin. Gleichwohl wird oxidativer Streß als wichtiger Faktor in der Pathogenese vieler degenerativer Krankheiten angesehen, sei es als den Zelluntergang auslösendes oder förderndes Moment. Ein wichtiges Konzept für Prozesse, welche die molekulare und zelluläre Grundlage von Neurodegeneration bilden, ist

das der Erregungs – oder auch Exzitotoxizität. Sie wird verursacht durch eine anhaltende Depolarisation der Membran eines postsynaptischen Neurons infolge Überaktivierung von N-methyl-D-aspartat(NMDA)-Rezeptoren für Neurotransmitter wie L-Glutamat. Darauf folgt ein vermehrter Einstrom von Natrium- und Chlorid-Ionen in die Zelle und schließlich eine Schwellung durch Wassereinstrom. Diese gestörte Ionenhomöostase verursacht einen Einstrom von Calciumionen und Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher und daher einen Anstieg auch der Ca^{2+} Konzentration. Viele Enzyme, welche Abbaureaktionen von Zellbestandteilen katalysieren und im Übermaß schädliche Metaboliten produzieren, sind in ihrer Aktivität Calcium-abhängig. So z. B. Stickstoffmonooxid-Synthase, Phospholipasen, Xanthin-Oxidase, Endonukleasen und Proteasen. Mitochondrien sind empfindlich gegen Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels, auch hier ist eine Membrandepolarisation das Resultat. Die Schadenskaskade hat die Charakteristika eines sich selbst verstärkenden Circulus vitiosus, weil der Abfall der mitochondrialen ATP-Produktion zur Energieverarmung und weiterer Membrandepolarisation der Zelle führt. Weiterhin hat eine Schädigung der Enzyme der mitochondrialen Elektronentransportkette, die z. T. aufgrund ihrer Eisen-Schwefel-Cluster-Untereinheiten sehr anfällig gegen eine Veränderung des Redoxniveaus und der Membranstruktur sind, eine weitere Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zufolge. Können nämlich die am Ende der Elektronentransportkette stehenden Enzyme, Komplex III (Cytochrom C Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) nicht mehr ihre Funktion ausüben, so kommt es zu einer deutlich erhöhten Konzentration und Verweilzeit reduzierter Elektronencarrier-moleküle wie Ubichinol in der Membran und zu einer vermehrten Übertragung dieser Elektronen auf molekularen Sauerstoff, d. h. zur Bildung von Superoxid $\bullet\text{O}_2^-$ mit allen Folgereaktionen die in Abschnitt 2.3 dargestellt sind. Im Falle von Exzitotoxizität sind reaktive Sauerstoffspezies demzufolge mehr eine Wirkung als Ursache von Neurodegeneration. Die mitochondriale Schädigung kann durch zu hohe Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt, z.B. bei cerebraler Ischämie oder Neurotrauma, durch Veränderungen des NMDA-Rezeptors selbst oder auch durch Energiemangel des Neurons infolge gesteigerter metabolischer Anforderungen oder eines Stoffwechseldefekts ausgelöst werden.

Solche Szenarien der Energieverarmung von Nervenzellen sind jedoch auch ohne den Auslöser der Überaktivierung eines Rezeptors denkbar. Ein Beispiel dafür ist die Parkinsonsche Erkrankung, die durch einen selektiven Verlust melaninhaltiger, dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta charakterisiert ist. Die Parkinsonsche Erkrankung ist die häufigste neurologische Erkrankung im Alter, sie betrifft über 1 % aller

Menschen älter als 55 Jahre. Es gilt als gesichert, daß oxidativer Streß eine wichtige Rolle in der Entstehung und Verlauf dieser Krankheit spielt. Untersuchungen an post mortem Gewebe von Patienten und an Tiermodellen der Parkinsonschen Krankheit haben in der Substantia nigra erhöhte Konzentrationen von Lipidperoxidationsprodukten, Eisen und oxidative DNA-Schäden nachgewiesen. Auch wurden in diesen und in Gewebe von Patienten mit einer präsymptomatischen Form des Morbus Parkinson, der sog. incidental Lewy body disease, ein verminderter Gehalt an GSH in den betroffenen Hirnarealen ermittelt [47; 48]. Weiterhin wurde im Gewebe der Substantia nigra wie auch in Lymphozyten von Parkinson-Patienten eine verringerte Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette gemessen [49; 50]. Die Minderfunktion dieses mitochondrialen Enzyms wird, wie das gesamte mitochondriale Genom, maternal vererbt [51]. Dieser Vererbungsmechanismus wäre mit der nicht-mendelschen Epidemiologie des Großteils der Parkinson Erkrankungen vereinbar. Dagegen konnte in einigen Fällen von familiärem Parkinson eine autosomal dominante Vererbung einer Mutation des α -Synuclein Gens identifiziert werden [52], welche in Tiermodellen eine entsprechende Nervenzelldegeneration und motorische Symptome hervorruft [53]. Mehrere mögliche Entstehungswege, die zu diesen pathologischen Veränderungen führen, werden diskutiert:

- Eine Verminderung der Fähigkeit der dopaminergen Neuronen, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften, durch einen genetisch oder anders bedingten Defekt in einem der Enzyme des Glutathionsystems oder der Entgiftungsmechanismen. Für diesen Ansatz spricht vor allem, daß die Verminderung des nigralen GSH früher als die übrigen der festgestellten biochemischen Veränderungen auftritt [48].
- Eine gesteigerte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies kann durch einen Defekt in einer der in 2.3.1 genannten physiologischen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies, in erster Linie Mitochondrien, verursacht sein.

Zusammen mit vielen anderen Erklärungsansätzen, z.B. chronisch verlaufenden Entzündungsprozessen, würden solche Vorgänge sich natürlich gegenseitig schnell verstärken, so daß es anhand der post mortem erhobenen Daten schwierig ist, zu beurteilen, welches Moment in der Entstehung von Zelluntergang in dieser Krankheit überwiegt.

2.4.1 Mitochondrien

Vieles deutet jedoch darauf hin, daß den Mitochondrien innerhalb der Zelle entscheidende Bedeutung zukommt. Zum einen führt eine mitochondriale Dysfunktion zu oxidativem Streß, da viele Reaktionen wie die der Glutathionsynthese und die Homöostase von Ionen wie

Calcium, ATP-abhängig sind. Zum anderen sind Mitochondrien selbst empfindliche Ziele von reaktiven Sauerstoffspezies. Eine Schädigung der Enzyme der mitochondrialen Elektronentransportkette kann wie bereits erwähnt die Entstehung weiterer Radikale begünstigen, zumindest jedoch die ATP-Produktion vermindern. Die mitochondriale DNA, welche für Teile der mitochondrialen Atmungsenzyme codiert, ist aufgrund der räumlichen Nähe und des Fehlens von Histonproteinen und Introns [54] besonders anfällig gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Vergleichende Untersuchungen von Mitochondrien aus der Leber und dem Gehirn der Ratte haben erwiesen, daß diese Organellen aus dem Gehirn größere Anteile von infolge oxidativen Streß geschädigter DNA enthalten, als Mitochondrien aus Lebergewebe [55]. Die erhöhte Belastung von Mitochondrien durch oxidativen Streß im Vergleich zur gesamten Zelle spiegelt sich ebenfalls in Parametern wie der Ratio von oxidiertem Glutathion (GSSG) zum gesamten Glutathion [56], dem Anteil oxidierter Nukleotide der DNA [57] und auch Veränderung der Membranlipidkomposition wider [58]. Diese Faktoren können auf transkriptioneller Ebene, auf Ebene der Enzymaktivitäten und auf struktureller Ebene der Mitochondrien synergistisch oder nacheinander zu einem Funktionsverlust führen. Interessanterweise hemmt das selektive, dopaminerge Neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bzw. sein aktiver Metabolit 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Diese Substanz wird durch einen Monoamintransporter in dopaminerge Neurone aufgenommen und löst durch die selektive Zerstörung der dopaminergen Neurone der Substantia nigra in Mensch und Primaten ein Parkinsonsyndrom aus. Im Tierversuch kann die dopaminerge Toxizität von MPP^+ durch zuvor herbeigeführte Minderung der GSH-Spiegel verstärkt werden [59]. Dies gilt ebenso für eine ganze Reihe von dopaminergen und mitochondrialen Toxinen, deren Wirkung auf Zellkulturebene durch Antioxidantien abgeschwächt und durch GSH-Verminderung verstärkt werden kann.

2.4.2 Alterungsprozesse

Eine wesentliche Rolle scheinen auch Alterungsprozesse einzunehmen, da nahezu alle neurologischen Erkrankungen mit zunehmendem Alter gehäuft auftreten. Es ist außerdem erwiesen, daß durch oxidativen Streß verursachte zelluläre Schäden sich im Alter akkumulieren, dies ist insbesondere auch für mitochondriale DNA gezeigt [60]. Umgekehrt nimmt sowohl die Konzentration an GSH als auch die Aktivität einer Reihe von antioxidativen Schutzenzymen mit dem Alter in vielen Spezies ab [61; 62]. Die motorischen Symptome der Parkinsonschen Krankheit treten aber erst auf, wenn der Zellverlust in der

Substantia nigra ein bestimmtes Maß (ca. 40-50 %) erreicht hat. Eine Hypothese ist, daß die normalen Alterungsprozesse und damit der Zelluntergang der dopaminergen Neuronen bei Morbus Parkinson akut oder chronisch beschleunigt ist und so Patienten mit dieser Erkrankung den auslösenden Schwellenwert des Zellverlustes während ihrer Lebenszeit erreichen. Die besondere Vulnerabilität dopaminerg, melanhaltiger Neurone erklärt sich möglicherweise aus ihrem spezifischen Metabolismus, dessen chinoide Zwischen- und Nebenprodukte oxidativen Streß befördern können, ebenso wie eine Überaktivität des H_2O_2 generierenden Enzyms Monoaminoxidase. Da bei einem beginnenden Zellverlust, verbleibende Zellen das Auftreten von motorischen Symptomen durch gesteigerte metabolische und neuronale Aktivität ausgleichen, wird das Ausmaß an oxidativem Streß für die verbleibende Nervenzellpopulation weiter verstärkt.

Wahrscheinlich ist für die idiopathische Form der Parkinsonschen Erkrankung eine multifaktorielle Genese anzunehmen, zu der genetische Prädispositionen, schädigende Umwelteinflüsse und mitochondriale Defekte beitragen können.

2.5 Problemstellung

Da dem Glutathionsystem bei der Verteidigung von Zellen und insbesondere Nervenzellen gegen oxidativen Streß eine wichtige Rolle zukommt, sollte die Rolle der intrazellulären Homöostase dieses endogenen Antioxidanz in neurodegenerativen Prozessen untersucht werden. Erstes Ziel war es, nach Etablierung geeigneter Fraktionierungsprozeduren Glutathionspiegel von Mitochondrien in Zellkulturmodellen von neuronalem Zelltod ausgelöst durch oxidativen Streß zu bestimmen. Es sollte so Aufschluß gewonnen werden, ob eine intrazelluläre Kompartimentierung vorliegt und von Bedeutung für das Schicksal der Zelle unter oxidativem Streß ist. Mitochondrien sind einerseits Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies und andererseits Energieerzeuger innerhalb der Nervenzellen. Mitochondrialer Funktionsverlust ist ein Charakteristikum vieler neurodegenerativer Erkrankungen. Am Beispiel des Neurotoxins MPP^+ , welches in vivo ein Parkinsonsyndrom hervorruft, sollte geklärt werden, ob oxidativer Streß und Glutathionverlust eine wahrscheinliche Konsequenz mitochondrialer Dysfunktion sein kann oder in Umkehrung, Mitochondrien erste Opfer einer Glutathionmangelsituation bzw. gestörter Glutathionhomöostase sind. Im Falle eindeutiger Hinweise auf einen separaten und regulierten mitochondrialen Glutathionpool in neuronalen Zellen, sollte die Existenz und Kinetik eines mitochondrialen Glutathiontransports durch Messung der Glutathionaufnahme an isolierten Mitochondrien aus neuronalen Zellkulturen oder Hirngewebe, ebenfalls unter

Evaluation geeigneter Isolationsprozeduren, nachgewiesen und charakterisiert werden. Schließlich sollte die neuroprotektive Wirkungsweise der Pharmaka Flupirtin und Retigabin im Hinblick auf antioxidative oder die Glutathionhomöostase beeinflussende Komponenten charakterisiert werden.

3.3 Zellkulturen

Bei PC 12 Zellen handelt es sich um eine neuroendokrine Zelllinie, die ursprünglich aus einem Tumor des Nebennierenmarks (Phäochromocytom) der Ratte gewonnen wurde [63]. Diese Zellen weisen Merkmale eines noradrenergen und catecholaminergen Metabolismus auf. Durch 7-14 tägige Kultivierung in Anwesenheit von nerve growth factor (NGF), einem trophischen Peptidhormon, welches aus verschiedenen endokrinen Drüsengeweben isoliert wurde, differenzieren diese Zellen in einen postmitotischen neuronalen Phänotyp.

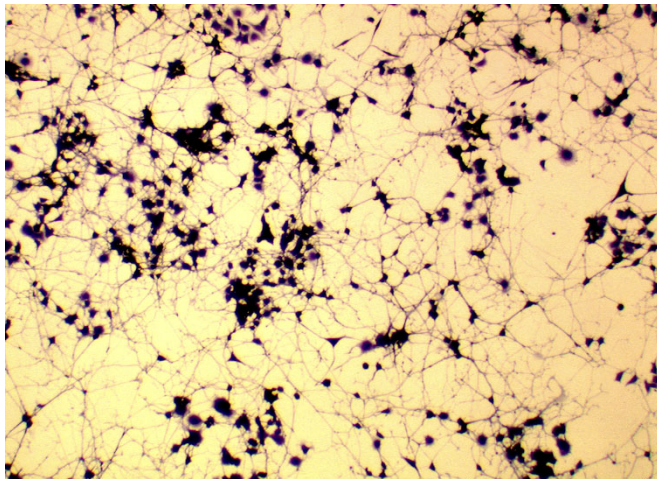


Abbildung 3-1: PC 12 Zellen, welche über 14 Tage in Anwesenheit von NGF (100 ng/ml) kultiviert worden sind. Die Zellen wurden danach fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Deutlich ist Neuritenwachstum und eine Bildung von Zell-Zell-Kontakten zu erkennen

Der Entzug von NGF führt bei differenzierten PC 12 Zellen denn auch zu apoptotischem Zelluntergang. In undifferenzierten wie differenzierten PC 12 Zellen sind typische neuronale Strukturproteine wie Synaptophysin sowie Komponenten des catecholaminergen/dopaminergen Stoffwechsels wie Tyrosinhydroxylase (das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese), selektive Aufnahme, Kompartimentierung in Vesikeln und Freisetzung von Dopamin sowie Expression und Stimulierbarkeit von Dopaminrezeptoren nachgewiesen [64; 65; 66; 67; 68]. Es wurden im Labor mehrere klonale Linien aus verschiedenen Quellen verwendet, nämlich der Firma Schering, der American Cell Culture Collection und aus dem Labor von Prof. Unsicker, Universität Heidelberg. Diese Subklone wiesen z. T. abweichende Morphologien, verschieden ausgeprägte Adhärenz an die Oberfläche der Polystyrol-kulturgefäße und vor allem unterschiedliche Differenzierbarkeit, d. h. Wachstumsarrest und Neuritenausbildung unter NGF-Stimulation auf. Es ist ein lange bekanntes Phänomen, daß in immortalisierten Zelllinien spontane Veränderungen oder Mutationen auftreten, bei PC 12 Zellen können solche Ereignisse z. B. im Verlust der Differenzierbarkeit resultieren. Daher wurden die allermeisten Experimente mit neurodegenerativen Fragestellungen hinsichtlich oxidativem Streß mit undifferenzierten,

proliferierenden PC 12 Zellen durchgeführt, um mögliche Schwankungen biochemischer Parameter zu vermeiden. Dies zumal unter NGF-Differenzierung auch Veränderungen der Spiegel einfacher Metabolite wie dem Antioxidanz Glutathion auftreten, dies wurde auch an einer der hier verwendeten Zelllinien überprüft.

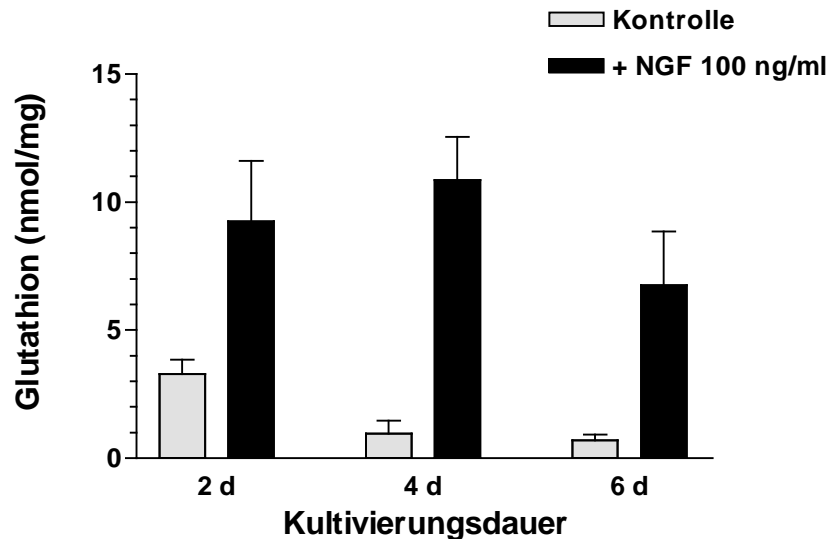


Abbildung 3-2: Messung der Glutathionspiegel (Mittelwerte \pm SD, n = 3) in PC 12 Zellkulturen unter Differenzierung. Zum Tag d = 0 wurden das Medium der Kulturen (10 cm Schalen) zu 1 % FCS und 50 ng/ml NGF gewechselt. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurden Extrakte für die Glutathionmessung gewonnen, säureunlösliche Proteine wurden durch die Lowry-Meßmethode quantifiziert.

Diese Hochregulation der Glutathionspiegel und auch antioxidativer Schutzenzyme ist offenbar Teil der biologischen Funktionen von NGF bei Entwicklungs- und Reperaturvorgängen im Nervensystem [69]. Generell kann für neuronal differenzierte, nichtproliferierende Zelltypen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Streß angenommen werden, da eine Zelle in diesem Stadium in ihrem Stoffwechsel weniger flexibel und belastbar ist. Einige der hier beschriebenen Experimente wurden an einem Kultursystem primärer Körnerneurone gewonnen aus dem Cerebellum der Ratte reproduziert, diese Zellen erwiesen sich als deutlich empfindlicher gegenüber den eingesetzten Glutathionvermindernden Substanzen [70].

3.3.1 Kultivierungsbedingungen

Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden unter einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien ausgeführt. Die Kultivierung von PC 12 Zellen erfolgte in Dulbecos modified Eagle medium (DMEM) oder RPMI-Medium suppelmentiert mit 10 % Pferdeserum und 5 %

fötalem Kälberserum (FCS). Die Zugabe von je 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin garantierte Schutz gegen bakterielle Kontaminationen. Als Kulturgefäße wurden Flaschen mit 182, 80 oder 25 cm² Oberfläche sowie Petrischalen vom Durchmesser 10 oder 3,5 cm und sog. Multiwellplatten mit 6-96 Vertiefungen, die mit 0,1 bis 2 ml Kulturmedium befüllt waren, verwendet. Sämtliche Kulturgefäße waren aus Polystyrol gefertigt, war für bestimmte Messungen eine gute Adhärenz der Zellen erforderlich, so wurden der Gefäßboden vor der Aussaat mit poly-L-Lysin oder Rattenschwanz-Kollagen beschichtet (je nach Herstellerangaben durch Inkubation mit einer verdünnten Lösung bei 37°C). Zur Zellernte wurden die Kulturen einmal mit auf 37°C temperiertem PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und zur Dissoziation der Zellen mit 0,5 g/l Trypsin / 0,2 g/l EDTA-Lösung 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in Medium aufgenommen, bei 250 g für 5 min sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert. Um die Zellen vollständig zu dissoziieren, war es zuweilen erforderlich, diese mittels einer feuerverengten Pasteurpipette zu titrieren, für eine genaue Ermittlung der Zellzahl erfolgte Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop.

Die Kultivierung erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5 oder 10 % CO₂ und 97-99 % relativer Luftfeuchte. Gewöhnlich wurden die Kulturen alle 5-7 Tage, spätestens bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens, erneut passagiert. Die Lagerung erfolgte als Kryokulturen von 1-10*10⁶ Zellen in 1 ml Vollmedium mit zusätzlichen 20 % FCS und 10 % DMSO bei - 80°C oder in flüssigem Stickstoff.

3.3.2 Messung der Überlebensrate

Zur Bestimmung des Zellüberlebens wurden mehrere Verfahren eingesetzt.

- Trypanblau: Dieser anionische Farbstoff wird ausschließlich von Zellen mit perforierter Membran, d.h. untergehenden oder bereits abgestorbenen aufgenommen. Für dieses Verfahren wurden Zellen in einer Konzentration von 5*10⁴ Zellen pro Kavität in 24-well Platten ausgesät, nach Behandlung durch Trypsinbehandlung geerntet und 5-10 min bei Raumtemperatur in einer 0,1 % Lösung von Trypanblau in PBS gefärbt. In einem Aliquot dieser Suspension können in einer Zellzählkammer lebende (ungefärbte) und tote (gefärbte) Zellen ausgezählt werden. Diese Methode bietet gegenüber allen anderen Vitalitätsbestimmungen den Vorteil, daß quantitativ und direkt simultan lebende und tote Zellen bestimmt werden können.

Die folgenden Verfahren wurden immer an Kulturen in 96-well Kulturgefäßen durchgeführt, wobei die Zellen mit 5000-10000 Zellen/100 µl Medium pro Kavität (beschichtet) ausgesät

wurden. Die Zugabe von Substanzen für ein Experiment erfolgte nach 24-48 h Kultivierung zur Anheftung der Zellen.

- MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]: Dieser Farbstoff wird nach Internalisierung durch die Zelle vom mitochondrialen Komplex II (Succinatdehydrogenase), aber auch anderen zellulären Dehydrogenasen zu einer farbigen Formazanverbindung umgesetzt. Die Substanz wird in das Kulturmedium gegeben (Endkonzentration 0,5 mg/ml), die Kulturen werden 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das wasserunlösliche Produkt kristallisiert intrazellulär aus und kann nach Lyse der Zellen in Dimethylsulfoxid photometrisch bei 570 nm quantifiziert werden. Gemäß der Theorie der Reaktion repräsentiert diese Färbung nur (über)lebende Zellen und mit Einschränkungen deren mitochondriale Funktion.
- Kristallviolett: Durch Inkubation in einer Lösung von 20 % Methanol und 1 % Kristallviolett werden überlebende, adhärenente Zellen fixiert und angefärbt. Nach ausführlichem Spülen mit Wasser und Trocknen wird die in den Zellen zurückgehaltene Fraktion des Radikalkations in einem Puffer von 0,1 M Natriumcitrat in 50 % Ethanol aufgelöst und bei 550 nm photometrisch quantifiziert. Für diese Färbung ist eine starke Anheftung lebender Zellen am Boden des Kulturgefäßes notwendig.
- Alamar blue: Diese Färbung beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die MTT-Färbung: auch hier wird der zugegebene Farbstoff (Firma Biosource, Fleurus, Belgien) durch Dehydrogenaseaktivität vitaler Zellen reduziert. Das Produkt ist jedoch wasserlöslich und fluoreszierend, somit ohne weitere Zugabe eines Detergenz fluorimetrisch (Anregung 530 nm, Emission 590 nm) gut detektierbar.

3.3.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Streß

Für die Messung reaktiver Sauerstoffspezies wurde der Fluoreszenzfarbstoff 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat, di(acetoxymethylester) (DCH₂F, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingesetzt. Diese lipophile Spezies wird gut von Zellen aufgenommen, intrazellulär erfolgt zunächst Spaltung der Esterfunktionen des Moleküls durch unspezifische Esteraseaktivität. Dadurch erlangt das Molekül Ladungen und eine Rückdiffusion aus der Zelle ist erheblich erschwert. Durch reaktive Sauerstoffspezies vor allem OH[•] und H₂O₂ erfolgt schließlich Oxidation [71], woraus das Dichlorofluorescein-derivat resultiert. Dieses kann durch seine intensive Fluoreszenz (Anregung 485 nm, Emission 530 nm) gut vermessen werden. Die Zellkulturen (96-well beschichtete Kulturgefäße) wurden für 2 h in PBS oder Medium mit 10 µM DCH₂F bei 37°C im Brutschrank beladen, danach wurde der Überstand

abgenommen und die Fluoreszenz in frischem PBS oder Medium bestimmt. Alternativ wurden so gefärbte Zellen auch im Durchflußcytometer mit Fluoreszenzlaser vermessen, hierzu wurden die Zellen nach der Beladung abtrypsiniert und nach intensivem Resuspendieren (in PBS) im FACScan-Gerät (Becton-Dickinson) analysiert (Anregung 488 nm, 15 mW luftgekühlter Argon-Ionenlaser, Emissionsfilter 585/42 nm Bandpass). Die Auswertung erfolgte mit der Cell Quest-Software des Herstellers.

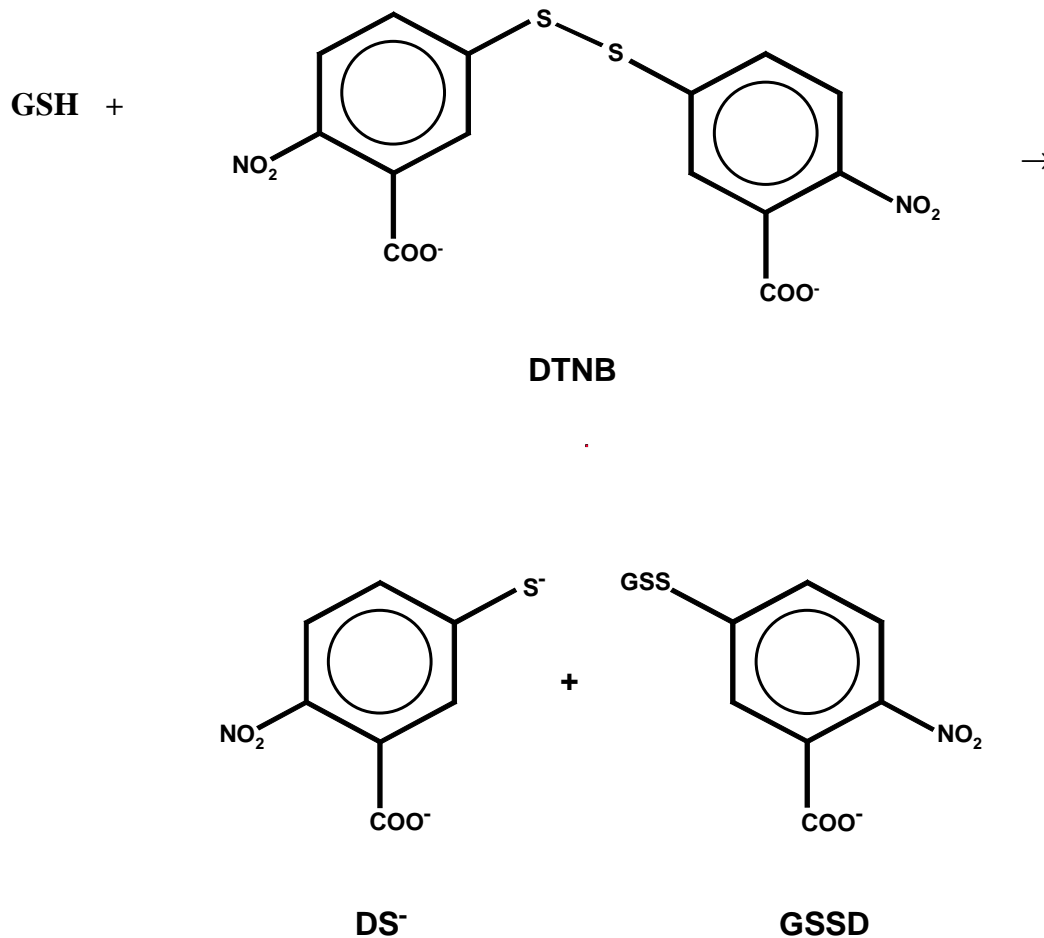
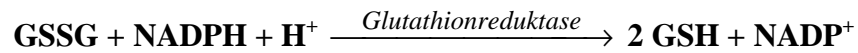
Ein weiterer Parameter für oxidativen Streß ist das Auftreten von multifunktionalen, niedermolekularen Aldehyden, welche Endprodukte von Peroxidationsreaktionen an Membranlipiden sind. Für deren Quantifizierung nach Hom et al. [72] wurden zunächst $1-5 \cdot 10^6$ Zellen nach Behandlung abtrypsiniert und in 500 µl destilliertem Wasser durch 3-maliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Nach Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 20 %) wurden die Homogenate 10 min bei 11500 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde dann durchmischt mit 500 µl einer Reaktionslösung von 0,335 % Thiobarbitursäure in 50 % Essigsäure und 10 min bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis konnten die gebildeten Thiobarbitursäure-aldehyd Reaktionsprodukte photometrisch bei 532 nm vermessen werden. Aus zurückgehaltenen Aliquots des Zellhomogenats wurde zur Normierung der Proteingehalt mittels der Bradfordmethode (siehe unten) bestimmt. Das Hauptprodukt solcher Lipidperoxidationsreaktionen ist Malondialdehyd [73], zur Quantifizierung der erhaltenen Extinktionen wurde deshalb eine Eichreihe von Malondialdehyd mitgeführt, die Extinktionen der Proben wurden nach linearer Regression der Eichreihe als Malondialdehyd-equivalente berechnet.

3.3.4 Glutathionbestimmung

Die Messung von Glutathion in Extrakten aus PC 12 und zerebellären Körnerzellen wurde nach dem Prinzip des enzymatischen Recyclingverfahrens, erstmalig beschrieben von Tietze [74] und modifiziert von Baker et al. [75], durchgeführt. Zur Gewinnung von Zellextrakten wurde von Zellkulturen der Überstand abgenommen und nach Waschen mit PBS (37°C) wurde ein zur vollständigen Bedeckung der Zellen nötiges Volumen von 1 %iger 5-Sulfosalicylsäure (SSA) zugegeben, bei Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser meist 1 ml, im Falle von 35 mm Kulturschalen waren 300 µl ausreichend. Die Kulturen wurden zur Lyse 15 min auf Eis inkubiert, die Zellen dann mittels eines Kunststoffspatels vom Boden der Kulturschale abgelöst und zusammen mit dem Lysisreagenz in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Es erwies sich, daß eine alternative Lyse eines Zellpellets nach Trypsinierung und Abzentrifugation der Zellen in niedrigeren Glutathionwerten resultierte. Nach weiteren 15

min auf Eis wurden ausgefallene, säureunlösliche Proteine 15 min bei 11500 g abzentrifugiert, das erhaltene Proteinpellet wurde in 50-100 μ l 0.5 M NaOH resuspendiert und zur vollständigen Hydrolyse 1 h bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert, der Proteingehalt nach der Lowry-Methode bestimmt.

Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus des Meßverfahrens nach Tietze sind die folgenden Schritte:



Das bei der Reduktion der 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, sog. Ellmans Reagenz) durch Glutathion entstehende Anion (bei pH > 7) der 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (DS⁻) weist bei 412 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von 13600 cm⁻¹ auf. Das gebildete gemischte Disulfid (GSSD) wird in einem zweiten Schritt durch GSH zu einem weiteren Molekül 2-Nitro-5-thiobenzoessäure reduziert, dabei wird GSSG regeneriert, so daß als Nettoreaktion die Reduktion des Ellman Reagenz DTNB (\equiv DSSD) durch

Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH verbleibt. Unter Bedingungen von Überschuß der Substrate DTNB und NADPH sowie einer konstanten Aktivität von Glutathionreduktase hängt die Geschwindigkeit der Bildung des Chromophors DS^- allein von der Konzentration $[GSSG + GSH]$ ab. Die Reaktion läuft mit vielen Molekülen ab, die freie Thiolfunktionen tragen, jedoch stellt Glutathion erwiesenermaßen über 90 % aller freien Thiolgruppen einer Zelle. Zur Messung wurden pro Kavität einer 96 Mikortiterplatte 10 μ l des SSA-haltigen Zellysates zu 90 μ l Assaypuffer gegeben (1 mM EDTA, 100 mM Na-Phosphat pH 7,5), die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 100 μ l Reaktionsmix: 1 mM EDTA, 100 mM Na-Phosphat pH 7,5, 300 μ M DTNB, 400 μ M NADPH und 2 U/ml Glutathionreduktase. Durch ein Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Extinktion durch einem 405 nm Filter über 5 min bei 10 Meßintervallen von 30 s verfolgt. Bei jeder Messung wurde auf derselben Platte eine Reihe von 7 Standards zwischen 10 und 500 pmol GSSG pro Kavität mitgeführt. Eine lineare Regression der Meßpunkte der Standardreihe für die Extinktionsänderung pro Zeit durch die Software lieferte eine Eichgrade (R^2 gewöhnlich zwischen 0,995 und 1,0) mit der die Glutathionkonzentrationen der unbekanntenen Proben berechnet wurden.

Durch dieses Verfahren wurde Glutathion als reduziertes Thiol wie auch als oxidiertes Disulfid zugleich bestimmt, im folgenden immer als GSSG-Äquivalente $GSX = GSSG + 2 GSH$ angegeben. In Zellkulturen wie auch in Geweben liegt der Anteil der oxidierten Form unter Normalbedingungen zwischen 1 und 3 % (zu PC 12 Zellen siehe auch Kap. 4.2). Unter Bedingungen von gesteigertem oxidativen Streß kann dieses Verhältnis jedoch verschoben sein und die getrennte Bestimmung der beiden Formen von Glutathion notwendig sein. Zur Derivatisierung reduzierten Glutathions wurden 130 μ l des SSA-Lysats einer Kultur mit 5 μ l 2-Vinylpyridin versetzt und mit 50 μ l 0,2 M Tris der pH auf 6-7 eingestellt. Die Probe wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird reduziertes Glutathion an der Thiolfunktion alkyliert und steht somit nicht mehr für Disulfidaustauschreaktion zur Verfügung. Von diesem Reaktionsansatz wurden wiederum 10 μ l pro Reaktion in die Glutathionbestimmung eingesetzt. Durch getrennte Messung von Gesamt-Glutathion GSX und oxidiertem Disulfid GSSG an derselben Probe war auch die Berechnung des Gehaltes an reduziertem Glutathion GSH möglich.

3.3.5 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung des Proteingehalts von Zellextrakten wurden zwei Verfahren eingesetzt, der Bradford-Proteinassay der Firma Biorad und das Verfahren nach Lowry.

Der Biorad-Proteinassay wurde zur Quantifizierung des Proteingehaltes von Zellysaten für Western Blots und von Gewebslysaten und –homogenaten eingesetzt. Dieses Verfahren beruht auf der Bildung eines Komplexes zwischen Proteinen und dem Coomassie Brilliant Blue Farbstoff G-250, wobei das Absorptionsmaximum des letzteren von einer roten Spezies zu einer blauen Wellenlänge von 595 nm verschoben wird. Gemäß den Herstellerempfehlungen wurden meist 0,5 bis 2 µl einer 1: 2 oder 1: 4 Verdünnung eines Gewebs- oder Zellhomogenats bzw. Fraktionen mit Wasser zu 50 µl aufgefüllt. Hierzu wurde 150 µl einer 1 : 4 Verdünnung des Bradford-Reagenz (Fa. Biorad) gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

Die Lowrymethode [76] wurde verwendet zur Quantifizierung des Proteingehaltes der säureunlöslichen Proteinsedimente, welche bei der Lyse von Zellen und Gewebe mit Sulfosalicylsäure zur Glutathionbestimmung anfallen. Ausgefallenen Proteine wurden in 0,5 molarer Natronlauge gelöst, 10 µl dieser Lösung wurden in 70 µl 0,5 M NaOH und 120 µl Wasser verdünnt. In 1,5 ml Eppendorfgläsern wurden die Proben zunächst mit 1 ml Reaktionslösung 1 versetzt:

Reaktionslösung 1: 50 Teile Na₂CO₃ 2% in 0,1 M NaOH
1 Teil CuSO₄ 1 % in H₂O
1 Teil NaKTatrat 1% in H₂O

Nach sofortigem Durchmischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min erfolgte Zugabe von 100 µl 1:2 verdünntem Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz. Dieses wird in alkalischer Lösung durch den von Kupferkationen und aromatischen Aminosäuren der Proteine gebildeten Komplex reduziert. Nach 30 min wurde die resultierende veränderte Absorption bei 600 nm gemessen. In beiden Fällen wurde die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer Eichreihe von Rinderserumalbumin (BSA) berechnet. Die Korrelationskoeffizienten der Regression einer Eichfunktion lagen gewöhnlich zwischen 0,995 und 1,0.

3.3.6 Enzymaktivitäten

3.3.6.1 Lactatdehydrogenase (LDH)

Zur relativen Quantifizierung cytosolischer Zellbestandteile in fraktionierten Zell- oder Gewebslysaten wurde die Aktivität des im Cytosol lokalisierten Enzyms Lactatdehydrogenase gemessen. Hierfür wurde der Cytotoxicity Detection der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Dieser Test beruht auf der Endpunktmessung einer Farbreaktion und kann in hoher Anzahl in 96 Multiwellplatten und in hoher Verdünnung der Extrakte durchgeführt

werden. Das Verfahren ist daher unempfindlich gegen andere Bestandteile von Zellextrakten und erlaubt die Vermessung einer hohen Anzahl Proben bei geringem Zeitaufwand. Die Farbreaktion beruht auf zwei Schritten, zuerst erfolgt die Oxidation von zugegebenem Lactat durch LDH unter Reduktion von (ebenfalls zugegebenem) NAD^+ zu Pyruvat. Im zweiten Schritt wird eine Diaphorase zugegeben, dieses Enzym reduziert unter Verbrauch des im ersten Schritt gebildeten NADH das gelbe Tetratzoliumsalz (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu einem roten Formazansalz. Die resultierende Absorption dieses Chromophors kann bei 490 nm detektiert werden. Gewöhnlich wurden von Zellextrakten meist 100-50 μl pro Kavität einer 96-Multiwellplatte eingesetzt, hiervon wurden noch 6 weitere serielle Verdünnungen in Schritten von 1: 2 pipettiert, Endvolumen jeweils 100 μl mit 3 Kavitäten für jede Verdünnung. Von Extrakten aus Rattenhirngewebe wurden meist lediglich 10 μl pro Kavität in die erste Verdünnung eingesetzt. Zu jeder Position wurden 50 μl des Reaktionsmix gegeben, die Platte wurde im folgenden 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert und danach die Extinktion bei 490 nm im Plattenphotometer vermessen. Zur Auswertung wurde die gemessene optische Dichte (OD) der jeweiligen Fraktion gegen die Verdünnung aufgetragen um den Bereich der linearen Korrelation von LDH-Aktivität einzelner Fraktionen durch Normierung des photometrischen Signals auf das jeweilige Volumen einer Fraktion quantifiziert, bei Gewebsextrakten wurde separat der Proteingehalt der Fraktionen mittels des Bradfordtests ermittelt und die Aktivität als OD/mg Protein angegeben. Da bei diesem Verfahren die Aktivität nicht absolut durch Vergleich mit einer Eichreihe als nmol Produkt/min/mg Protein bestimmt wurde, mußte die Messung von zu vergleichenden Proben immer gleichzeitig mit denselben Reaktionslösungen und Inkubationsschritten erfolgen.

3.3.6.2 Citratsynthase

Dieses Enzym wurde als Markerenzymaktivität der mitochondrialen Matrix photometrisch vermessen. Nach dem von Srere [77] beschriebenen Verfahren wurden 10-100 μg einer Zell- oder Gewebsfraktion in zunächst 100 μM Tris/HCl pH 8,1, 300 μM Acetyl-Coenzym A und 100 μM DTNB einige Minuten bei 37° C inkubiert, um eventuell vorhandene De-acetylaseaktivität zu bestimmen. Bei De-acetylierung von Acetyl-Coenzym A entsteht eine freie Thiolgruppe der Pantothersäure des Coenzym A. Diese bildet mit DNTB ein gemischtes Disulfid, die freiwerdende 2-Nitro-5-thiobenzoessäure weist bei 412 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von 13600 cm^{-1} auf, es wird also derselbe Chromophor wie zur Glutathionbestimmung verwendet. Danach erfolgt Zugabe von 500 μM Oxalacetat, dieses

kann von Citratsynthase unter Verbrauch von Acetyl-Coenzym A zu Citrat acetyliert werden und es wird weiterhin die Extinktion bei 412 nm verfolgt. Gewöhnlich verlief die Absorptionzunahme bei einem Meßansatz von 1 ml bis zu 3 min linear. Gegebenenfalls wurde die errechnete Aktivität auf den Proteingehalt (Bradfordbestimmung) der Fraktion normiert.

3.3.6.3 Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette

3.3.6.3.1 Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreductase) [78]

Die Bestimmung der Komplex I Aktivität wurde an Gesamtzellhomogenaten durchgeführt, da die strukturell empfindliche Enzymaktivität in fraktionierten Zellextrakten nur in sehr geringem Maß wiedergefunden wurde. Hierzu wurden ca. $30 \cdot 10^6$ PC 12 Zellen durch Trypsinierung geerntet und in 200 μ l Puffer (50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt zusätzlich zu den Komponenten des Puffers noch 1 mM KCN, 100 μ M Coenzym Q₁ (Ubichinon) und 150 μ M NADH (Substrat). Durch Zugabe von 10-20 μ l des Homogenats wurde die Reaktion gestartet und die Absorption bei 340 nm abzüglich der Absorption 380 nm (red.[NADH]-ox.[NAD⁺], $\epsilon = 5500 \text{ cm}^{-1}$) bei 30° für 2 min registriert. Dann erfolgte Zugabe von Rotenon (Endkonz. 20 μ M), um die Rate der nicht Rotenon-sensitiven (= nicht Komplex I spezifischen) NADH-Oxidation zu bestimmen. Die Differenz dieser beiden Parameter ergab die Komplex I-Aktivität. Der Proteingehalt des Homogenats wurde mittels der Bradfordmethode ermittelt.

3.3.6.3.2 Komplex II/III (Succinat-Cytochrom C -Oxidoreductase) [79]

Die photometrische Messung beruht auf der Oxidation von Succinat und Übertragung der Elektronen auf Cytochrom C, dessen veränderte Absorption bei 550 nm verfolgt wird. Der Reaktionspuffer enthält 50 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 0,5 mM Kalium-EDTA und 0,5 mM KCN zur Hemmung der Rückreaktion (Oxidation des reduzierten Cytochrom C durch Komplex IV). Nach Zugabe von 10-50 μ g Protein (Zellfraktion) und Succinat (Endkonzentration 20 mM) wurde der Reaktionsansatz zunächst 20 min bei 37°C vorinkubiert. Dann wurde Cytochrom C (oxidierte Form, aus Pferdeherz, Endkonzentration 0,1 mM) zugeben. Für die simultane Messung unspezifischer Hintergrundaktivität wurde ein gleicher Ansatz unter Einschluß von 0,1 mM Theonyltrifluoracetat, einem spezifischen Inhibitor des Komplex III, durchgeführt. In Intervallen von 10 sec wurde die Extinktion 550 nm für 2-3 min verfolgt, aus dem linearen Bereich wurde über den molaren

Extinktionskoeffizienten (reduzierte-oxidierte Spezies $\epsilon = 29500 \text{ cm}^{-1}$) die Aktivität in nmol/min/mg errechnet. Der Proteingehalt der vermessenen Proben wurde mittels der Bradfordmethode ermittelt

3.3.6.3.3 Komplex IV (Cytochrom C-Oxidase) [79]

Es wird die Rückreaktion, d. h. die Oxidation von reduziertem Cytochrom C verfolgt. Die reduzierte Spezies wurde erzeugt durch Zugabe von 2 mg Natriumdithionit zu 1,6 ml einer 1%igen Lösung von Cytochrom C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Diese Mischung wird 1 h auf Eis inkubiert. Zur Aktivitätsmessung wurde zu einem auf 37°C temperiertem Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) 10-50 µg Zellextrakt gegeben und reduziertes Cytochrom C (Endkonzentration 40 µM). Ein Vergleichsansatz mit 2 mM Kaliumcyanid wurde simultan als Hintergrund vermessen, wiederum wurde in Intervallen von 10 sec die Extinktion 550 nm für 2-3 min verfolgt, die Berechnung der Aktivität erfolgte analog zur Komplex II/III-Messung. Der Proteingehalt der vermessenen Proben wurde mittels der Bradfordmethode ermittelt.

3.3.6.4 Monomaminoxidase

Dieses Enzym katalysiert die oxidative Desaminierung von Aminen (Catechol-katabolismus), dabei entsteht Wasserstoffperoxid. Das Enzym ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, um ein möglichst deutliches Signal zu erhalten, wurde die Aktivitätsmessung an mitochondrialen Zellfraktionen vorgenommen. Zwei Methoden wurden verwendet:

- Die Methode nach Jiang [80] beruht auf der Oxidation von Fe^{2+} durch Peroxide zu Fe^{3+} , welches im Sauren einen Komplex mit dem Farbstoff Xylenorange ausbildet. Es wurden 50-100 µg mitochondriales Protein bei 37° C für 30 min inkubiert in Anwesenheit von 10 mM Tyramin (Substrat), 3 mM Natriumazid (zur Inhibition von Katalase) und 10 mM Na-Phosphat pH 7,4. Diese Reaktionsmischung wurde 1 : 10 verdünnt in einer zweiten Reaktionslösung von Xylenorange, FeSO_4 , Sorbit und H_2SO_4 (Endkonzentrationen: 200 µM, 500 µM, 200 mM, 25 mM). Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min wurde die optische Dichte bei 560 nm bestimmt und die entstandene Menge H_2O_2 durch Vergleich mit einer Eichreihe berechnet.
- Eine zweite Methode nach Szutowicz [81] benutzt die Peroxidase-katalysierte Oxidation von 2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS, Boehringer Mannheim) durch H_2O_2 . Zu einem Volumen von 0,5 ml Reaktionspuffer (100 mM Na-Phosphat pH 7,4, 1 mM Tyramin, 0,3 mM NaN_3) wurde die zu testende Substanz und/oder 50-100 µg

mitochondriales Protein gegeben. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C erfolgte Zugabe von 0,5 ml Meßlösung (0,5 M Phosphat-Citrat-Puffer pH 4,0, 1,8 mM ABTS, 5 Units Horseradish Peroxidase Boehringer Mannheim). Nach weiteren 15 sec erfolgte Zugabe von 0,25 ml 750 mM HCl, 5% Natriumdodecylsulfat, um durch das Detergenz alle Partikel zu solubilisieren und den pH von 2,1-2,3 den Chromophor zu stabilisieren. Anschließend wurde die optische Dichte bei 414 nm vermessen und mit einer Eichreihe von H₂O₂ verglichen.

3.3.7 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials in PC 12 Zellen erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Jodid (JC-1, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Abhängig von der Potentialdifferenz über die innere mitochondriale Membran (bei normalem Energiestatus -140 mV, unter Depolarization -100 mV bis 0) akkumulieren die Organellen das unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Molekül. Durch die bei dieser Kompartimentierung entstehenden, lokalen, intramitochondrial hohen JC-1 Konzentrationen bildet das Molekül sog. J-Aggregate aus. Diese Aggregate zeigen eine rote Emissionsfluoreszenz bei 590 nm (Anregung 485 nm), wohingegen das JC-1 Monomer bei gleichmäßiger Verteilung in der Zelle (= depolarisierten Mitochondrien) eine grüne Fluoreszenz bei 530 nm aufweist [82]. Über Veränderungen des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzen kann also auf das mitochondriale Membranpotential und die mitochondriale Funktion geschlossen werden. Zu Zellkulturen (in 96-well Gefäßen) wurde JC-1 (Endkonzentration 60 nM) gegeben und bei Inkubation im Brutschrank wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 530 und 590 nm in regelmäßigen Abständen gemessen. Es zeigte sich, daß PC 12 Zellen offenbar nur sehr langsam den Farbstoff in den Mitochondrien akkumulieren, da auch in unbehandelten Zellen erst nach mehreren Stunden Inkubationsdauer eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten vom Monomer hin zu Aggregatbildung, entsprechend der Aktivität nicht geschädigter Organellen, sichtbar wurde.

3.3.8 Morphologische Charakterisierung des Zelltodes durch Transmissionselektronenmikroskopie und TUNEL-Färbung

Für ultrastrukturelle Untersuchung der Morphologie wurden Zellen und Zell- oder Gewebsfraktionen zunächst fixiert. Zu einer Zellkultur (80 cm² Flasche) oder einer Suspension einer Fraktion wurde im Verhältnis 1: 1 Fixationslösung gegeben:

0,05 M Natriumcacodylat

0,8 % Paraformaldehyd
 2,5 % Glutaraldehyd
 pH 7,2-7,4 mit NaOH

Nach Inkubation bei 4°C für 2 h wurden die Zellen abgeschabt und bei 11500 g für 5 min sedimentiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1 ml Fixationslösung resuspendiert und nochmals für mindestens 2 h oder ü.N. bei 4°C nachfixiert. Danach wurden fixierte Bestandteile wiederum bei 11500 g sedimentiert und in 0,2 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) resuspendiert. Die weitere Verarbeitung der Proben nach Standardprozeduren [83] erfolgte im Labor von Prof. Groscurth, Anatom. Institut der Universität Zürich oder dem Muskellabor, Neurologische Universitätsklinik Bonn. Nach Osmifizierung wurden die Sedimente in ein Kunstharz (Epon) eingebettet und ultradünne Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und in einem Transmissionselektronenmikroskop (Philips CM 100 oder Zeiss EM 900) studiert und fotografiert.

Für die Visualisierung von DNA-Einzelstrangbrüchen, ein Merkmal von vorzugsweise apoptotischem Zelltod bzw. der dabei auftretenden Fragmentierung zellulärer DNA, wurde die TUNEL(terminal deoxynucleotidyl-transferase[TdT] mediated deoxyUridintriphosphat[dUTP] nick end labeling)-Färbemethode (Kit: Boehringer Mannheim) gewählt. Dafür wurden Zellen auf Glas-Objektträgern (Culture-slides) kultiviert und nach dem Experiment zunächst fixiert:

- 4 % Paraformaldehyd/1.5 % Glutaraldehyd in PBS, 10 min bei Raumtemperatur (RT)
- nach Spülen mit PBS: Permeabilisierung mit 0.5 % Triton/PBS, 10 min RT
- nach Spülen mit PBS: Positiv –Kontrolle: 1 mg DNase/ml in 0.1 M Na-Cacodylat, pH 7.2, 10 min RT
- nach Spülen mit PBS: Equilibrieren mit TdT-Puffer (30 mM Tris/HCl, 140 mM Na-Cacodylat, pH 6,6) für 10 min, RT
- terminale Transferase Detektion (6 mM Tris/HCl pH 6,6, 28 mM Na-cacodylat, 40 µM CoCl₂, 0,4 µM biotinyliertes dUTP, 2,5 U/ml terminale Transferase) für 20-30 min bei 37°C (Brutschrank), Negativkontrolle: ohne CoCl₂ (Cofaktor des Enzyms)
- Abstoppen: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat für 15 min RT
- nach Spülen mit PBS: Blockierung unspez. Hintergrundes mit 2% Rinderserumalbumin PBS, 10 min RT
- nach Spülen mit H₂O: Streptavidin/alkalische Phosphatase-Konjugat, 1:500 in 100 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, pH 7.5 für 30 min, 37 °C

- nach Spülen mit H₂O: Färbung (Nitrobluetetrazolium 175 µg/ml, 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 377 µg/ml, 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) für 2-20 min, RT
- Die Präparate wurden nach Trocknung am Mikroskop (Nikon E800) studiert und mittels eines Imaging-Systems (Lucia) dokumentiert.

3.4 Gewinnung mitochondrialer Fraktionen

3.4.1 Isolierung mitochondrialer Fraktionen aus Zellkulturen

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Frage nach einer Kompartimentierung von Glutathion innerhalb einer Zelle. Um die Glutathiongehalte von Mitochondrien und Cytosol getrennt vermessen zu können, wurde zunächst in mehreren Experimenten eine geeignete Fraktionierungsmethode gesucht. Die zuerst untersuchte Strategie benutzte als Detergenz Digitonin, ein Saponin, welches auch in den Samen des Roten Fingerhutes (*Digitalis purpurea*) vorkommt. Es ist ein Glykosid von 5 Zuckerresten und dem Aglykon Digitogenin. Die Substanz bildet mit hoher Affinität einen Komplex mit Cholesterin und zerstört so eukaryontische Membranen. Die innere der beiden Mitochondrienmembranen ist jedoch, wie die gesamte Organelle, prokaryontischen Ursprungs und enthält daher kaum Cholesterin [84]. Dagegen kann Cholesterin bis zu 50 % der Lipide einer eukaryontischen Membran ausmachen. Es fungiert dort gleichsam als Weichmacher, da seine planare Struktur die van der Waals Wechselwirkungen sp^3 -hybridierter Kohlenstoffketten gesättigter Fettsäuren unterbricht und so den Schmelzpunkt senkt bzw. die Membranfluidität erhöht. Durch eine Behandlung mit einer entsprechenden Konzentration dieses Detergenz, sollte es also möglich sein, die Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle zu permeabilisieren und die Mitochondrien dieser Zelle vergleichsweise unbeschädigt freizusetzen. Ausgehend von einer publizierten Arbeit an primären Hepatocyten [17] wurde zunächst geprüft, ob Digitonin in den beschriebenen Konzentrationen das cytosolische Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) freizusetzen vermag.

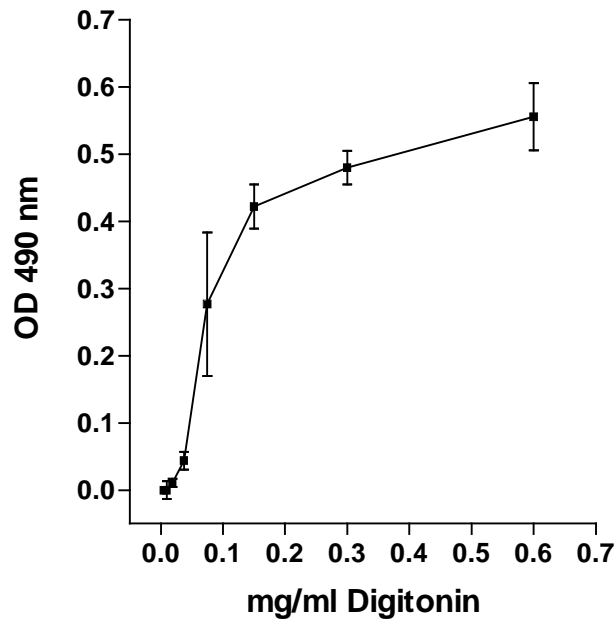


Abbildung 3-3: Messung der freigesetzten LDH-Aktivität bei Behandlung von PC 12 Zellen (2000 Zellen pro Messung) mit steigenden Konzentration von Digitonin (n =3). Inkubation der Zellen mit 1 % Triton X-100 (vollständige Lyse) ergab eine Extinktion 490 nm von $0,594 \pm 0,074$.

Diese Vorexperimente zeigten also in Übereinstimmung mit der Arbeit von Meredith und Reed [17], daß Digitonin im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 1,0 mg/ml konzentrationsabhängig das Cytosol von PC 12 Zellen freisetzt. Gemäß dem in dieser Veröffentlichung beschriebenen Verfahren sollte nun versucht werden, durch selektive Lyse mit Digitonin aus PC 12 Zellen cytosolische und mitochondriale Fraktionen zu erhalten. Die Zusammensetzung des zur Zellyse eingesetzten Puffers war:

| | |
|------------------------|---------------|
| Digitonin: | 0,1-1 mg/ml |
| D-Mannit: | 250 mM |
| Na ₂ -EDTA: | 2,5 mM |
| MOPS: | 17 mM, pH 7,4 |

Mannit als inertes, reduziertes Monosaccharid dient dazu, ein Anschwellen und Platzen der Zellen infolge hypoosmolarer Bedingungen zu verhindern und durch EDTA werden Ca²⁺-Ionen chelatiert, die die Stabilität mitochondrialer Membranen beeinträchtigen könnten. Für die Ermittlung der optimalen Digitonin Konzentration wurden zunächst $1 \cdot 10^6$ Zellen für 5 min bei Raumtemperatur in 500 µl Lysispuffer inkubiert, danach auf 500 µl 40 % Glycerin in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß überschichtet und bei ca. 11500 g für 10 min zentrifugiert. Aus den Fraktionen 1 (obere 500 µl), 2 (untere 500 µl) und 3 (Sediment) wurden die Aktivitäten von LDH und Citratsynthase (CS) als Markerenzymaktivität der mitochondrialen Matrix bestimmt.

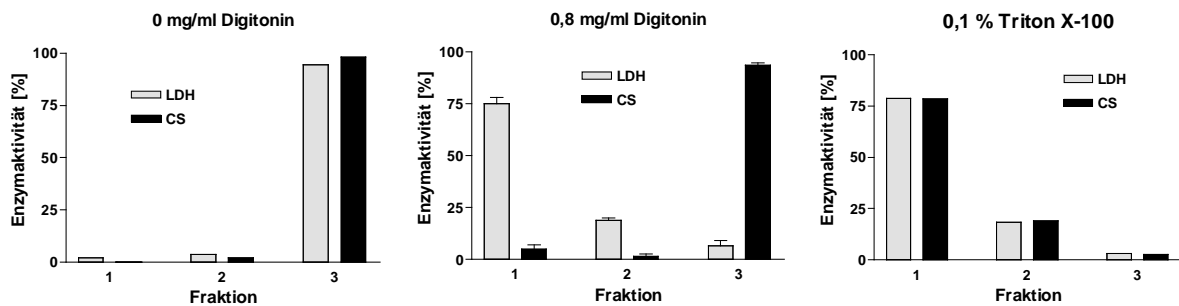


Abbildung 3-4: Messung der Lactatdehydrogenase(LDH)- und Citratsynthase(CS)-aktivitäten in zentrierten Fraktionen von von PC 12 Zellen. Links: Kontrolle ohne Digitonin, Mitte: 0,8 mg/ml Digitonin (n=3), Rechts: Totallyse durch 0,1 % Triton X-100.

Eine verbesserte Trennung des freigesetzten Cytosols von Mitochondrien und anderen festen Zellbestandteilen sollte durch Zentrifugation durch eine organische Trennphase aus Dibutylphthalat erreicht werden. Das Volumen der Phasen und insbesondere die Dauer und Beschleunigung der Zentrifugation wurden durch Vermessung der Lactatdehydrogenase- und Citratsynthaseaktivitäten optimiert. Es erwies sich, daß Digitonin auch in hohen Konzentrationen (bis zu 3 mg/ml) Citratsynthase-Aktivität nicht nennenswert zu solubilisieren vermochte und daß zur Sedimentation der nicht gelösten Zellbestandteile durch die organische Trennphase aus Dibutylphthalat sehr viel höhere g-Faktoren als jene in der Arbeit von Meredith et al. verwendeten nötig waren. Die im weiteren benutzte Prozedur :

- Lyse von bis zu $10 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Lysispuffer (obere Phase) mit 1mg/ml Digitonin, 5 min bei RT
- Vorsichtig überschichten auf 500 μ l Dibutylphthalat (organische Trennphase) über 200 μ l Glycerin 40 % (untere Phase) in einem Beckman 4,4 ml Polyallomer-Zentrifugenröhrchen
- Zentrifugation in Beckman Schwenkbecherrotor SW 60 Ti bei 27000 U/min (entspricht ca. 100000 g) für 20 min.

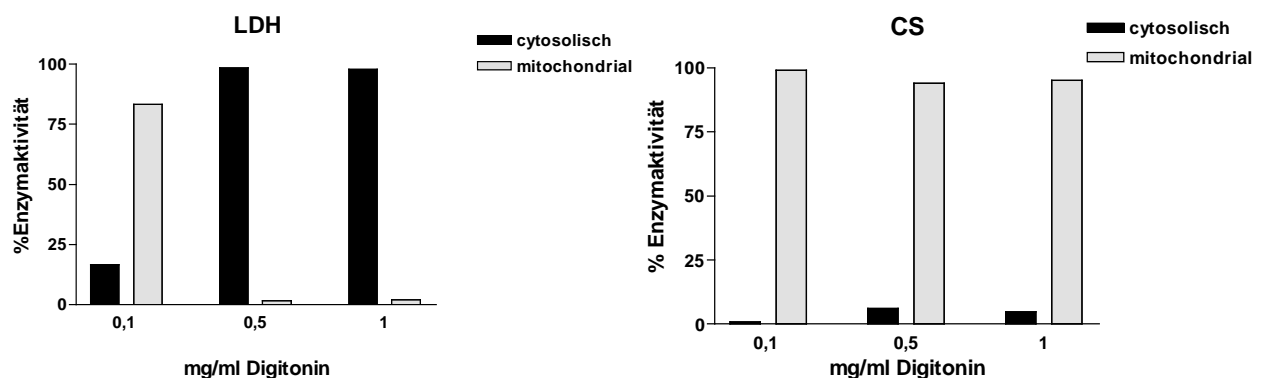


Abbildung 3-5: Verteilung der Enzymaktivitäten von Lactatdehydrogenase (LDH) und Citratsynthase (CS) nach Lyse von $2 \cdot 10^6$ Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Digitonin und Zentrifugation bei 100000 g. Die obere Fraktion (Lysispuffer) ist als cytosolisch, die untere (40% Glycerin) als mitochondrial bezeichnet. Die gemessenen Enzymaktivitäten sind auf die gesamte gemessene Aktivität einer Probe (= 100 %) normiert.

Messungen der Markerenzymaktivitäten belegten, daß die obere Phase hauptsächlich cytosolische und die unterste Phase vorwiegend mitochondriale Bestandteile aufweisen, die mittlere, organische Phase wurde verworfen. Dieses Verfahren wurde zur Gewinnung mitochondrialer und cytosolischer Fraktionen aus 6-well Kulturgefäßen und 10 cm Kulturschalen und folgender Messung der Glutathiongehalte eingesetzt, die Glutathiongehalte anderer Zellkompartimente wurden als vernachlässigbar angenommen. Hierzu wurde die untere Phase vor der Zentrifugation auf 40 % Glycerin mit 1 % SSA eingestellt, so daß alle durch die organische Phase zentrifugierten Zellbestandteile zugleich vollständig aufgeschlossen werden. Die obere Phase wurde nach dem Zentrifugationsschritt mit 250 µl 5 % SSA versetzt. Beide Fraktionen wurden nochmals zentrifugiert und die Sedimente säureunlöslicher Proteine mittels des Lowry-Verfahrens quantifiziert. Mitochondriale und cytosolische Glutathiongehalte wurden auf die Summe beider Proteinpellets normiert.

Um mitochondriale Fraktionen aus PC 12 Zellen in höherer Reinheit und Ausbeute zu gewinnen, wurde eine weitere in der Literatur beschriebene Methode für PC 12 Zellen adaptiert [85]. Für diesen Ansatz wurden $20\text{-}30 \cdot 10^6$ PC 12 Zellen eingesetzt, welche ebenfalls zunächst durch Digitonin permeabilisiert werden, danach werden Fraktionen mittels differentieller Zentrifugation gewonnen. Als differentielle Zentrifugation bezeichnet man Protokolle, die aus einer Folge von Zentrifugationsschritten ansteigender Beschleunigung (=g-Zahl) bestehen.

- Zellen werden in 5 ml H-Medium resuspendiert: 210 mM D-Mannit
70 mM Saccharose
0,5 % BSA
5 mM Kalium-HEPES
1 mM EGTA
pH 7,2
- Zugabe von 5-10 µl Digitonin 10% in DMSO, kurze Inkubation bei 4°C unter Schütteln; mikroskopische Kontrolle des Ausmasses der Lyse durch Trypanblaufärbung von Aliquots der Zellsuspension
- Zentrifugation bei 3000 g, 4°C, 10 min; Überstand: Fraktion 1
- Sediment resuspendieren in 5 ml H-Medium, homogenisieren in einem Dounce Glas-Glas Handhomogenisator (Wheaton), ca. 40 Stöße
- Zentrifugation bei 625 g, 4°C, 5 min; Überstand: Fraktion 2A
- Sediment resuspendieren in 5 ml H-Medium, nochmals homogenisieren und zentrifugieren, Überstand Fraktion 2B, Sediment:Fraktion 3
- Fraktionen 2A und 2B zentrifugieren bei 19000 g, 4°C, 20 min
- Überstand:Fraktionen 2A und 2B , Sedimente resuspendieren in 10 ml H-Medium
- Zentrifugieren bei 19000 g, 4°C, 20 min, Überstand: Fraktion 4, Pellet resuspendieren in 1ml H-Medium: Fraktion 5

Von allen Fraktionen wurden Aktivitäten von Lactatdehydrogenase (LDH), Citratsynthase (CS) und Komplex II/III (Succinat-Cytochrom C Oxidoreduktase) ermittelt.

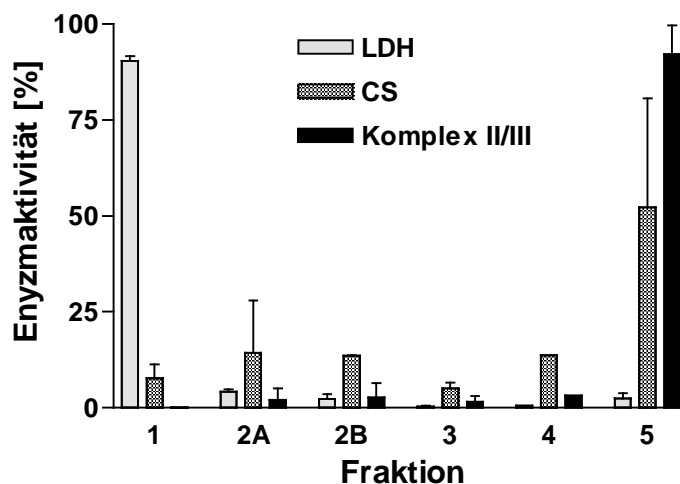


Abbildung 3-6: Fraktionierungen (n=3) von ca. $30 \cdot 10^6$ PC 12 Zellen nach der Methode von Moreadith et al. Die gemessenen Enzymaktivitäten wurden auf das Volumen der jeweiligen Fraktion normiert und durch die Summe aller Aktivitäten (= 100 %) geteilt.

Während über 90 % der Komplex II/III Aktivität in Fraktion 5 wiedergefunden wurden, betrug dieser Anteil im Falle der Citratsynthase nur etwas über 50 %. Im Vergleich zur Einschnitt-Fraktionierungsmethode nach Meredith konnte mit dieser Methode aus einer größeren Ausgangsmenge Zellen eine größere Menge mitochondrialen Proteins (1-5 mg) erhalten werden. Diese Fraktionierungsmethode wurde im folgenden zur Bestimmung der Aktivitäten mitochondrial lokalisierter Enzyme, nämlich Komplex II/III, Komplex IV und Monoaminoxidase angewandt. Eine elektronenmikroskopische Analyse sollte erweisen, ob nach diesem Verfahren gewonnene Fraktionen hinreichend homogen für Studien des mitochondrialen Glutathiontransports waren (Abbildung 3-7).

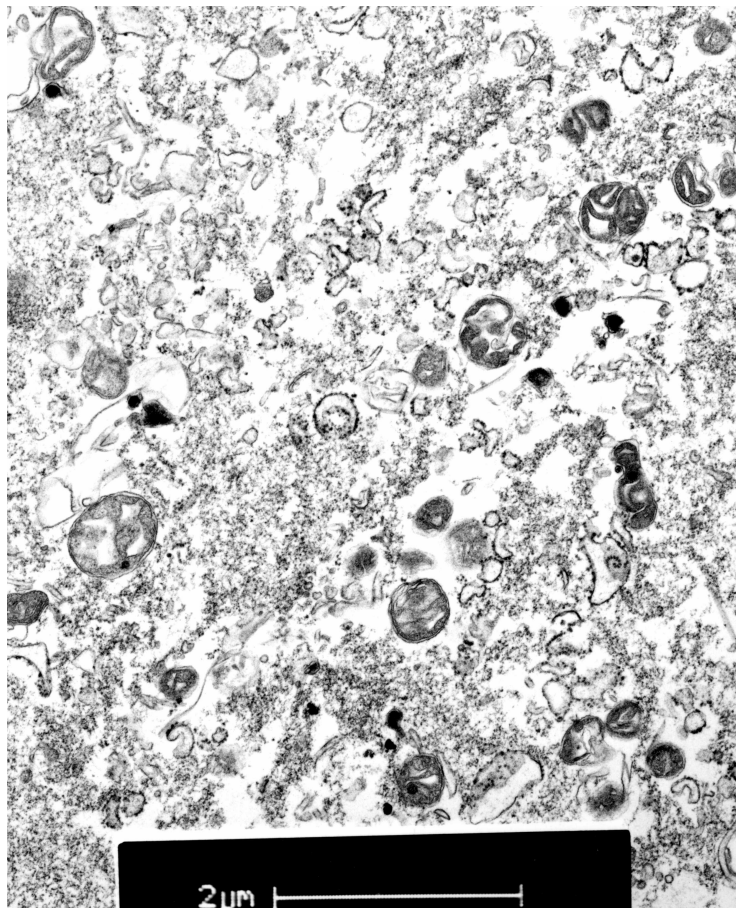


Abbildung 3-7: Elektronenmikroskopische Aufnahme der mitochondrialen Fraktion (Fraktion 5) der Zellfraktionierungsmethode nach Meredith et al. Es sind erkennbar hauptsächlich cytosolische Bestandteile wie Membranfragmente des rauhen endoplasmatischen Reticulums, einzelne Ribosomengruppen aber auch kleine Mitochondrien. Diese zeigen alle eine verdichtete Matrix, was für die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung spricht.

Die morphologische Evaluation der Präparation erwies, daß die geforderte Reinheit nicht erreicht wurde, um ausschließlich mitochondriale Transportvorgänge zu untersuchen. Der

Grund für die Heterogenität der Fraktion ist in der Art des Zellaufschlusses zu suchen, wahrscheinlich entstehen infolge der Lyse durch Digitonin schon Fragmente der Zellplasmamembran und des Cytoskeletts, welche durch die folgende Homogenisation nicht weiter zerkleinert werden können. Diese sind in ihrem Sedimentationsverhalten den Mitochondrien zu ähnlich, als daß diese durch den letzten Zentrifugationsschritt abgetrennt werden könnten. Der Grund für den geschädigten Zustand der erhaltenen Mitochondrien ist ebenfalls in der Natur des Detergenz Digitonin zu suchen. Da Mitochondrien (im Laufe der Evolution eukaryontischer Zellen) vermutlich durch einen Endocytose-ähnlichen Mechanismus in die Zelle gelangt sind, gleicht die Lipidkomposition der äußeren der beiden mitochondrialen Membranen also auch derjenigen eukaryontischer Membranen und wird durch Digitonin ebenso destabilisiert und vermutlich bleibt nur die innere, prokaryontische Membran intakt. Tatsächlich sind in der Literatur partielle Lyseverfahren von isolierten Mitochondrien mittels Digitonin beschrieben [86; 87]. Obwohl die äußere mitochondriale Membran als durchlässig für die meisten Moleküle gilt, stellt sie doch eine für den Metabolismus der Organelle wichtige Kompartimentierung dar und ihre partielle Permeabilisierung zusammen mit den Bedingungen der Isolations- und Fixationsprozeduren hat sicherlich die Entkopplung und veränderte Morphologie verursacht [88; 89]. Um mitochondriale Fraktionen in der für Transportuntersuchungen nötigen Reinheit und Ausbeute zu erhalten, sind nach anderen publizierten Studien sehr viel größere Ausgangsmengen an Zellen und verfeinerte Zentrifugationsschritte nötig. Ein kürzlich publiziertes Verfahren zur Präparation von Membranvesikeln aus PC 12 Zellen zwecks Transportstudien geht z.B. von über 10^{10} Zellen aus 1-3 l Kultur pro Präparation aus [90]. Da dieser Maßstab wenig praktikabel erschien und darüber hinaus ein neuronaler mitochondrialer Glutathiontransport untersucht werden sollte, wurde daraufhin die Möglichkeit der Verwendung von Mitochondrien, isoliert aus dem Hirn der Ratte, für Transportstudien geprüft.

3.4.2 Isolierung mitochondrialer Fraktionen aus Rattengehirnen

Hirngewebe weist im Vergleich zu Leber oder Niere einen höheren Bindegewebsanteil auf und läßt sich daher schwieriger aufschließen. Der hohe Myelinanteil der Nervenfasern und allgemein der hohe Gehalt an Lipiden stellen potentielle Quellen von Verunreinigungen dar. Die weitverzweigten Zellkörper der Nervenzellen können überdies während der Homogenisation abgetrennt werden und bilden kleinere Vesikel, sog. Synaptosomen aus, welche unter Umständen ein den Mitochondrien sehr ähnliches Sedimentationsverhalten aufweisen. Erste Leitlinie für die Präparation von Mitochondrien aus Rattenhirnen waren

Vorschriften von Clark und Nicklas [91] und Basford [92]. Zum besseren Gewebeaufschluß wird vor der Homogenisation eine Inkubation mit der bakteriellen Protease Nagarse durchgeführt. Durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten von Ficoll, einem hochverzweigten, inerten Saccharosepolymer, sollen die beschriebenen leichteren Verunreinigungen abgetrennt werden. Ausgehend von 9 Rattenhirnen war der experimentelle Ablauf wie folgt:

- Nach Entnahme wurden das Kleinhirn (Cerebellum) vom Restorgan getrennt und beide Teile in Isolationsmedium (IM) gegeben:
 - 250 mM Saccharose
 - 10 mM Tris
 - 0,5 mM K-EDTA
 - 0,5 mM K-EGTA
 - 1 mg/ml BSA
 - pH 7,4, 4° C
- Je 3 Großhirne werden in 7 ml und 9 Kleinhirne zusammen in 7 ml gegeben, das Gewebe wird mittels einer Schere zerkleinert und einmal mit Isolationsmedium gewaschen
- Zugabe von 500 µl Nagarse 20 mg/ml pro 7 ml, Inkubation 15 min bei 4° C unter Rühren
- Homogenisation in Portionen von 7 ml in einem Dounce Glas-Glas Hand-Homogenisator (Wheaton): je 8 Passagen mit „loose“ Stempel, gefolgt von 8 Passagen mit „tight“ Stempel.
- Zugabe von je 20 ml IM zu den vereinigten Homogenaten der Großhirne und Kleinhirne: Zentrifugation bei 2000 g, 3 min, 4° C
- Überstände zentrifugieren bei 12500 g (GS-3 Rotor, Sorvall-Zentrifuge), 8 min, 4° C
- Überstand: Fraktion 1, Sediment resuspendieren in 10 ml 1*Ficoll Medium:
 - 3 % Ficoll
 - 120 mM D-Mannit
 - 30 mM Saccharose
 - 25 µM K-EDTA
 - pH 7,4
- Aufschichten auf 20 ml 2*Ficoll Medium:
 - 6 % Ficoll
 - 240 mM D-Mannit
 - 60 mM Saccharose
 - 50 µM K-EDTA
 - pH 7,4
- Zentrifugieren bei 11500 g (SS 34 Rotor), 30 min, 4° C
- Überstand: Fraktion 2, Sediment resuspendieren in 10 ml Isolationsmedium
- Zentrifugieren bei 12500 g, 10 min, 4° C, Überstand: Fraktion 3, Sediment resuspendieren in 5 ml IM: Fraktion 4

Wiederum wurden von den erhaltenen Fraktionen die Aktivitäten der Markerenzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Citratsynthase (CS) vermessen, sowie ein Aliquot der Fraktion 4 für Elektronenmikroskopie verwandt.

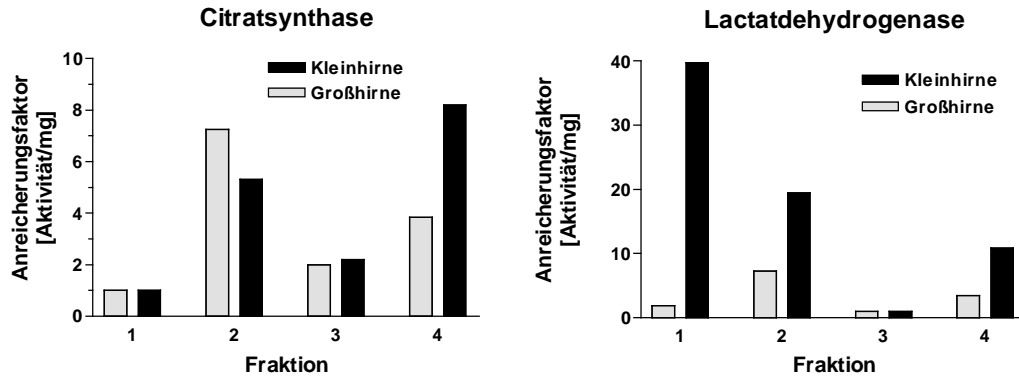


Abbildung 3-8: Anreicherung der LDH- und CS Aktivitäten in den jeweiligen Fraktionen. Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt normiert, der niedrigste Wert wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte als Vielfache des niedrigsten Wertes ausgedrückt.

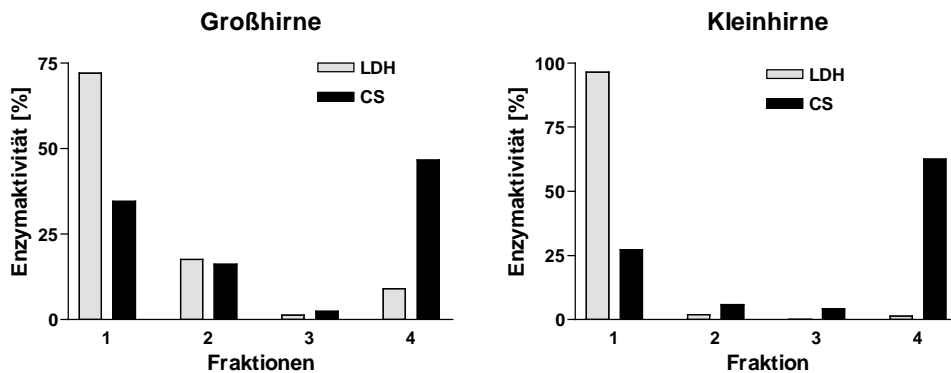


Abbildung 3-9: Verbleib der Enzymaktivitäten in den jeweiligen Fraktionen. Die gemessenen Aktivitäten wurden mit dem Volumen der jeweiligen Fraktion multipliziert und durch die gesamte Menge von gemessener Aktivität (= 100 %) dividiert.

Diese Analysen zeigten, daß im Falle der Großhirne der Hauptteil der LDH-Aktivität aber auch über ein Drittel der CS-Aktivität in Fraktion 1 wiedergefunden wurde. Etwas günstiger war diese Verteilung im Falle der Präparation aus Kleinhirnen, aber auch hier war die relative Anreicherung der spezifischen CS-Aktivität in Fraktion 4 nur 8-fach.

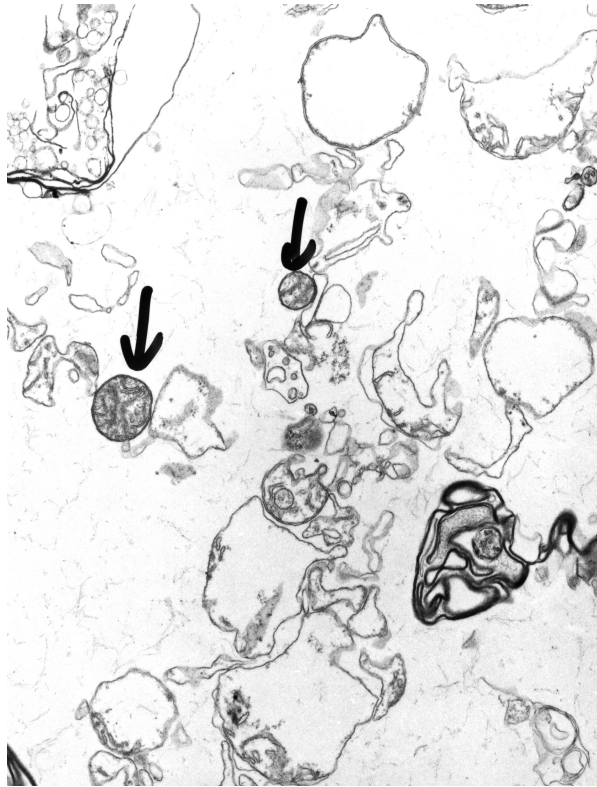


Abbildung 3-10: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion 4 der Präparation aus Großhirnen. Neben unterschiedlich großen Myelinlamellen und Membranfragmenten sind, durch Pfeile markiert, gut erhaltene Mitochondrien erkennbar.

Bestätigung erfährt diese Einschätzung durch die Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Fraktion 4: In Fraktion 4 der Großhirne finden sich zwar zahlreiche Mitochondrien, jedoch auch viele Myelinlamellen (Abbildung 3-10). Die Morphologie der Mitochondrien erscheint durchweg geschwollen, nur bei wenigen sind Cristae oder die innere Membran zu erkennen. Andere Zellorganellen, insbesondere Profile des rauhen, endoplasmatischen Retikulums, sind nicht nachweisbar. Dasselbe gilt für die Fraktion 4 aus Kleinhirnen, jedoch ist hier der Anteil intakt erscheinender Mitochondrien mit gut erhaltenen Cristae und einer nachweisbaren Matrix höher. Es läßt sich schlußfolgern, daß durch die Zentrifugation über einen Ficoll-Stufengradienten insbesondere Myelinfragmente nicht hinreichend abgetrennt werden und daß, vermutlich infolge der Nagarse-Inkubation, ein Großteil der Mitochondrien geschädigt sind und deren innere Bestandteile, meßbar als Citratsynthaseaktivität freigesetzt werden.

Um eine verbesserte Reinheit zu erzielen, wurde eine weiterer Trennschritt hinzugenommen. Die Verwendung eines 2-Phasensystems bestehend aus zwei Polymeren, die unterschiedliche Affinitäten für die Komponenten eines Gewebehomogenats aufweisen, erlaubt die Auftrennung dieser Komponenten in einem einfachen Extraktionsschritt ohne die Anwendung hoher Beschleunigungskräfte [93]. Die Trennung beruht nicht auf der Dichte oder Sedimentationsverhalten der Partikel, sondern auf der Oberflächenbeschaffenheit. Im Falle

von Synaptosomen, Myelinlamellen und Mitochondrien erlauben die unterschiedliche Ladung und Lipidzusammensetzung der Oberflächen eine gute Auftrennung. Nach der Vorschrift von Lopez-Perez [94] zeigen in einem 2-Phasensystem aus Polyethylenglykol (PEG) 4000 und Dextran (Dx) T500 Mitochondrien eine hohe Affinität für die Dx-reiche Phase, wogegen Synaptosomen in die PEG-reiche Phase wandern. Ein weiterer Vorteil dieser wasserlöslichen Polymere liegt in ihrem niedrigen osmotischen Druck, typischerweise 10-20 mOsm in den verwendeten Lösungen infolge ihres hohen Molekulargewichts (PEG 4000: 3350 g/mol, Dx T500: 500000 g/mol) bzw. der niedrigen Konzentration. Eine zweite Änderung der Fraktionierungsmethode bestand in der Verwendung eines zuvor nicht verfügbaren motorbetriebenen Homogenisators (Fa. Braun Melsungen, Typ Potter S). Bei diesem Gerät wird ein rotierender Teflonstempel in ein Vorlagegefäß abgesenkt. Frühere Untersuchungen belegen, daß Homogenisatoren dieses Prinzips einen höheren Zerkleinerungsgrad und gleichmäßigeren Aufschluß im Vergleich zu Dounce-Handhomogenisatoren leisten [95; 96]. Die modifizierte Isolationsprozedur nach Lopez- Perez [94] war wie folgt:

- 6-12 Rattenvorderhirne werden nach Entnahme zweimal gewaschen in 20 ml Medium A:

320 mM Saccharose
1 mM K-EDTA
0,1 % BSA (frei von Fettsäuren)
10 mM Tris-HCl pH 7,4

Waschlösung: Fraktion 1

- Homogenisation in 20 ml Medium A bei 400 U/min, 5-10 Stöße
- Zentrifugation bei 1100 g, 10 min, 4°C; Sediment: Fraktion 2
- Überstand zentrifugieren bei 19000 g, 20 min, 4° C, Überstand: Fraktion 3
- Sediment resuspendieren in 10 ml Medium A, Überschichten auf 20 ml 6% Ficoll in Medium A, Zentrifugation 19000 g, 30 min, 4°C; Überstand: Fraktion 4
- Sediment resuspendieren in 1 ml Medium B:

320 mM Sorbit
0,1 mM K-EDTA
0,1 % BSA (frei von Fettsäuren)
5 mM K-Phosphat, pH 7,8
- Zugabe von 7 g purification phase:

2,56 g DxT500 20 % (w/w)
1,28 g PEG 4000 40 % (w/w)
2,24 g 1 M Sorbitol
0,07 g 10 mM K-EDTA
0,7 g 1 % BSA (frei von Fettsäuren)
0,2 g 0,2 M K-Phosphat pH 7,8
H₂O ad 7 g
- durch 20-maliges Invertieren mischen, Zentrifugieren bei 600 g, 10 min, 4° C
- obere Phase vorsichtig abziehen: Fraktion 5, untere Phase + Interphase mischen mit 3

ml washing phase:

9,6 g DxT500 20 % (w/w)
 4,8 g PEG 4000 40 % (w/w)
 9,6 g 1 M Sorbitol
 0,3 g 10 mM K-EDTA
 3,0 g 1 % BSA (frei von Fettsäuren)
 0,75 g 0,2 M K-Phosphat pH 7,8
 H₂O ad 30 g
 gründlich mischen und über Nacht trennen
 lassen: die obere der beiden Phasen als
 washing phase sammeln

- Zentrifugieren bei 600 g, 10 min, 4° C, obere Phase vorsichtig abziehen: Fraktion 6
- Untere Phase + Interphase zu 30 ml Medium B geben, gründlich mischen
- Zentrifugieren bei 19000 g, 30 min, 4° C, Überstand: Fraktion 7
- Sediment aufnehmen in 1 ml Medium B: Fraktion 8

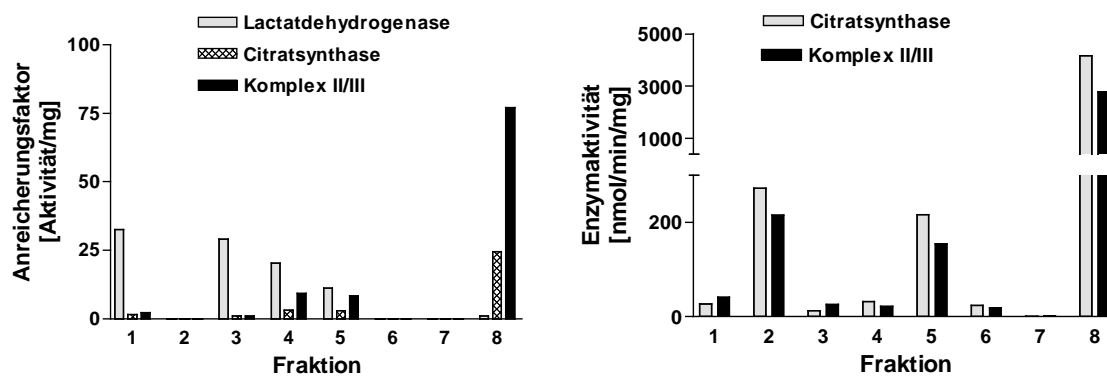


Abbildung 3-11: Enzymprofile von zwei Fraktionierungen von Rattenvorderhirnen. Links: Anreicherung der Markerenzyme in den jeweiligen Fraktionen. Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt normiert, der niedrigste Wert wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte als Vielfache des niedrigsten Wertes ausgedrückt. Rechts: spezifische Aktivität der mitochondrialen Markerenzyme in den jeweiligen Fraktionen.

Die Vermessung der Enzymaktivitäten in allen Fraktionen belegte die bislang beste erzielte Reinheit der mitochondrialen Fraktion (Fraktion 8). Lediglich die während der Phasenverteilungsschrittes gewonnene synaptosomale Fraktion 5 enthielt noch nennenswerte Mengen an mitochondrialer Enzymaktivität, es handelt sich hierbei um in den Synaptosomen eingeschlossene Mitochondrien, welche präferentiell aus den Axonen bzw. Dendriten der Nervenzellen stammen dürften. Fraktion 2 stellt nicht-aufgeschlossenes Gewebe nach dem Homogenisationsschritt dar. Um die Frage von Kontaminationen morphologisch zu beurteilen, wurden wiederum elektronenmikroskopische Analysen angefertigt.

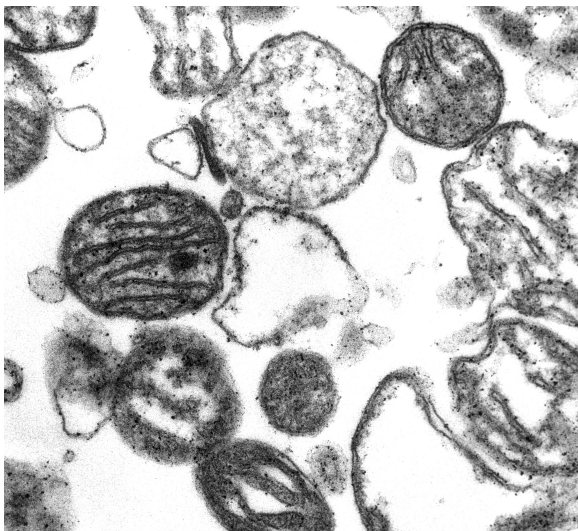
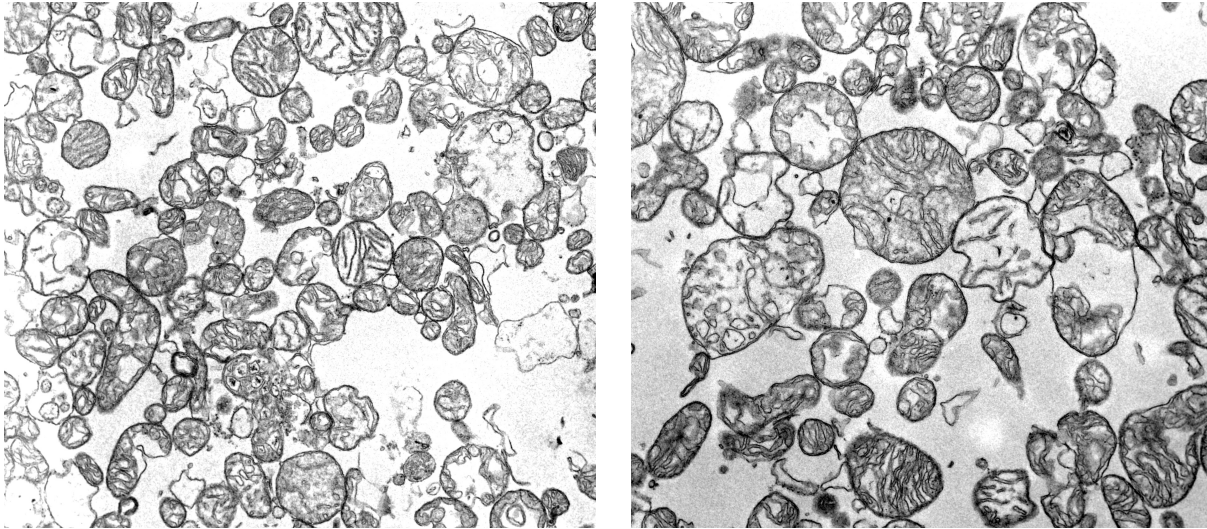


Abbildung 3-12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fraktion 8 (Vergrößerungen 4400- bis 12000 fach) der Präparation nach Lopez-Perez.

Die morphologische Beurteilung entspricht der hohen Aktivität mitochondrialer Markerenzyme in Fraktion 8. Es finden sich kaum noch Verunreinigungen durch cytoplasmatische Bestandteile und Myelinfragmente. Die Anordnung der inneren Membran und Cristae der Mitochondrien erscheint meist intakt. Neben vielen runden und geschwollenen Mitochondrien, weisen einige kleinere auch eine intakte, elektronendichte Matrix auf. Mehrere Gründe für die geschwollene Morphologie der isolierten Organellen sind in Betracht zu ziehen. Der verwendete Fixationsschritt des Materials vollzieht sich über 2 h in Anwesenheit von 0,8 % Paraformaldehyd und 4 % Glutaraldehyd in 0,2 molarem Na-Cacodylatpuffer. Durch diese reaktiven Aldehyde werden die Membranen der Organellen zunächst einmal permeabilisiert bevor die vollständige Quervernetzung und Fixierung eintritt, so daß es leicht zu einem Verlust der Matrix und Einstrom von Wasser bzw. einem Anschwellen kommt. Tatsächlich findet sich in den meisten in der Literatur publizierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen isolierter Mitochondrien eine vergleichbare

Morphologie von geschwollenen, „leeren“ Mitochondrien. Eine schonendere, jedoch aufwendigere Fixationsmethode bietet das sog. freeze substitution Verfahren und Einbetten des Materials bei niedriger Temperatur [86]. Darüber hinaus ist die unnatürliche Morphologie isolierter Mitochondrien untersucht worden mit der Erkenntnis, daß auch bei isoosmotischem Druck die Abwesenheit von Makromolekülen wie das in allen Isolationspuffern enthaltene BSA, einen Verlust der natürlichen Konformation insbesondere der äußeren mitochondrialen Membran zur Folge hat [97; 89]. Das für den Stoffwechsel der Organelle wichtige Intermembranraumkompartiment geht so verloren mit der Konsequenz einer Entkopplung der Respiration und Schwellung, ähnlich der Wirkung von hohen Digitoninkonzentrationen. Durch Zugabe von osmotisch wenig wirksamen Makromolekülen wie Dextran kann eine natürlichere Morphologie isolierter Mitochondrien erzielt werden [98]. Für Transportstudien ist diese Option jedoch wegen der hohen Viskosität dieser Substanzen nicht gegeben. Eine geschwollene Morphologie oder Verlust der Matrix bei intakten Membranen verbietet nicht Transportstudien an Membranproteinen. Kinetische Parameter, welche unter diesen artifiziellen Bedingungen gewonnen werden, müssen aber nicht den physiologischen Werte gleichkommen. Ein funktioneller Parameter zur Beurteilung von Mitochondrien ist die Sauerstoffaufnahme oder Respiration der isolierten Organelle. Zur Messung werden Mitochondrien in einem gasdichten Reaktionsraum mit Substraten der oxidativen Phosphorylierung bzw. des Citratcyclus (Glutamat, Succinat, Malat) inkubiert und der Sauerstoffgehalt der Mitochondriensuspension verfolgt. Zur Überprüfung der mitochondrialen Funktion wurde eine solche Messung in einem Oxygraph Respirometer (Firma Oroboros, Innsbruck, Österreich) durchgeführt. Dieses Gerät bietet eine genaue Temperierung der Suspension durch eine Pelletier-Heizpumpe, der Sauerstoffgehalt der Suspension wird über eine Elektrode nach Clark gemessen, d.h. es erfolgt Reduktion des Sauerstoffs an einer Platinkathode. Bei kleinem Reaktionsraum von 1,5 ml genügen einige μg mitochondriales Protein für eine Messung.

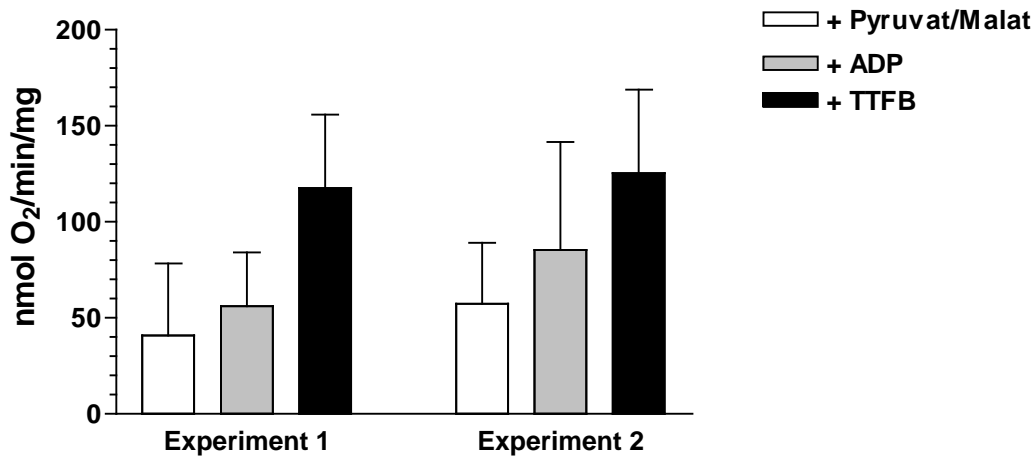


Abbildung 3-13: Messung der Sauerstoffaufnahme isolierter Rattenhirnmitochondrien. 8 μg mitochondriales Protein wurden zunächst ohne Substrate 1 min bei 30 °C inkubiert, danach erfolgte in Intervallen von 1 min die Zugabe von: - Substraten (Pyruvat 10 mM, Malat 5 mM), danach 200 μM ADP (Substrat des Komplex V, dadurch aktivierte Respiration), schließlich 4,5,6,7-Tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazol (TTFB, 10 μM , ein Entkoppler des mitochondrialen Membranpotentials), welcher die maximal mögliche Sauerstoffaufnahme herstellt.

Die gemessenen SauerstoffAufnahmegeschwindigkeiten waren in der Literatur beschriebenen Daten [94] vergleichbar, somit wurde die Qualität der nach dieser Methode gewonnenen Mitochondrien als ausreichend für Transportstudien bewertet.

3.5 Messung des mitochondrialen Glutathiontransports

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (23° C) durchgeführt. Dies entspricht den meisten in der Literatur beschriebenen Experimenten mit ähnlichem Ansatz, da bei einer Temperatur von 37° C die meisten Transportvorgänge unmeßbar schnell ablaufen [90]. Beispielsweise erreicht der mitochondriale ADP/ATP Translokator bei 25° C nach ca. 1 s Gleichgewichtseinstellung [99]. Zudem sind die bekannten Studien mitochondrialen Glutathiontransports an Leber und Niere ebenfalls bei Temperaturen zwischen 20 und 30° C durchgeführt worden [19; 20; 21]. An früheren Arbeiten orientiert war auch die Zusammensetzung des Puffers für die Inkubation isolierter Mitochondrien mit exogenem Glutathion:

5 mM K-HEPES
 0,1 mM Na₂-EDTA
 1 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄
 220 mM Mannit
 70 mM Saccharose
 0,1 % BSA (frei von Fettsäuren)
 5 mM Succinat
 0,25 mM Acivicin
 pH 7,2

In diesem Puffer wurden auch die Mitochondrien nach der Präparation aufgenommen, von Beginn der Präparation bis zum Beginn der Transportmessung wurden gewöhnlich 3-3,5 Stunden benötigt. Die Zugabe von Acivicin (α -Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoazolessigsäure) sollte eventuell in der Präparation noch vorhandene γ -Glutamyltransferase Aktivität inhibieren [23]. Glutathion wurde in diesem Puffer unmittelbar vor den Messungen angesetzt, Stammlösung 100 mM. Das ³⁵S-markierte Tripeptid wurde bezogen (Fa. NEN Dupont) in einer spezifischen Aktivität um 200-600 Curie/mmol und einer Konzentration um 2,85 μ M abhängig von der Charge bzw. dem Synthesedatum. Um das als Schutz gegen Oxidation in der Verkaufsform enthaltene DTT (Dithiothreitol, 10 mM) zu entfernen, wurde die radioaktive Lösung 1: 1 mit Assay-Puffer verdünnt und diese Verdünnung mit einem gleichen Volumen Essigsäureethylester extrahiert. Durch 1 min Zentrifugation bei ca. 10000g in einer Tischzentrifuge wurden die Phasen getrennt und die obere organische Phase wurde verworfen. Das Volumen einer Messung schließlich betrug 250 μ l :

| | Zugegebenes Volumen | Endkonzentration |
|--------------------------------|---------------------|--|
| Mitochondriensuspension | 60 µl | 160-1000 µg Protein/ml |
| Unmarkiertes GSH | 25 µl | 1 µM-75 mM |
| Markiertes GSH | 3 µl | 1,9-3,5 µCi / 250 µl (entspricht 5-15 pmol) |
| Puffer | 162 µl | |

Tabelle 3-1: Zusammensetzung des Ansatzes für die Transportmessung der Aufnahme von GSH in Rattenhirnmitochondrien. Die Werte für die Konzentrationen von markiertem Tracer ³⁵S-Glutathion und die Menge an eingesetzten Mitochondrien orientieren sich an den Arbeiten von Colell et al, Martensson et al und Garcia-Ruiz et al [21; 19; 20]

Um den Aufnahmeprozess in einer Phase der Anfangsgeschwindigkeit vor der Gleichgewichtseinstellung zu betrachten, wurde die Inkubation nach 30 s durch die Zugabe einer 10-fachen Menge (2,5 ml) eiskalter Pufferlösung abgestoppt. Die Abtrennung der Mitochondrien wurde erreicht durch Filtration des Ansatzes durch Zellulosemischesterfilter, Porengröße 0,45 µm (Fa. Millipore, Eschborn) in einem Edelstahlfilterhalter. Die Filter wurden folgend zweimal mit je 2 ml eiskaltem Puffer gewaschen und danach in Szintillationsgefäßen in 5 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold) über Nacht inkubiert. Die zurückgehaltene Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Fa. Wallac, Finnland, Typ 1400) vermessen. Zur Berücksichtigung des Totvolumens der Filter wurde für jede Messung ein Kontrollansatz ohne Mitochondrien mit der jeweiligen Glutathionkonzentration in derselben Weise prozessiert, die hier gefundene Radioaktivität wurde entsprechend von dem Ansatz inklusive Mitochondrien subtrahiert. Ausgehend von der Grundannahme, daß ³⁵S-markiertes Glutathion in gleicher Weise wie unmarkiertes Glutathion von den Organellen aufgenommen wird, wurde aus der zurückgehaltenen Radioaktivität der Glutathiongehalt der Mitochondrien berechnet. Weitere theoretische Überlegungen und Voraussetzungen bezüglich der Messung von Transportprozessen werden bei der Interpretation der gewonnenen Daten in Abschnitt 0 behandelt.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mittels der Programme InStat (Macintosh), GraphPadPrism (Macintosh, Windows) oder Microsoft Excel (Macintosh, Windows). Alle Ergebnisse sind soweit nicht anders erwähnt als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Bei Messungen der Überlebensrate und reaktiver Sauerstoffspezies von Zellkulturen betrug die Anzahl der unabhängig, jedoch gleichzeitig in 96-well Kulturgefäßen vermessenen Kulturen mindestens 5, oft auch 10 pro experimenteller Bedingung. Für Messungen der Glutathionspiegel und Enzymaktivitäten wurden mindestens 3 oder auch 6 Kulturen pro Bedingung in Mehrfachkultur-platten oder 6 cm bzw. 10 cm Kulturschalen verwendet. Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte bei Vergleich von 2 Bedingungen mit dem Students T-Test. Bei mehr als 2 experimentellen Bedingungen wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse, (one way analysis of variance = ANOVA) durchgeführt. Ergab diese eine Irrtumswahrscheinlichkeit geringer als 5 % ($p < 0,05$) dafür daß alle Mittelwerte nicht aus derselben Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), wurde zur Berechnung von signifikanten Differenzen der Mittelwerte einzelner Gruppen ein post hoc Test nach Tukey oder Bonferroni durchgeführt. Als signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten geringer 5 % ($p < 0,05$), 1 % ($p < 0,01$) oder 0,1 % ($p < 0,001$) bewertet und in Abbildungen mit einem, zwei oder drei Indices (*, #) markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Toxizität von L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure

Um eine Aussage über die Auswirkungen einer Verminderung der zellulären Glutathionspiegel treffen zu können, wurden Zellkulturen von PC 12 Zellen und cerebellären Körnerneuronen aus der Ratte mit zwei Glutathion-depletierenden Verbindungen behandelt.

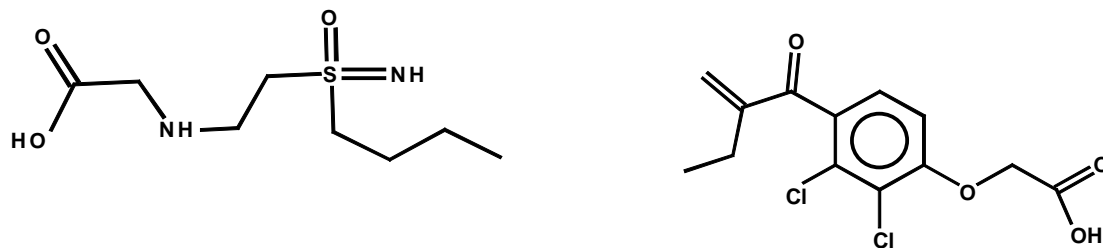


Abbildung 4-1: Strukturformeln von L-Buthioninsulfoximin (BSO, links) und Etacrynsäure (EA, rechts).

L-Buthioninsulfoximin (BSO) wurde erstmals von Griffith und Meister [100] beschrieben als ein irreversibler Inhibitor der γ -Glutamylcysteinylsynthetase, des Schrittmacherenzym der GSH-Synthese. Nach intrazellulärer Phosphorylierung an der Imin-Funktion bindet es als Struktur analog des phosphorylierten γ -Glutamyl-cysteinyl Zwischenprodukts nichtkovalent an das Enzym. Etacrynsäure (EA), [2,3-Dichlor-4-(2-ethylacryloyl)-phenoyl]-essigsäure, ist ein Schleifendiuretikum und wird als Molekül mit einem elektrophilen Zentrum leicht von Glutathion-S-Transferasen mit der Thiolgruppe des Glutathions konjugiert [101; 102].

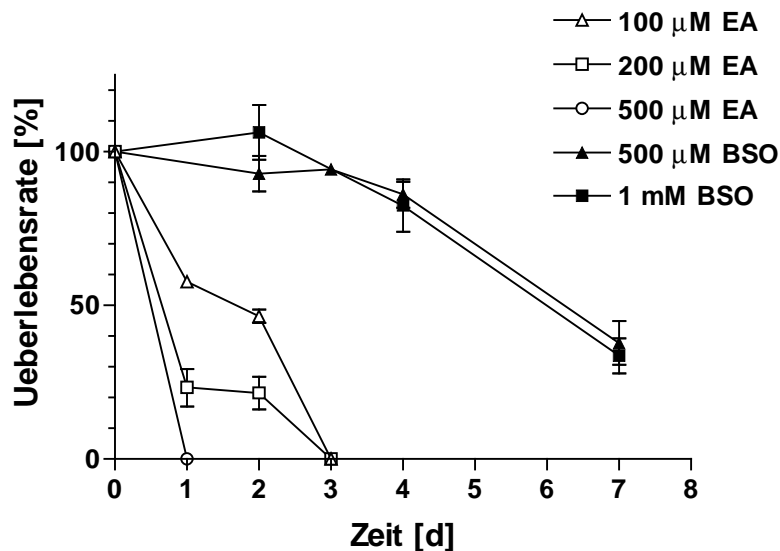


Abbildung 4-2: Bestimmung der Überlebensrate von PC 12 Zellen bei Behandlung mit BSO und EA. An den entsprechenden Zeitpunkten wurden überlebende Zellen fixiert, durch Kristallviolett angefärbt und anschließend photometrisch quantifiziert. Die Überlebensrate wurde durch Vergleich mit einer Kultur unbehandelter Zellen errechnet.

Die Bestimmung der Überlebensrate von PC 12 Zellen bei Behandlung der Kulturen mit L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure zeigte, daß L-Buthioninsulfoximin bis zu einer Inkubationszeit von 4 Tagen keinerlei toxische Wirkung auf die Zellkulturen ausübt. Über diesen Zeitraum hinaus tritt eine Erschöpfung der Nährstoffe und Anhäufung von Kataboliten im Medium auf, so daß ohne Erneuerung des Mediums die Zellen nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens in einem Zeitraum von 7 bis 10 Tagen absterben. Diese Absterbephase trat in L-Buthioninsulfoximin-behandelten Kulturen etwas schneller ein, wie der Überlebenswert nach 7 Tagen zeigt. Deutlich anders die Auswirkungen einer Behandlung der Zellkulturen mit Etacrynsäure: beginnend bei Konzentrationen von 100 µM starben die Zellen zeit- und konzentrationsabhängig, vollständiger Zelltod trat innerhalb von 24 h bei Inkubation mit 500 µM Etacrynsäure ein. Die unterschiedlichen Toxizitäten dieser zwei Verbindungen spiegeln sich auch in ihrem Vermögen, die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies auszulösen. Während mit L-Buthioninsulfoximin behandelte Kulturen zu keinem Zeitpunkt ein erhöhtes Niveau reaktiver Sauerstoffspezies als Indikator für oxidativen Streß aufwiesen, führte Etacrynsäure, wiederum konzentrationsabhängig, innerhalb von wenigen Stunden zu einem massiven Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in diesen Kulturen.

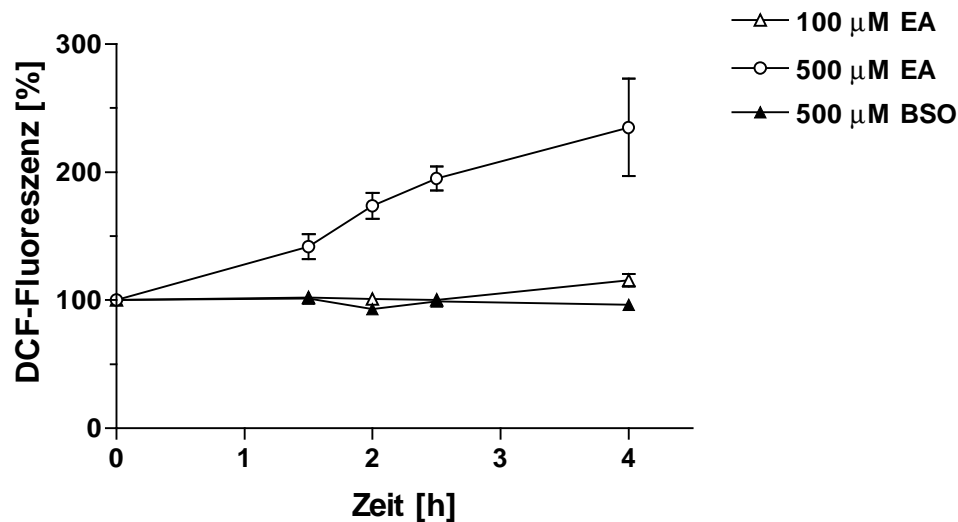


Abbildung 4-3: Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in PC 12 Zellkulturen. Die behandelten Zellkulturen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mit einem Dihydrodichlorofluoreszein-derivat gefärbt und die Fluoreszenz des Oxidationsprodukts fluorometrisch quantifiziert.

Innerhalb dieses kurzen Zeitfensters von 2-4 h nach Beginn des Experiments, war die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Etacrynsäure deutlich vermindert, wenn zusätzlich Rotenon, ein Inhibitor des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), in das Kulturmedium gegeben wurde.

| | Kontrolle | 500 µM EA | 1 µM Rotenon | 500 µM EA + 1 µM Rotenon |
|---|-------------|---------------------|--------------|-----------------------------|
| Relative Fluoreszenz 2 h (%) | 100 ± 32,14 | 159,35 ± 26,21 (*) | 93,94 ± 6,62 | 120,66 ± 13,03 |
| Relative Fluoreszenz 4 h (%) | 100 ± 16,07 | 205,3 ± 32,34 (***) | 79,94 ± 2,75 | 152,67 ± 6,17 (*, #) |

Tabelle 4-1: Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in PC 12 Zellkulturen. Die behandelten Zellkulturen wurden an den entsprechenden Zeitpunkten mit einem Dihydrodichlorofluoreszein-derivat gefärbt und die Fluoreszenz des Oxidationsprodukts fluorometrisch quantifiziert. Die Fluoreszenz der behandelten Kulturen wurde auf 100 % der unbehandelten Kontrollen normiert. *: $p < 0,05$ gegen Kontrolle, ***: $p < 0,001$ gegen Kontrolle, #: $p < 0,05$ gegen 500 µM Etacrynsäure.

Dieses Experiment zeigt, daß über die mitochondriale Atmungskette ein Großteil der unter Behandlung mit Etacrynsäure entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies produziert wird. Der Vergleich der Glutathionspiegel L-Buthioninsulfoximin- und Etacrynsäure-behandelter Zellen

ergab, daß der Gesamtglutathiongehalt der Zellkulturen durch beide Substanzen bei einer Konzentration von 500 μM in vergleichbarem Ausmaß verringert wurde.

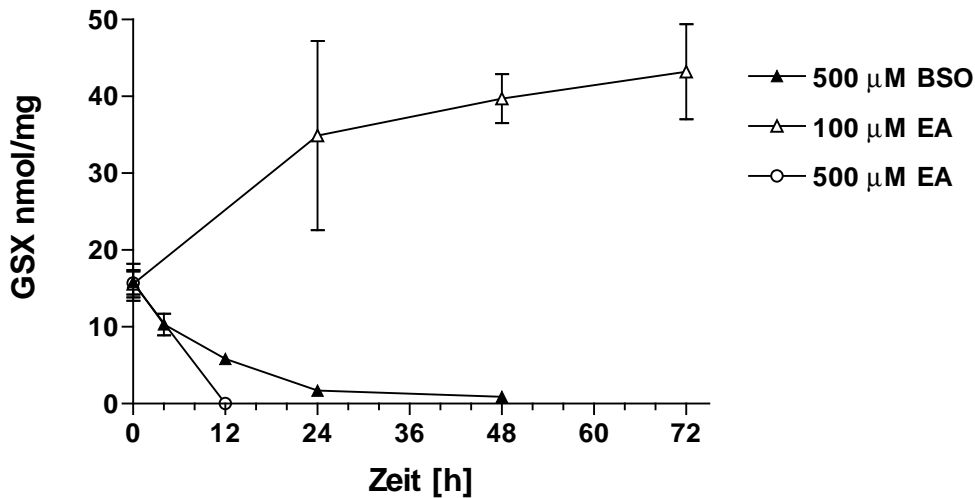


Abbildung 4-4: Glutathionspiegel in PC 12 Zellen unter Behandlung mit L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden aus den Kulturen Extrakte für die Glutathionmessung gewonnen. Glutathion ist als $\text{GSX} = \text{GSSG} + 2 \cdot \text{GSH}$ angegeben und auf den Proteingehalt der Extrakte (in mg) normiert.

Die 100 μM olare Konzentration von Etacrynsäure hatte einen Anstieg des Glutathiongehalts um mehr als das Doppelte innerhalb von 72 h zur Folge. Ein Anstieg zellulären Glutathions als Folge eines nicht-tödlichen Stimulus durch oxidativen Streß ist schon in vielen in vitro und in vivo Experimenten beobachtet worden. Die Glutathionsynthese untersteht einer feedback-Regulation (Inhibition) durch Glutathion [103], zusätzlich wird hierfür eine gesteigerte Syntheseleistung verantwortlich gemacht. Tatsächlich wurde bei Studien des Schrittmacherenzym der Glutathionsynthese, γ -Glutamylcysteinylsynthetase, eine Induktion der Transkription des entsprechenden Gens durch oxidativen Streß und eine durch elektrophile Agenzien induzierbare regulatorische Promotersequenz im 5'-nichttranslatierten Genabschnitt gefunden [104; 105].

Die Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen der Glutathiondepletion auf die Zellüberlebensrate durch vergleichbar hohe Konzentrationen von L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure wurde in den unterschiedlichen subzellulären Glutathionspeichern vermutet. Daher wurden Glutathiongehalte von fraktionierten Zellysaten nach Behandlung mit L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure bestimmt.

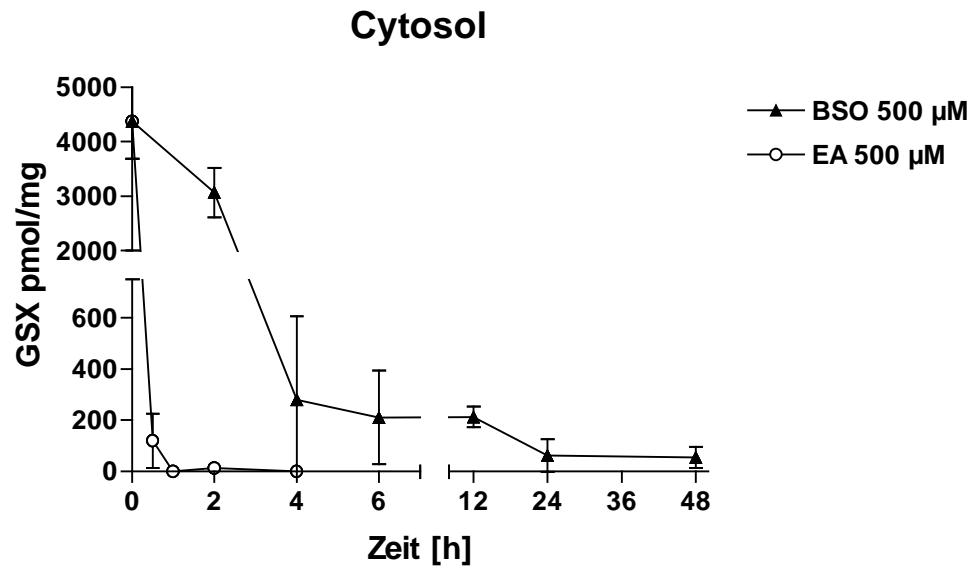


Abbildung 4-5: Glutathionspiegel in cytosolischen Zelllysaten von PC 12 Zellen unter Behandlung mit L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden aus den Kulturen fraktionierte Zelllysate für die Glutathionmessung gewonnen. Glutathion ist als $GSX = GSSG + 2 \cdot GSH$ angegeben und auf den Proteingehalt der Extrakte (in mg) normiert.

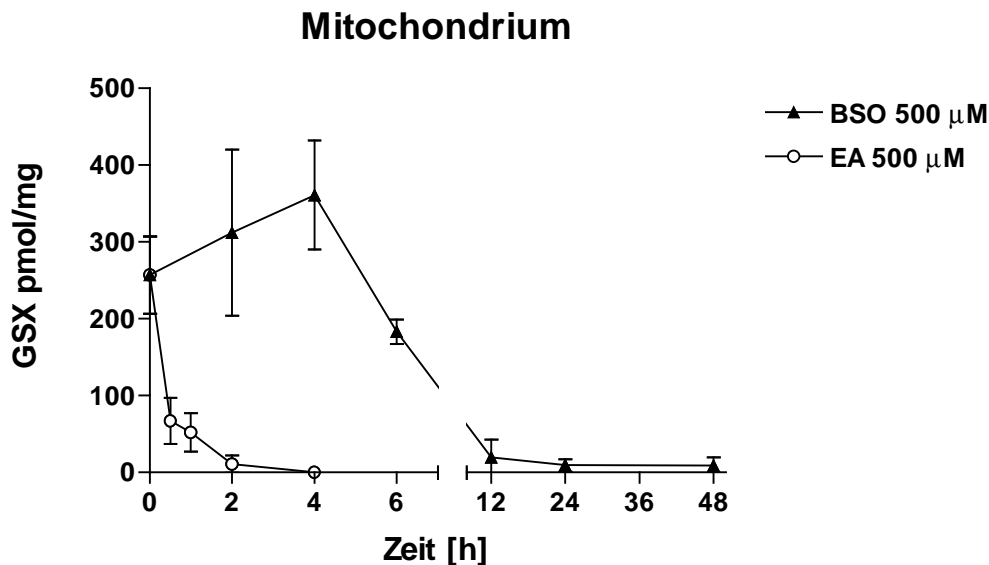


Abbildung 4-6: Glutathionspiegel in mitochondrialen Zelllysaten von PC 12 Zellen unter Behandlung mit L-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden aus den Kulturen fraktionierte Zelllysate für die Glutathionmessung gewonnen. Glutathion ist als $GSX = GSSG + 2 \cdot GSH$ angegeben und auf den Proteingehalt der Extrakte (in mg) normiert.

Während nach 4 h Behandlung mit 500 µM Etacrynsäure die Glutathionspiegel sowohl in der cytosolischen wie auch in der mitochondrialen Fraktion unterhalb die Detektionsgrenze des Meßverfahrens gefallen waren, so ergab sich bei L-Buthioninsulfoximin-behandelten Zellkulturen ein ähnlich rapider Glutathionverlust nur im cytosolischen Kompartiment,

wohingegen die Mitochondrien L-Buthioninsulfoximin-behandelter Zellen eine geringe Menge Glutathion auch gegen einen Konzentrationsgradienten über lange Zeit aufrechterhalten konnten. Normiert auf Prozent des Glutathiongehaltes unbehandelter Zellen wird die Diskrepanz der Glutathiondepletion durch BSO deutlicher.

| Zeit | 2 h | 4 h | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h |
|----------------------|--------------|--------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Cytosol | 70,1 ± 10,4 | 6,4 ± 7,5 | 4,8 ± 4,2 | 4,9 ± 0,9 | 1,4 ± 1,5 | 1,3 ± 1,0 |
| Mitochondrien | 121,5 ± 42,0 | 140,6 ± 27,6 | 71,3 ± 6,2 | 7,7 ± 8,9 | 3,6 ± 3,1 | 3,5 ± 4,0 |

Tabelle 4-2: Glutathiongehalte (in Prozent) cytosolischer und mitochondrialer Zellysate von BSO (500 µM) behandelten PC 12 Zellen. Die Glutathiongehalte der Lysate unbehandelter Kontrollzellen wurden als 100 % angenommen.

Die Restmenge von mitochondrialem Glutathion reicht offenbar bei Abwesenheit eines weiteren streßauslösenden, exogenen Stimulus aus, um eine mitochondriale Überproduktion radikaler Sauerstoffspezies zu vermeiden und den Zelltod infolge Glutathionmangels zumindest hinauszuzögern.

Als eine erste Auswirkung mitochondrialer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies wäre ein Funktionsverlust der Enzyme der mitochondrialen Elektronentransportkette zu erwarten. Daher wurde das Vermögen behandelter Zellkulturen zur Umsetzung des Substrats MTT untersucht.

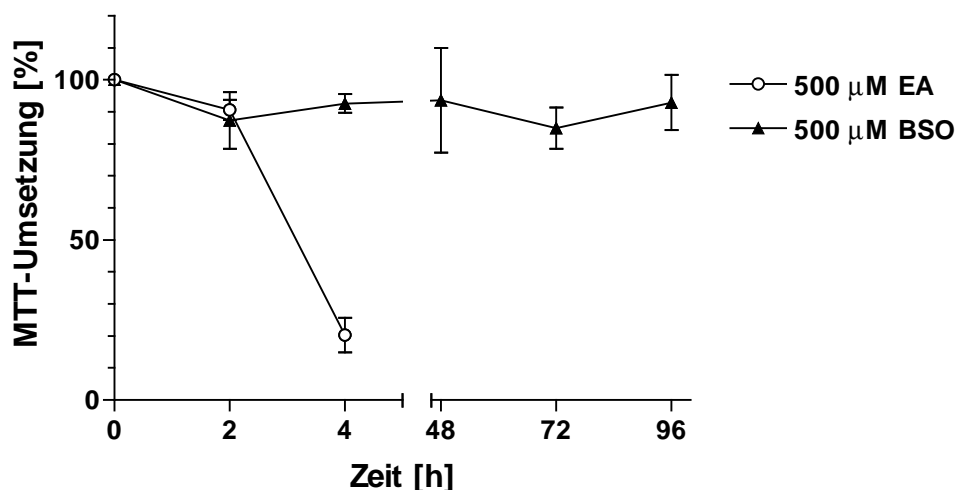


Abbildung 4-7: Messung der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem Formazansalz durch vorrangig mitochondriale Dehydrogenasen. An den entsprechenden Zeitpunkten wurde den Zellkulturen MTT zugeben und das Produkt nach 2 h photometrisch quantifiziert.

Die mit Etacrynsäure behandelten Zellen zeigten parallel zum zeitlichen Verlauf der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies einen Verlust der Fähigkeit, MTT zu reduzieren. Mit L-Buthioninsulfoximin inkubierte Zellkulturen wiesen keine Verminderung dieses Parameters auf. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Aktivitäten der Komplexe II/III (Succinat-Cytochrom C Oxidoreduktase) und IV (Cytochrom C Oxidase) der mitochondrialen Elektronentransportkette:

| | Unbehandelt | 500 μ M BSO 48 h | 500 μ M EA 4 h |
|--|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| Komplex II/III (nmol/min/mg) | 80,0 \pm 35,4 | 92,3 \pm 46,6 | 0 |
| Komplex IV (nmol/min/mg) | 302,7 \pm 167,3 | 256,4 \pm 21,0 | 71,0 \pm 30,1 |

Tabelle 4-3: Aktivitätsmessung der Komplexe II/III (Succinat-Cytochrom C Oxido-Reduktase) und IV (Cytochrom C Oxidase) in Homogenaten von aus PC 12 Zellen isolierten Mitochondrien. Die Zellkulturen wurden wie angegeben behandelt, anschließend wurden mitochondriale Fraktionen für enzymatische Messungen gewonnen.

Die Behandlung der Zellen mit Etacrynsäure führte zu einer schnell einsetzenden Schädigung dieser Enzymaktivitäten in mitochondrialen Zellfraktionen, wogegen die Aktivitäten der Proben gewonnen aus L-Buthioninsulfoximin-behandelten Zellen im Bereich der Normalwerte unbehauelter Zellen lagen, obgleich hohe Varianzen auftraten. Im Vergleich dieser beiden Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette erscheint der Komplex II/III durch die Etacrynsäurebehandlung in höherem Maße geschädigt als Komplex IV. Dieser Befund wurde erhärtet durch die Messung dieser Enzymaktivitäten in Mitochondrien isoliert aus Rattenvorderhirnen.

| Einwirkungszeit 500 μ M EA | Komplex II/III-Aktivität (%) | Komplex IV-Aktivität (%) |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1 h | 24,7 | 131,2 |
| 2 h | 2,9 | 87,9 |
| 3 h | 0 | 102,6 |
| 4 h | 0 | 90,1 |

Tabelle 4-4: Aktivitätsmessung der Komplexe II/III (Succinat-Cytochrom C Oxido-Reduktase) und IV (Cytochrom C Oxidase) in Homogenaten von aus Rattenvorderhirnen isolierten Mitochondrien. Zuvor wurden diese für die angegebene Zeitdauer mit 500 μ M Etacrynsäure bei 37 ° C inkubiert. Aufgeführt sind Prozent, wobei als 100 Prozent die Aktivität eines nur mit Vehikel behandelten Aliquots des Homogenats gesetzt wurde. Die absoluten Enzymaktivitäten der unbehauelten Kontrollen betragen nach 1 bzw. 4 h Versuchsdauer: 1,38 bzw. 0,39 μ mol/min/mg Protein (Komplex II/III) und 1,31 bzw. 2,39 μ mol/min/mg Protein (Komplex IV).

Auch hier verursachte Etacrynsäure nach kurzer Einwirkungszeit einen deutlichen Abfall der Komplex II/III Aktivität, während die Aktivität des Komplex IV in den mitochondrialen Homogenaten durch Inkubation mit Etacrynsäure nicht verändert wurde. Schließlich wurde auch das elektrochemische Potential über die mitochondrialen Membranen bestimmt.

| Inkubationsdauer [h] | Unbehandelt | 500 μ M BSO | 500 μ M EA | 50 μ M FCCP |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 4,38 \pm 0,04 | 4,38 \pm 0,04 | 4,38 \pm 0,04 | 4,38 \pm 0,04 |
| 7,5 | 4,38 \pm 0,04 | 4,40 \pm 0,07 | 4,41 \pm 0,08 | 4,27 \pm 0,06 |
| 14 | 3,10 \pm 0,19 | 3,10 \pm 0,05 | 4,43 \pm 0,04 | 4,35 \pm 0,06 |
| 23 | 2,77 \pm 0,02 | 2,90 \pm 0,10 | | 4,26 \pm 0,04 |

Tabelle 4-5: Messung des mitochondrialen Membranpotentials in PC 12 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Zellkulturen mit den angegebenen Substanzen und 60 nM JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Jodid) behandelt. Aufgeführt ist der Quotient der Emissionsfluoreszenz des Monomers bei 530 nm und des J-Aggregats bei 590 nm. Dieser sinkt bei Akkumulation des Farbstoffs in intakten Mitochondrien.

Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen monomerer Form und Aggregaten des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 benötigte allerdings im Falle von unbehandelten PC 12 Zellen bis zu 12 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch Etacrynsäure-behandelte Zellen bereits zu einem signifikanten Teil abgestorben. Die Messung von mit L-Buthioninsulfoximin behandelten Zellen zeigt jedoch, daß L-Buthioninsulfoximin die Bildung der Farbstoffaggregate infolge eines normalen mitochondrialen Membranpotentials nicht behindert. Dagegen wird die intramitochondriale Farbstoffaggregatbildung und somit ein Absinken des Quotienten der beiden Fluoreszenzemissionen komplett verhindert durch FCCP, einem Entkoppler des pH-Gradienten über die innere mitochondriale Membran somit gleichsam eine Negativkontrolle. Wesentliche Teile dieser Experimente wurden in einem zweiten Zellkultursystem, primären, cerebellären Nervenzellen aus der Körnerzellschicht des Rattenhirns verifiziert [70]. Dadurch konnte bestätigt werden, daß die beobachteten Effekte beider Substanzen nicht auf einem exklusiven Metabolismus von immortalisierten, undifferenzierten PC 12 Zellen beruhen, sondern ebenso in postmitotischen Neuronen gelten.

4.2 Die Auswirkung von Komplex I-Inhibition auf die zelluläre Glutathionhomöostase

Vieles deutet darauf hin, daß der Komplex I (NADH-Ubichinon Oxidoreductase) der mitochondrialen Elektronentransportkette von herausgehobener Bedeutung für die Funktion von Mitochondrien ist, insbesondere auch in pathologischen Situationen gekennzeichnet durch verstärkten oxidativen Streß. Für einen effizienten aeroben Stoffwechsel der Zelle ist dieses Enzym limitierend, da es die Reoxidation von NADH zu NAD⁺, welches wiederum für die Glykolyse und den Zitratzyclus notwendig ist, katalysiert. Wie zahlreiche Untersuchungen von Proben verschiedenster Gewebe aus Patienten mit muskulären und neurologischen Erkrankungen belegen, ist Komplex I hinsichtlich seiner Funktion offenbar besonders suszeptibel gegenüber zellulären Belastungen wie oxidativem Streß. Sieben der über 40 Untereinheiten dieses Enzyms sind auf im mitochondrialen Genom kodiert, welches wie bereits ausgeführt, besonders oxidativem Streß exponiert ist. Weiter haben biochemische Untersuchungen auch gezeigt, daß die Enzymaktivität anfällig gegenüber verschiedensten chemischen und physikalischen Reizen ist, was in der für die Enzymaktivität notwendigen, komplexen Raumstruktur innerhalb der inneren Mitochondrienmembran begründet sein kann. Wie bereits erwähnt, löst die Substanz 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) nach Oxidation und selektiver Aufnahme in dopaminerge Neurone in Mensch und Tier ein Parkinsonsyndrom aus. Biochemische Untersuchungen zeigten, daß der aktive Metabolit 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) Komplex I der Atmungskette hemmt. Da bei Parkinsonpatienten ebenfalls eine Minderfunktion des Komplex I festgestellt wurde, erhebt sich die Frage nach der Ursache dieser Hemmung im Falle des idiopathischen Parkinsonsyndroms. Vererbungsstudien erbrachten bislang keinen eindeutigen Hinweis für eine Mutation auf Ebene des mitochondrialen Genoms, als exogenes Toxin wurden Lösungsmittel wie n-Heptan und Schwermetalle wie Mangan in Betracht gezogen, konnten jedoch nicht in größerem Umfang als Ursache identifiziert werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der ebenfalls sehr früh auftretenden Verminderung der Glutathiongehalte bei präsymptomatischen Parkinsonformen und der erniedrigten Komplex I-Aktivität aufzuklären, wurden die Auswirkungen von Komplex I Inhibition auf die Glutathionhomöostase von PC 12 Zellen untersucht.

Verwendet wurden zwei Komplex I-Inhibitoren: das bereits erwähnte MPP⁺ und Rotenon, ein Furocumarinderivat aus der Derriswurzel, welches als Insektizid Anwendung findet. In Konzentrationen, welche teilweise bis vollständig die Enzymaktivität des Komplex I inhibieren, waren beide Verbindungen wachstumshemmend, jedoch nicht akut toxisch für PC

12 Zellen. Weiterführende Untersuchungen des Mechanismus dieses Wachstumsarrests durch MPP⁺ in dieser Arbeitsgruppe konnten belegen, daß dieser Wachstumsarrest durch die Induktion Zellzyklus-regulierender Gene vermittelt wird und daß der ab 48 h Behandlungsdauer eintretende Zelltod die Folge der Erschöpfung von Energiesubstraten und Anhäufung von Kataboliten im Kulturmedium der anaerob metabolisierenden Zellen ist [106]. Daher wurden für die Untersuchungen des Niveaus von oxidativem Streß und der Glutathionspiegel unter Behandlung mit MPP⁺ und Rotenon die ersten 48 Stunden nach Beginn einer Behandlung gewählt.

| Behandlung | Relative Fluoreszenz 2 h | Relative Fluoreszenz 4 h |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MPP ⁺ 250 µM | 86,9 ± 4,2 | 74,7 ± 1,6 |
| MPP ⁺ 2,5 mM | 90,7 ± 3,9 | 72,7 ± 1,9 |
| Rotenon 1 µM | 93,9 ± 6,6 | 80,0 ± 2,8 |
| Rotenon 10 µM | 98,2 ± 7,8 | 81,1 ± 4,5 |
| FeSO ₄ 500µM | 213,4 ± 113,6 *** | 210,2 ± 59,5 *** |

Tabelle 4-6: Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydrodichlorofluorescein in PC 12 Zellkulturen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit den Komplex I Inhibitoren MPP⁺ sowie Rotenon behandelt. Als Positivkontrolle wurde Eisen(II)sulfat zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies verwendet. Die relative Fluoreszenz ist angegeben als Prozent unbehandelter Kontrollkulturen. (*: p < 0,001).**

Messungen radikaler Sauerstoffspezies zu frühen Zeitpunkten der Inkubation mit beiden Komplex I-Inhibitoren erbrachten keinen Hinweis auf erhöhten oxidativen Streß. Tendenziell schienen beide Moleküle im Gegenteil das Niveau reaktiver Sauerstoffspezies zu erniedrigen.

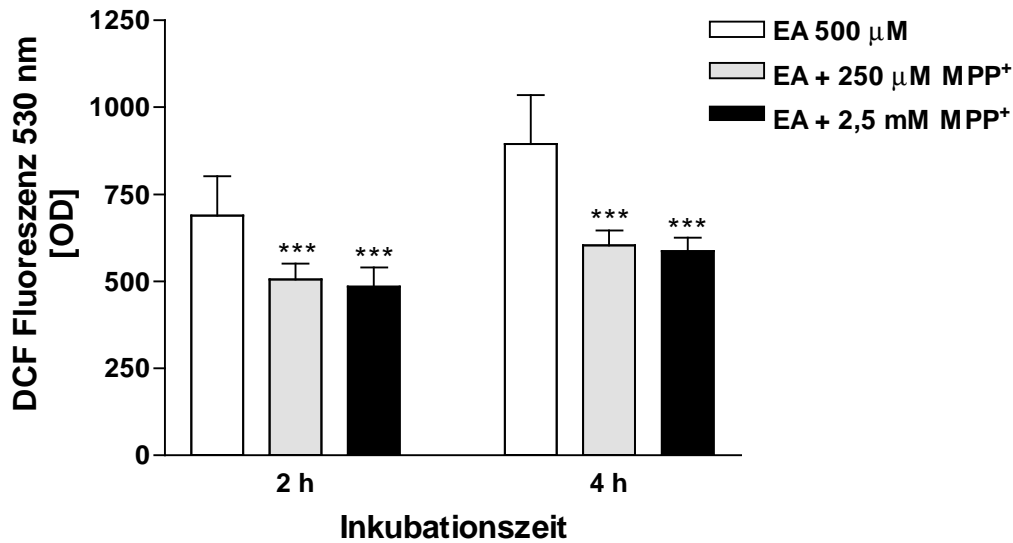


Abbildung 4-8: Messung freier Radikale mittels Oxidation von Dihydrodichlorofluoreszein nach Behandlung von PC 12 Zellen mit Etacrynsäure und MPP⁺ für die aufgeführten Zeiträume (*: p < 0,001 gegenüber EA 500 μM).**

Tatsächlich vermochte MPP⁺ (wie auch Rotenon, siehe dazu Tabelle 4-1), die durch Etacrynsäure verursachte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies signifikant zu vermindern, ein Beleg dafür, daß die mitochondriale Generation reaktiver Sauerstoffspezies durch Blockade des Eintritts von Elektronen in die mitochondriale Elektronentransportkette abgeschwächt werden kann. Um auszuschließen, daß ein geringer Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in den ersten Stunden einer MPP⁺ Behandlung, wie es für PC 12 Zellen beschrieben ist [107], durch die fluorometrische Messung des Dihydrodichlorofluorescein-Oxidationsprodukts direkt im Kulturgefaß nicht detektiert werden könnte, wurden diese Experimente in einem Durchflußzytometer verifiziert.

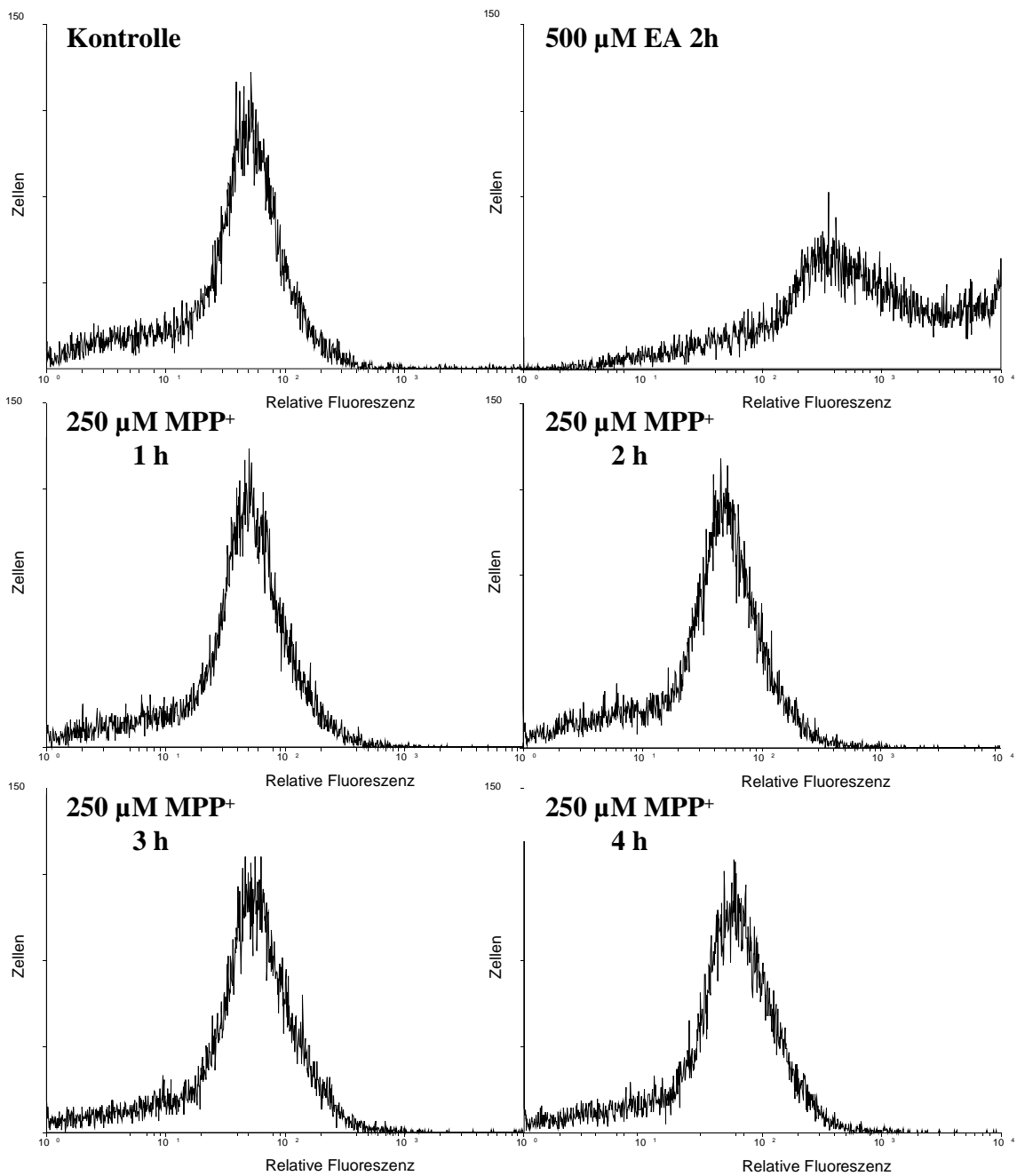


Abbildung 4-9: Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Dihydrodichlorofluorescein gefärbten PC 12 Zellen mittels Durchflußzytometrie. Die Behandlung der Zellen ist links oberhalb jeder Verlaufskurve angegeben. Die Ordinate gibt die Anzahl der vom Gerät erfassten Zellen mit den auf der Abszisse aufgetragenen Fluoreszenzintensitäten an. Für jede Bedingung wurden 20000 Zellen analysiert. Nur mit Etacrynsäure behandelte Zellen zeigen eine Verschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Kontrolle.

Auch mit diesem Detektionsverfahren konnte kein erhöhter oxidativer Streß an MPP⁺-behandelten PC 12 Zellen nachgewiesen werden. Eine Folge von oxidativem Streß sind wie bereits ausgeführt die Oxidation von Membranlipiden. Endprodukte dieser Prozesse können als Thiobarbitursäure-reaktive Aldehyde derivatisiert und im Vergleich zu einem Standard quantifiziert werden.

| Behandlung 48 h | nmol MDA/10 ⁶ Zellen |
|--|---------------------------------|
| Kontrolle (unbehandelt) | 0,089 ± 0,022 |
| MPP ⁺ 250 µM | 0,172 ± 0,085 |
| FeSO ₄ 500µM | 0,708 ± 0,056 ** |
| FeSO ₄ 500µM + MPP ⁺ 250µM | 0,715 ± 0,039 ** |

Tabelle 4-7: Bestimmung von Peroxidationsprodukten in PC 12 Zellkulturen nach 2 d Inkubation mit MPP⁺. Wiederum wurde Eisen(II)sulfat als Positivkontrolle verwendet. Das erhaltene photometrische Signal Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen in Zellextrakten wurde durch Vergleich mit einer Eichreihe von Malondialdehyd (MDA) quantifiziert (: p < 0,01).**

Der Gehalt solcher Peroxidationsprodukte war in PC 12 Zellen nach 48 h Behandlung mit MPP⁺ nicht erhöht. Zusammengenommen erbrachten diese Experimente keinen Hinweis für gesteigerten oxidativen Streß infolge Inkubation der Zellen mit MPP⁺. Die Messung der Glutathionspiegel zeigte jedoch markante, konzentrationsabhängige Effekte beider Komplex I-Inhibitoren auf die Glutathionhomöostase.

| Behandlung | GSH-Gehalt [%] | GSH-Gehalt [%] | GSH-Gehalt [%] |
|------------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| | 2 h | 12 h | 24 h |
| MPP ⁺ 250 μ M | 78,3 \pm 23,1 | 113,3 \pm 26,6 | 163,5 \pm 12,7 *** |
| Rotenon 100 nM | 138,4 \pm 15,6 | 108,5 \pm 5,11 | 201,1 \pm 35,9 *** |
| Rotenon 10 nM | 94,7 \pm 15,4 | 114,6 \pm 13,5 | 168,2 \pm 35,2 * |

Tabelle 4-8: Einfluß niedriger Konzentrationen der Komplex I Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon auf den Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH) in PC 12 Zellkulturen. Die gemessenen Glutathionmengen wurden auf den Wert unbehandelter Kontrollen (=100 %) normiert. Unbehandelte Kontrollen enthielten zwischen 24,8 \pm 2,9 und 29,12 \pm 5,3 nmol GSH /mg Protein (*: p < 0,001, *: p < 0,05 gegenüber Kontrollen).**

| Behandlung | GSSG-Gehalt [%] | GSSG-Gehalt [%] | GSSG-Gehalt [%] |
|------------------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| | 2 h | 12 h | 24 h |
| MPP ⁺ 250 μ M | 416,5 \pm 43,0 | 424,1 \pm 111,0 | 678,5 \pm 286,1 ** |
| Rotenon 100 nM | 140,6 \pm 29,1 | 130,3 \pm 10,3 | 204,5 \pm 34,4 * |
| Rotenon 10 nM | 120,1 \pm 8,6 | 123,8 \pm 24,6 | 164,8 \pm 38,1 |

Tabelle 4-9: Einfluß niedriger Konzentrationen der Komplex I Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon auf den Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) in PC 12 Zellkulturen. Die gemessenen Glutathionmengen wurden auf den Wert unbehandelter Kontrollen (=100 %) normiert. Unbehandelte Kontrollen enthielten zwischen 0,79 \pm 0,21 und 1,00 \pm 0,21 nmol GSSG /mg Protein (*: p < 0,001, *: p < 0,05 gegenüber Kontrollen).**

In Konzentrationsbereichen, welche in der Enzymaktivitätsmessung eine nicht vollständige Inhibition des Komplex I erreichten (siehe Abbildung 4-10 und Abschnitt 5.2), verursachten beide Substanzen eine deutliche Erhöhung der zellulären Spiegel von reduziertem (GSH) und in wesentlichem Ausmaß auch oxidierten Glutathion (GSSG). Wurden den Zellkulturen jedoch zehnfach bis hundertfach höhere Konzentrationen beider Verbindungen zugegeben, fand sich ein massiver Abfall des Gehalts von reduziertem Glutathion (GSH) und ein verstärkter Anstieg des Gehalts von oxidiertem Glutathion (GSSG).

| Behandlung | GSH-Gehalt [%] | GSH-Gehalt [%] | GSH-Gehalt [%] |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 2 h | 12 h | 24 h |
| MPP ⁺ 2,5 mM | 0,44 ± 5,6 *** | 7,06 ± 13,8 *** | 12,5 ± 19,9 *** |
| Rotenon 1 µM | 59,9 ± 7,7 *** | 51,8 ± 5,3 *** | 25,0 ± 3,9 *** |
| Rotenon 10 µM | 73,5 ± 9,4 ** | 32,9 ± 4,5 *** | 17,4 ± 4,1 *** |

Tabelle 4-10: Einfluß hoher Konzentrationen der Komplex I Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon auf den Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH) in PC 12 Zellkulturen. Die gemessenen Glutathionmengen wurden auf den Wert unbehandelter Kontrollen (=100 %) normiert. Unbehandelte Kontrollen enthielten zwischen 24,8 ± 2,9 und 29,12 ± 5,3 nmol GSH /mg Protein (*: p < 0,001, **: p < 0,01 gegenüber Kontrollen).**

| Behandlung | GSSG-Gehalt [%] | GSSG-Gehalt [%] | GSSG-Gehalt [%] |
|-------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| | 2 h | 12 h | 24 h |
| MPP ⁺ 2,5 mM | 973,4 ± 46,8 *** | 1659,5 ± 113,9 *** | 1715,2 ± 267,1 *** |
| Rotenon 1 µM | 256 ± 56 * | 362 ± 87 *** | 457 ± 48 *** |
| Rotenon 10 µM | 377 ± 28 *** | 557 ± 26 *** | 584 ± 39 *** |

Tabelle 4-11: Einfluß hoher Konzentrationen der Komplex I Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon auf den Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) in PC 12 Zellkulturen. Die gemessenen Glutathionmengen wurden auf den Wert unbehandelter Kontrollen (=100 %) normiert. Unbehandelte Kontrollen enthielten zwischen 0,79 ± 0,21 und 1,00 ± 0,21 nmol GSSG /mg Protein (*: p < 0,001, *: p < 0,05 gegenüber Kontrollen).**

Voruntersuchungen der Toxizität von MPP⁺ und Rotenon hatten gezeigt, daß auch in diesen höheren Konzentrationen beide Komplex I-Inhibitoren einen Wachstumsarrest infolge Übergang zu anaeroben Stoffwechsel, jedoch kein Absterben der Zellkulturen bewirkten [106]. Ein Maß für die Last an oxidativem Streß in Geweben und Zellen ist der Quotient von oxidiertem zum gesamtem Glutathion: GSSG / (GSH+GSSG). Dieses Verhältnis liegt für viele Gewebe- und Zelltypen bei 1 : 30 bis 1 : 100, entsprechend 1-3 % oxidiertes Glutathion.

| Ratio GSSG/ (GSH+GSSG) | 0 h | 2 h | 12 h | 24 h |
|------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 250 µM MPP ⁺ | 0,0305 ± 0,0048 | 0,1635 ± 0,071 | 0,1116 ± 0,0342 | 0,1233 ± 0,0645 |
| 2,5 mM MPP ⁺ | 0,0305 ± 0,0048 | 0,9964 ± 0,083 (***) | 0,9068 ± 0,1473 (***) | 0,8195 ± 0,0727 (***) |
| 10 nm Rotenon | 0,0303 ± 0,0024 | 0,0386 ± 0,0039 (*) | 0,0324 ± 0,0031 | 0,0295 ± 0,0011 |
| 100 nm Rotenon | 0,0303 ± 0,0024 | 0,0312 ± 0,007 | 0,0362 ± 0,0026 | 0,0308 ± 0,0011 |
| 1 µM Rotenon | 0,0334 ± 0,0053 | 0,1304 ± 0,0194 | 0,2029 ± 0,0777 (**) | 0,3855 ± 0,03 (***) |
| 10 µM Rotenon | 0,0303 ± 0,0024 | 0,1518 ± 0,0228 | 0,3694 ± 0,0233 (***) | 0,5495 ± 0,1017 (***) |

Tabelle 4-12: Anteil des oxidierten Glutathions (GSSG) am gesamtem Glutathion in PC 12 Zellen bei Behandlung mit MPP⁺ und Rotenon. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden aus den Kulturen Lysate gewonnen und nachfolgend Gesamtglutathion (GSX) und oxidiertes Glutathion (GSSG) bestimmt (*: p<0,001, **: p<0,01, *: p<0,05 gegenüber 0 h).**

Diese Daten zeigen, daß beide Komplex I-Inhibitoren in Konzentrationen, welche zu einer mindestens halbmaximalen Hemmung des Enzyms führen, einen zeitabhängigen Anstieg der zellulären Glutathionspiegel bewirkten. Dieser Anstieg verteilte sich zu ungefähr gleichen Teilen auf die reduzierte und die oxidierte Spezies, so daß das Verhältnis von oxidiertem zu gesamt-Glutathion nicht oder nur schwach verändert war. Im Gegensatz dazu verursachte die Behandlung mit zehnfach- bzw. hundertfach höheren Konzentrationen von MPP⁺ und Rotenon einen starken Abfall des zellulären gesamt-Glutathions begleitet von einem signifikanten Anstieg des oxidierten Glutathions. Der sich daraus ableitenden Verlust des reduzierten Glutathions spiegelt sich in einem drastischen Anstieg des Quotienten der oxidierten Form gegen den gesamten Pool. Nachdem auch diese höheren Konzentrationen beider Komplex I Inhibitoren kein meßbares Ausmaß an reaktiven Sauerstoffspezies in PC 12 Zellen ausgelöst hatten, muß man folgern, daß diese Verschiebung der zellulären Redoxbalance direkt oder indirekt durch die Komplex I Funktionsminderung und die folgenden metabolischen Konsequenzen verursacht wird. Eine von der Komplex I Inhibition unabhängige Wirkung müßte beiden Verbindungen gemein sein und erscheint daher angesichts ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur unwahrscheinlich. Die Messung der Komplex I Aktivität in Homogenaten von PC 12 Zellen demonstrierte, daß MPP⁺ in einer Konzentration

von bis 500 μM bei Zugabe zu Homogenaten unbehandelter Zellen die Aktivität des Enzyms deutlich vermindert.

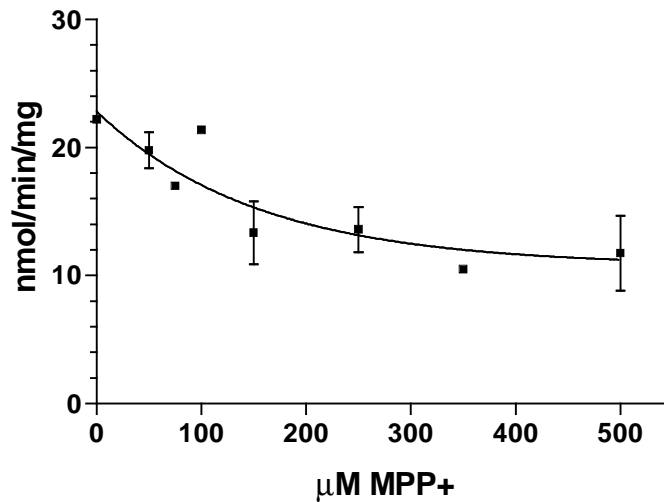


Abbildung 4-10: Messung der Komplex I Aktivität in Homogenaten unbehandelter PC 12 Zellen unter Zugabe von MPP^+ ($n=2-3$). Die Linie zeigt den Verlauf einer nichtlinearen Regressionsanalyse der Funktion $v = S \cdot \exp^{-k \cdot X} + B$, wobei X für die MPP^+ Konzentration steht. S bezeichnet das korrigierte Signal bei $X = 0$ und B den nicht-inhibierbaren Hintergrund. Die errechneten Werte betragen für $S = 12,06 \pm 2,82 \text{ nmol/min/mg}$, $B = 10,77 \pm 2,60 \text{ nmol/min/mg}$ und $k = 0,0065 \pm 0,0042 \mu\text{M}^{-1}$.

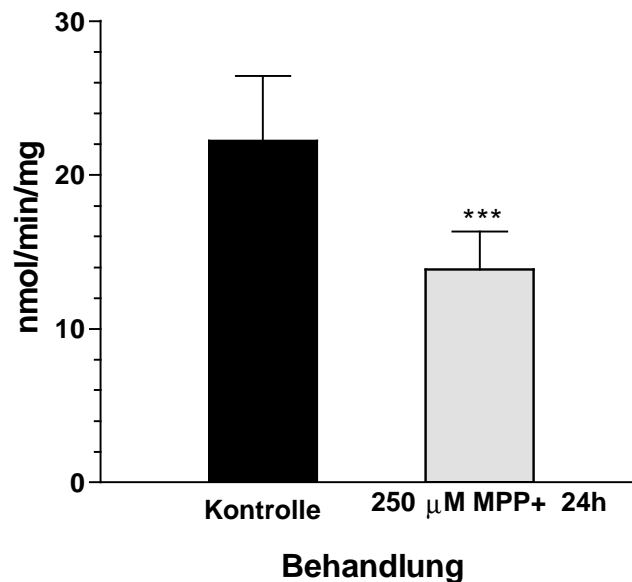


Abbildung 4-11: Messung der Komplex I Aktivität in Homogenaten von PC 12 Zellen, welche für 24 h mit MPP^+ behandelt worden sind ($n = 8$, ***: $p < 0,001$ gegenüber unbehandelten Kontrollen).

Die Aktivität dieses Enzyms in den Homogenaten von PC 12 Zellkulturen, welche für 24 h mit 250 $\mu\text{M MPP}^+$ vorbehandelt worden waren, war um 36 % gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Dieser deutliche Effekt (trotz Verdünnung des Homogenates im Puffer des

Meßansatzes) belegt einerseits die feste, irreversible Bindung des Hemmstoffs an das Enzym, ist zum anderen aber auch in der Akkumulation des MPP^+ -Kations in den Mitochondrien der Zellen begründet. Dies bedeutet, daß die in vivo erreichten Konzentrationen des Inhibitors am Ort der Wirkung, an der inneren mitochondrialen Membran, höher als die Konzentration im Kulturmedium zu veranschlagen sind. Für die Situation der Zelle kann man folglich bei einer Behandlung mit $250 \mu\text{M}$ MPP^+ von einer mindestens halbmaximalen Inhibition des Komplex I ausgehen. Bezüglich der Konzentrationen von Rotenon belegen aus der Literatur bekannte Daten [108; 109], daß im Konzentrationsbereich unter $1 \mu\text{M}$ ebenfalls halbmaximales oder geringeres Ausmaß der Komplex I Hemmung zu erwarten ist.

Daß umgekehrt unter Bedingungen von oxidativem Streß die Funktion des Komplex I sehr empfindlich ist, wurde bestätigt durch Enzymaktivitätsbestimmungen an Homogenaten unbehandelter Zellen, welche mit oxidiertem Glutathion oder Etacrynsäure versetzt wurden.

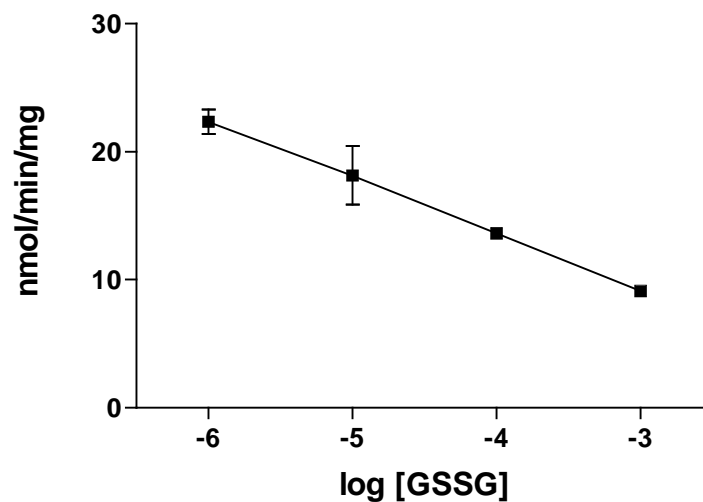


Abbildung 4-12: Messung der Komplex I Aktivität in Zellhomogenaten nach Zugabe von oxidiertem Glutathion (GSSG). In unbehandelten Homogenaten betrug die Komplex I Aktivität $42,8 \pm 14,8$ nmol/min/mg Protein.

| Zugabe zum Homogenat | Komplex I Aktivität [% der Kontrolle] | Komplex II/III Aktivität [% der Kontrolle] |
|----------------------|---------------------------------------|--|
| 1 μ M GSSG | 58,5 \pm 2,2 | 89,5 |
| 10 μ M GSSG | 44,0 \pm 8,1 | 83,0 |
| 10 μ M EA | 47,1 \pm 6,1 | 88,6 |
| 100 μ M EA | 59,8 \pm 0,4 | 78,4 |

Tabelle 4-13: Bestimmung der Enzymaktivitäten der Komplexe I (n=3) und II/III an Zellhomogenaten, die mit verschiedenen Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) oder Etacrynsäure versetzt wurden. Die gemessenen Aktivitäten wurden jeweils auf die Aktivität eines unbehandelten Aliquots (=100%) normiert. In unbehandelten Homogenaten betrug die Komplex I Aktivität 42,8 \pm 14,8 nmol/min/mg Protein und die Komplex II/III Aktivität 16,5 \pm 1,3 nmol/min/mg Protein.

Bereits über 40 % der Komplex I Aktivität war durch Zugabe von 1 μ M Glutathiondisulfid wie auch Etacrynsäure hemmbar, unter gleichen Bedingungen jedoch nur etwas mehr als 10 % der Komplex II/III (Succinat-Cytochrom C Oxidoreduktase) Aktivität. Der Grund für diese beobachtete Diskrepanz ist vermutlich in der höheren Bedeutung von Thiolgruppen (der mitochondrialen Membran oder des Proteins selbst) für Struktur und Funktion des Komplex I zu suchen [110]. Die Hemmung der Enzymaktivität durch Glutathiondisulfid läßt spekulieren, daß eine Komplex I Funktionsminderung bereits durch eine veränderte Redoxbalance, ohne bzw. vor dem Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, resultieren kann. Neuere Untersuchungen bestätigen die hohe Sensitivität des Komplex I gegenüber einem Absinken der zellulären Glutathionspiegel [111].

Weitere Untersuchungen zielten darauf, direkte Folgen der gestiegenen zellulären Spiegel an oxidiertem Glutathion (GSSG) zu identifizieren, die möglicherweise Zelltod begünstigen oder auslösen können. Der Transkriptionsfaktor NF κ B spielt vielfältige Rollen bei der Regulation von Genexpression bei Entzündungsprozessen, ausgelöst z.B. durch Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) oder auch oxidativen Streß [112; 113]. In verschiedensten Modellen, auch in Neuronen, konnten sowohl protektive als auch pathogene Wirkungen der Aktivierung von NF κ B gezeigt werden [114]. So wurde auch eine erhöhte Aktivierung, das heißt Translokation des Proteins in den Zellkern im Nervengewebe der Substantia nigra von

Parkinsonpatienten berichtet [115]. Insbesondere wurde gezeigt, daß die für diese Translokation nötigen konformellen Änderungen des NFκB Proteinkomplexes vom zellulären Thiol/Disulfid-Verhältnis und dem Niveau reaktiver Sauerstoffspezies abhängig sind [116; 117]. Es wurde deshalb überprüft, ob unter den Bedingungen einer Behandlung der Zellen mit MPP⁺ und dem folgenden Szenario eines anaeroben Stoffwechsels und einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von GSSG das Ausmaß der Translokation des NFκB Transkriptionsfaktors in den Zellkern verändert ist.

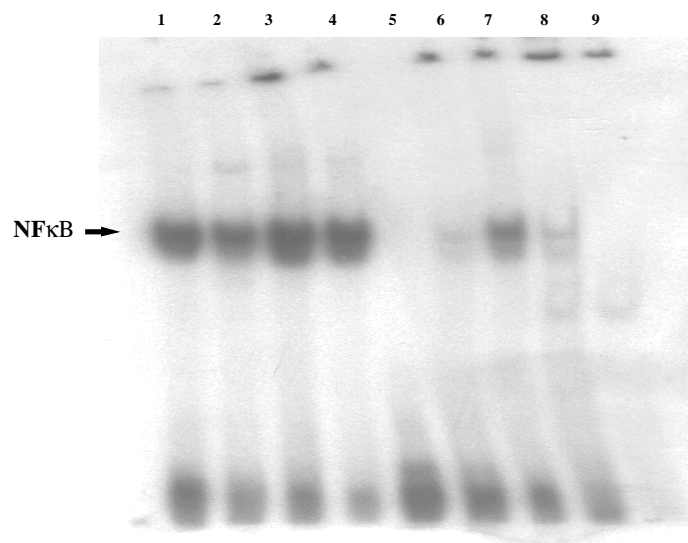


Abbildung 4-13: Electric mobility shift assay (EMSA) durchgeführt mit nukleären Proteinextrakten aus PC 12 Zellen und einer radioaktiv (³²P) markierten DNA Sonde, welche die NFκB Bindesequenz aufweist. Spur 1: unbehandelte Zellen (Kontrolle), Spur 2: MPP⁺ 250μM 2 h, Spur 3: MPP⁺ 250μM 12 h, Spur 4: MPP⁺ 250μM 24 h, Spur 5: Ohne Kernprotein (Negativkontrolle), Spur 6: Kontrolleextrakte unter Zugabe eines Überschusses von nichtmarkierter NFκB-Sonde (spezifische Konkurrenz), Spur 7: Überschuss an nichtmarkierter, nichtbindender Sonde (poly-dI, unspezifische Konkurrenz), Spur 8: Kontrolleextrakte unter Zugabe von 50 μM GSSG, Spur 9: Kontrolleextrakte unter Zugabe von 200 μM GSSG .

Es erwies sich jedoch, daß zu keinem der hier untersuchten frühen Zeitpunkte die vorhandene basale Aktivierung von NFκB durch Behandlung der Zellen mit MPP⁺ verändert war. Demgegenüber konnte durch Zugabe von GSSG die Fähigkeit des NFκB Proteins zur DNA-Bindung unterdrückt werden. Die gemessenen hohen Spiegel an GSSG in MPP⁺-behandelten Zellen scheinen daher nicht im Zellkern wirksam. Folglich ist eine veränderte Transkription NFκB-regulierter Gene als zelluläre Reaktion auf die durch Komplex I-Inhibition verursachten Effekte auszuschließen. Neben NFκB existiert freilich noch eine große Zahl

Stress-sensitiver Promotoren und Transkriptionsfaktoren, wie auch die oben erwähnten elektrophile-responsive elements im untranslatierten Bereich vieler Gene des Entgiftungsmetabolismus. Mit Rücksicht auf diese Vielzahl und das Fehlen eines erhöhten Ausmasses reaktiver Sauerstoffspezies nach MPP⁺- oder Rotenon-Behandlung wurden diese jedoch nicht weiter untersucht.

4.3 *Mitochondrialer Glutathiontransport*

Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Kinetiken der Glutathiondepletion durch BSO- bzw. EA in PC 12 und zerebellären Körnerzellen ergab sich die Frage, ob und in welchem Maße Mitochondrien in Neuronen in der Lage sind, Glutathion durch einen Transportvorgang aufzunehmen. Bereits in früheren Untersuchungen wurde aufgrund einer biphasischen Kinetik bei Depletion des zellulären Glutathions und verschiedener Halbwertszeiten cytosolischen bzw. mitochondrialen Glutathions ein solcher Transportmechanismus vermutet [118; 17; 18; 119]. Bislang wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von GSH an Mitochondrien aus Nierengewebe [23; 22] und auf Transkriptionsebene in Lebergewebe charakterisiert [19; 20]. Darüberhinaus gibt es grundsätzliche Überlegungen, welche für die Existenz eines mitochondrialen Glutathiontransportes sprechen:

- I. Die Aktivitäten der Enzyme der Glutathionsynthese bzw. des γ -Glutamylzyklus konnten nicht in Mitochondrien nachgewiesen werden [18]. Ebenso wurden mittels Immunhistochemie nur geringe Mengen der Vorstufe γ -Glutamylcystein in Mitochondrien gefunden [120].
- II. Die Matrix der Mitochondrien ist gegenüber dem Cytosol negativ geladen und weist einen höheren pH-Wert auf, beides Folgen der Protonentranslokationsvorgänge der Elektronentransportkette. Dagegen trägt das Glutathionmolekül bereits bei physiologischem pH eine negative Nettoladung.
- III. Obwohl unter Bedingungen einer inhibierten Neusynthese oder Glutathionverknappung der mitochondriale Glutathionpool sehr viel langsamer abnimmt als der cytosolische und eine größere Halbwertszeit hat, wird radioaktiv markiertes Cystein in Glutathion beider Kompartimente etwa gleich schnell inkorporiert [18]. Diese Beobachtung wird am besten erklärt durch einen Transport, der durch seine Richtungsspezifität die Fähigkeit dieser Organellen, sich gegen eine GSH-Mangelsituation der übrigen Zelle schützen zu können, gewährleistet.

Um einen möglichen mitochondrialen Glutathiontransport in Neuronen zu untersuchen, wurde zunächst versucht, aus PC 12 Zellen eine Mitochondrienpräparation zu etablieren. Diese sollte eine hinreichende Reinheit und Ausbeute zur Messung eines spezifisch mitochondrialen Glutathiontransports bzw. einer Aufnahme von Glutathion durch diese Organellen bieten. Wie bereits unter 3.4.1 beschrieben, zeigte jedoch die genauere Untersuchung der bis dato erhaltenen Präparation von Mitochondrien aus PC 12 Zellen durch Elektronenmikroskopie

das Vorhandensein von anderen Zellbestandteilen und Organellen, insbesondere Fragmente des endoplasmatischen Reticulums, so daß schließlich die Reinheit und Einheitlichkeit dieser Mitochondrienfraktion als für die Messung einer mitochondrialen Glutathionaufnahme ungenügend beurteilt wurden. Deshalb wurden im weiteren Mitochondrien aus dem Vorderhirn der Ratte isoliert. Auch hier wurden zunächst verschiedene Fraktionierungsverfahren evaluiert und optimiert (siehe Abschnitt .3.4.2). Nachdem das optimale Fraktionierungsprotokoll ausgewählt war, wurde in Vorexperimenten eine mitochondriale Glutathionaufnahme von zunächst nichtmarkiertem GSH untersucht. Zum einen sollte durch die Messung des Glutathiongehaltes mittels des enzymatischen Recyclingverfahrens getestet werden, ob das aufgenommene Glutathion einer raschen Spaltung oder Derivatisierung unterliegt, zum anderen sollte Aufschluß über den für eine Aufnahme nötigen Konzentrationsbereich an zugegebenem Glutathion gewonnen werden. Dieser sollte verglichen werden mit den Konzentrationsbedingungen des in der Literatur beschriebenen GSH-Transports von Leber- und Nierenmitochondrien.

| GSH-Konzentration | Kontrolle | 0 | 500 µM | 5 mM |
|---|------------------|-------------|---------------|----------------|
| Mitochondrialer GSH-Gehalt nach 30 s [nmol/mg] | 1,31 | 1,21 ± 0,21 | 1,94 ± 0,21 * | 9,28 ± 2,83 ** |
| Entspricht einer (berechneten) GSH-Aufnahmegeschwindigkeit pro min [nmol/min/mg] | | | 1,46 ± 0,41 | 16,13 ± 5,67 |

Tabelle 4-14: Bestimmung der Aufnahme unmarkierten Glutathions durch Mitochondrien isoliert aus dem Rattenvorderhirn. Ein Aliquot frisch präparierter Mitochondrien, entsprechend 306 µg Protein, wurde 30 s bei Raumtemperatur mit der angegebenen Konzentration an Glutathion inkubiert. Nach Filtration und Extraktion wurde das aufgenommene Glutathion mittels des enzymatischen Recyclingverfahrens photometrisch bestimmt. Zur Abschätzung eines eventuellen Glutathionverlustes durch die Filtrationsprozedur wurde der Glutathiongehalt eines unbehandelten Aliquots bestimmt (n=3, * : p<0,05, **: p<0,01).

Diese Vorversuche zeigen, daß reduziertes Glutathion von Nervenzellmitochondrien aufgenommen werden kann. Die Anwesenheit von 0,25 mM Acivicin (α -Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoazolessigsäure), eines Inhibitors der γ -Glutamyltranspeptidase, im Inkubationsmedium, schließt einen Transport von Glutathionspaltprodukten oder Aminosäurekonjugaten aus. Die Menge von oxidiertem Glutathion in den Mitochondrien war unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. Auch die Abschätzung des Einflusses der

exogenen Glutathionkonzentration auf die (berechnete) Transportgeschwindigkeit weist in die Richtung der in der Literatur beschriebenen Parameter des mitochondrialen Glutathiontransportes in Leber und Niere: nimmt man cytoplasmatische Konzentrationen von GSH im Bereich von 1-10 mM an, so ist zu erwarten, daß die im Verlauf der Isolationsprozedur an GSH verarmten Mitochondrien exogen angebotenes Glutathion in diesem Konzentrationsbereich effizient aufnehmen. Diese Annahme wird gestützt durch den Vergleich der (berechneten) GSH-Aufnahmegeschwindigkeiten bei 0,5 mM respektive 5 mM (Tabelle 4-14).

Für die folgenden Austauschexperimente wurde ³⁵Schwefel-radioaktiv markiertes Glutathion verwendet, da dieses mittels Szintillationsphotometrie detektierbar ist und somit mehrere Meßpunkte mit einer isolierten Mitochondrienpräparation angefertigt werden konnten. Zwei Ansätze wurden durchgeführt: Zum einen sollte die Aufnahme exogen dargebotenen Glutathions durch Mitochondrien über einen großen Konzentrationsbereich verfolgt werden. Dies sollte Rückschlüsse ermöglichen, ob dieser Transport aus mehreren, unterschiedlich affinen Komponenten besteht, ob der Transport in einem physiologisch plausiblen Konzentrationsbereich arbeitet und durch welches kinetische Modell der Transport anzunähern ist. Zum zweiten sollte der Zeitverlauf der Aufnahme von Glutathion durch isolierte Mitochondrien untersucht werden, um Erkenntnisse hinsichtlich einer Sättigbarkeit und der Geschwindigkeit einer Gleichgewichtseinstellung zu erhalten. Zunächst wurde in mehreren Versuchsreihen die Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit des angebotenen Glutathions von der extramitochondrialen Konzentration untersucht. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1 µM bis 75 mM Glutathion gewählt, ein mitochondrialer Glutathiontransport sollte erwartungsgemäß im Bereich physiologischer, millimolarer Glutathionkonzentrationen aktiv sein, auch sind nahezu alle bisherigen Daten zum mitochondrialen Glutathiontransport in anderen Gewebearten in diesem Konzentrationsbereich erhoben worden. Es zeigte sich, daß frisch isolierte Mitochondrien aus dem Rattenhirn, bei Inkubation für 30 sec beginnend bei millimolaren Glutathionkonzentrationen rasch Glutathion akkumulieren. Die Geschwindigkeit des Aufnahmevorgangs steigt bis zu einer Konzentration von 50 mM Glutathion an, bei 50 mM und 75 mM GSH scheint eine Sättigung aufzutreten. Bei solch hohen, unphysiologischen Glutathionkonzentrationen ist jedoch zusätzlich eine unspezifische Glutathionaufnahme infolge Diffusion zu vermuten oder eine Schädigung der Mitochondrien, beide Phänomene ebenso wie höhere Varianzen der gemessenen Aufnahmegeschwindigkeiten in diesem Bereich wurden auch in früheren Studien zur mitochondrialen Glutathionaufnahme

beobachtet [21; 22]. Auf eine Gewichtung der Meßwerte in diesem Bereich für die kinetische Auswertung wurde dennoch verzichtet. Die Art der Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit durch vermutete Transportproteine von der Konzentration der transportierten Substanz sollte durch eine nichtlineare Regressionsanalyse eingegrenzt werden. Zur linearen Regressionsanalyse von Transportprozessen ist in der Literatur beschrieben die von der allgemeinen Michaelis Menten Gleichung abgeleitete Beziehung für eine Reaktion mit vorgelagertem Gleichgewicht [90]:



Gleichung 4-1: E: Enzym, in diesem Falle ein Transporter, welcher Glutathion über die mitochondrialen Membranen transloziert, S: Substrat, exogen angebotenes Glutathion, P: Produkt, Glutathion in den Mitochondrien.

Zwei Annahmen liegen der Michaelis Menten Kinetik zugrunde:

- Die Zunahme der Reaktionsprodukte wird zu einem Zeitpunkt gemessen, da das Substrat im Überschuß vorliegt und die Konzentration des Produktes linear über die Zeit ansteigt (Anfangsgeschwindigkeit einer Reaktion). Dies impliziert weiterhin, daß die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes [ES] in diesem Zeitraum konstant bleibt. Diese Bedingung ist bei den dargestellten Experimenten erfüllt: Noch bei der niedrigsten angebotenen Glutathionkonzentration von 1 µM lag die Menge des aufgenommenen Glutathions um 3 Größenordnungen unter der Menge Glutathion im Ansatz.
- Die Rückreaktion $[E] + [P] \longrightarrow [ES]$ kann vernachlässigt werden, da zu diesem frühen Zeitpunkt der Reaktion die Konzentration des Produktes [P] sehr niedrig ist. Für diese zweite Annahme spricht, daß die Mitochondrien während der Isolationsprozedur Glutathion verloren haben sollten und somit die Glutathionaufnahme während dieser frühen Phase die dominierende Teilreaktion ist. Dies wird ebenfalls durch publizierte Daten unterstützt, welche den Zeitpunkt des Aufkommens der Rückreaktion, d.h. Efflux von Glutathion und der Einstellung des Gleichgewichts (steady state) auf mehrere Minuten taxieren .

Gemäß diesen Überlegungen wurden also die erhaltenen Werte für die Glutathionaufnahme nach 30 sekundiger Inkubation einer nichtlinearen Regressionsanalyse nach dem Prinzip der geringsten Fehlerquadrate mit einer Michaelis Menten Kinetik unterzogen:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung 4-2: v : Aufnahmegeschwindigkeit, v_{\max} : maximale Aufnahmegeschwindigkeit bei Sättigung, K_m : Michaelis Menten Konstante, definiert als: $\frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1}$, gleichzeitig diejenige Substratkonzentration, bei welcher halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

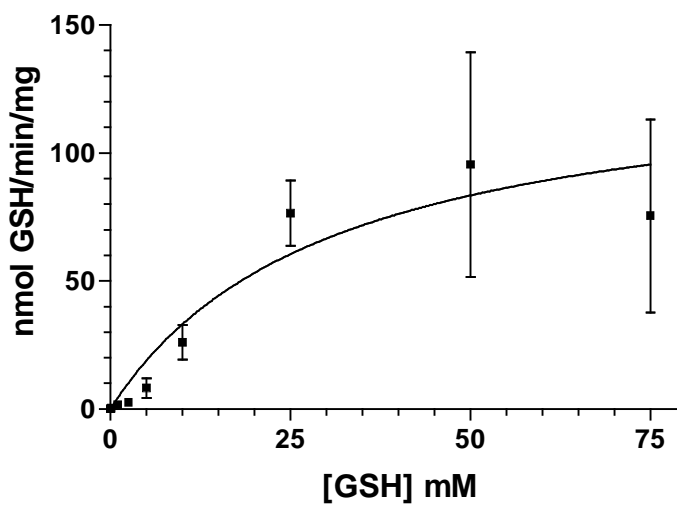


Abbildung 4-14: nicht-lineare Regression (fit) der Glutathionaufnahme­geschwindigkeit isolierter Mitochondrien nach einer einfachen Michaelis Menten Kinetik (Gleichung 4-2). Die Mittelwerte \pm SEM der Variablen betragen v_{\max} : $134,9 \pm 38,2$ nmol/min/mg und K_m : $30,8 \pm 18,7$ mmol ($n=10-12$).

Die Ergebnisse der Analyse erwiesen, daß die gewonnenen Daten durch ein Michaelis Menten Modell nur sehr grob angenähert werden. Insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeiten bei niedrigen Glutathionkonzentrationen (bis 10 mM) lagen jedoch deutlich niedriger als durch ein Michaelis Menten Modell vorhergesagt, wohingegen die Aufnahmegeschwindigkeiten ab 10 mM deutlich höher waren. Eine bessere Annäherung wurde mit dem Modell einer kooperativen Bindung und Aufnahme erzielt. Hierfür wird die Michaelis Menten Gleichung um eine Variable erweitert:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^h}{K_{0,5}^h + [S]^h}$$

Gleichung 4-3

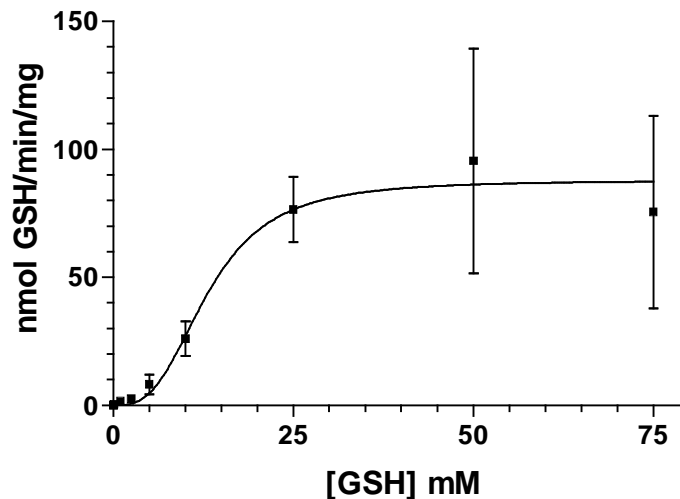


Abbildung 4-15: nicht-lineare Regressionsanalyse (fit) der Glutathionaufnahme-geschwindigkeit isolierter Mitochondrien nach einer allosterischen Michaelis Menten Kinetik (Gleichung 4-3). Die Mittelwerte \pm SEM der Variablen betragen v_{\max} : $87,92 \pm 12,37$ nmol/min/mg, $K_{0,5}$: $13,16 \pm 3,34$ mmol und h : $2,97 \pm 1,69$ ($n = 10-12$).

Der Exponent h steht für das Maß an positiver Kooperativität der Bindung des Substrates durch das Enzym. Ein solcher Effekt kann durch mehrere allosterisch wirkende Untereinheiten hervorgerufen werden. Obwohl der Exponent h nicht unbedingt die Anzahl solcher Untereinheiten wiedergibt, so kann er nicht höher als die tatsächliche Anzahl kooperativ wirkender Untereinheiten ausfallen. Die Gleichung entspricht der sog. Hill-Gleichung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve, wobei h als Hill-Quotient bezeichnet wird. Weitere Versuche der Annäherung eines Modells an die gemessenen GlutathionAufnahmegeschwindigkeiten erbrachten keine verbesserte Annäherung und sind im folgenden tabellarisch aufgeführt.

Zusätzlich wurde der Zeitverlauf der Aufnahme von Glutathion durch isolierte Mitochondrien genauer charakterisiert. Als exogene Glutathionkonzentration wurde 10 mM gewählt, da unter dieser Bedingung ein deutliches Signal beobachtet wurde, jedoch noch kein diffusioneller, unspezifischer Einstrom angenommen werden kann.

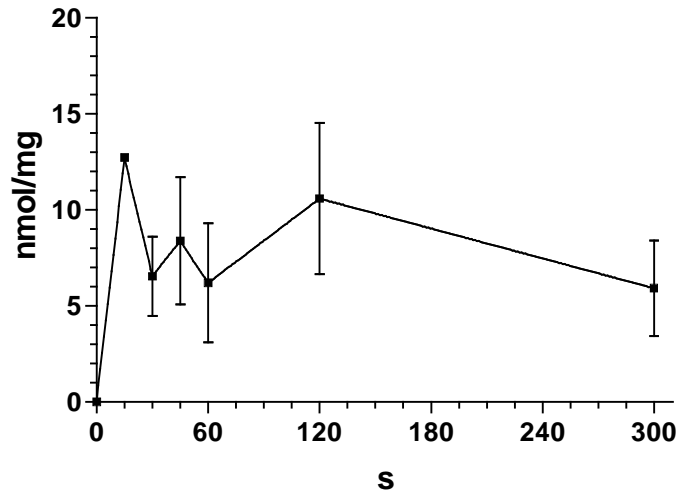


Abbildung 4-16: Glutathiongehalt von Rattenhirnmitochondrien nach Inkubation in 10 mM GSH für verschiedene Zeiträume. Aufgetragen sind die mittleren Glutathiongehalte \pm S.E.M (n= 3).

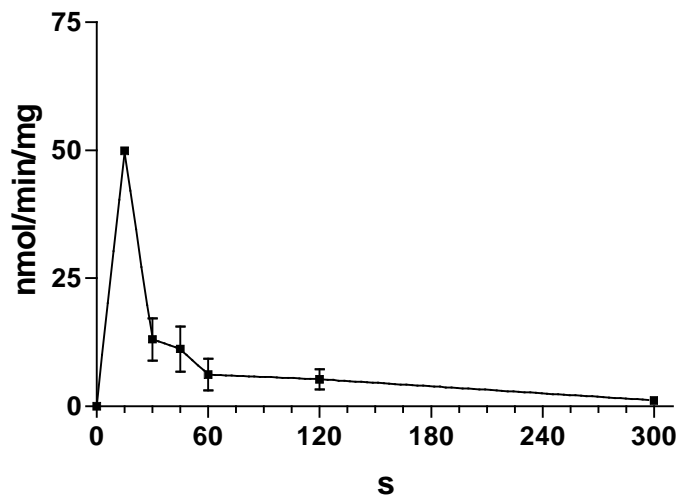


Abbildung 4-17: GlutathionAufnahmegeschwindigkeiten von Rattenhirnmitochondrien nach Inkubation in 10 mM GSH für verschiedene Zeiträume. Aufgetragen sind die mittleren Aufnahmegeschwindigkeiten \pm S.E.M (n= 3).

Der gemessene Zeitverlauf zeigt, daß die Geschwindigkeit des Einstroms 15 s nach Beginn der Inkubation sehr hoch scheint, danach langsam abfällt und nach 1 min nahezu ein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Um die Spezifität der mitochondrialen Glutathionaufnahme nachzuweisen, wurde in einem Vergleichsexperiment die Aufnahme von ^{14}C -markiertem Inulin, einem Fructosepolymer, durch Mitochondrien aus dem Rattenhirn getestet [19]. Die Verwendung dieser Substanz als Kontrolle für unspezifische Bindung beruht auf der Überlegung, daß die Mitochondrien ein Kohlenhydratpolymer nicht aktiv aufnehmen sollten und somit jegliche Bindung nichtspezifisch, d.h. an der Außenseite der Membranen und Membranfragmenten erfolgt.

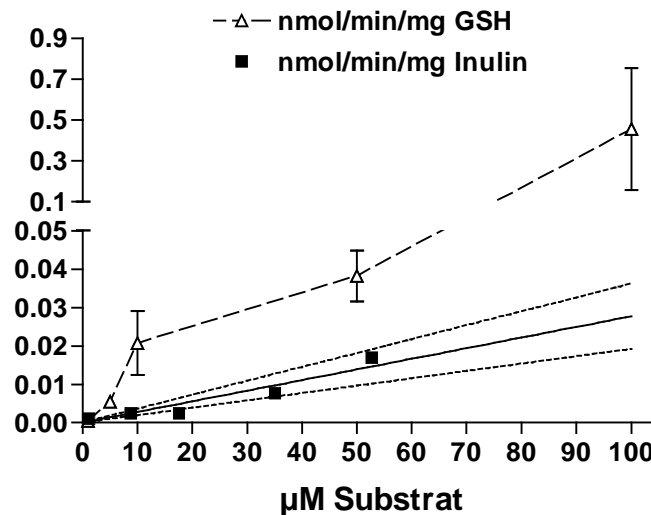


Abbildung 4-18: Vergleich der Aufnahmegeschwindigkeiten von Glutathion und Inulin durch Rattenhirnmitochondrien bei niedrigen externen Substratkonzentrationen (n=10-12). Für die Inulin-Aufnahmegeschwindigkeiten ist die Gerade der linearen Regressionsanalyse eingezeichnet, die gestrichelten Linien begrenzen das 95%-Konfidenzintervall.

Die Menge des so adsorbierten Inulins entspricht dem Volumen der Inkubationslösung, welche mit den auf dem Filter zurückgehaltenen Organellen verbleibt. Bei gleichen externen Konzentrationen lagen die Aufnahmegeschwindigkeiten für Inulin deutlich unter jenen für Glutathion. Die Berechnung des durch unspezifische Bindung zurückgehaltenen Volumens ergab einen mittleren Wert von 197 ± 148 picoliter pro μg mitochondrialem Protein. Wurde dieser Wert zur Abschätzung des unspezifisch gebundenen Glutathions verwendet, so ergaben sich niedrigere, korrigierte Aufnahmegeschwindigkeiten der Experimente mit markiertem Glutathion, die kinetischen Eigenschaften der Datensätze wurden jedoch nicht verschoben.

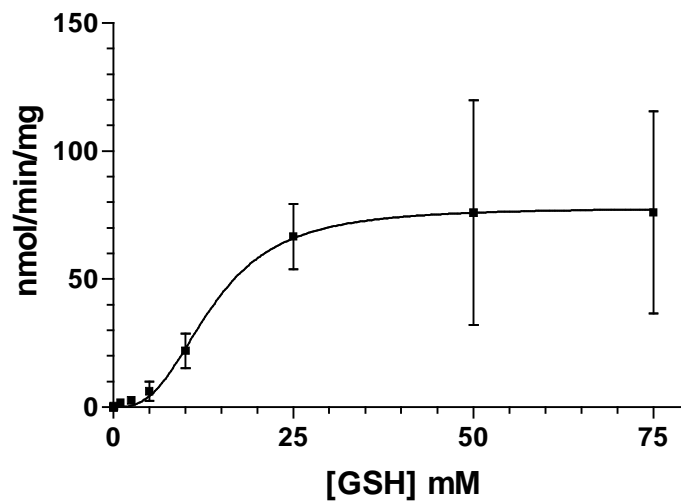


Abbildung 4-19: nicht-lineare Regressionsanalyse (fit) der korrigierten Glutathionaufnahmegeschwindigkeiten isolierter Mitochondrien nach einer allosterischen Michaelis Menten Kinetik (Gleichung 4-3). Die Mittelwerte \pm SEM der Variablen betragen v_{\max} : $77,87 \pm 13,94$ nmol/min/mg, $K_{0,5}$: $13,66 \pm 4,19$ mmol und h : $2,83 \pm 1,77$ (n=10-12).

Andere Modelle einer Enzym/Transportkinetik ergaben nach nichtlinearer Regressionsanalyse keine oder keine sinnvolle Annäherung. .

4.4 Antioxidative Protektion gegen durch L-Glutamat verursachten oxidativen Streß

Wie gezeigt, spielt die Ausstattung der Mitochondrien mit Glutathion eine wichtige Rolle bei der Genese von oxidativem Streß in Nervenzellen. Innerhalb des Hirnparenchyms wird jedoch zunehmend dem Zusammenwirken von Neuronen und Gliazellen bei der Aufrechterhaltung neuronaler Glutathionspiegel und antioxidativer Kapazität Bedeutung beigemessen. Wie bereits in Kap. 2.2 beschrieben, wird Astrocyten unter bestimmten Bedingungen ein Großteil der GSH-Syntheseleistung und somit auch der GSH-Versorgung, nach Export und Spaltung/Transpeptidierung sowie Aufnahme durch Neurone zugeschrieben. Neben der Aufnahme von dipeptidischen Vorstufen und in geringerem Ausmaß Glutathion selbst, ist sicherlich auch die Aufnahme von Cystin als ungiftiger Exportform von L-Cystein, der limitierenden Aminosäure der GSH-Synthese, wichtig für die Kompensation von oxidativen Streß. In Neuronen und Astrocyten beschrieben ist das Xc System [121], welches einen Anionenaustausch von L-Glutamat und L-Cystin bewirkt [122; 123]. Unter Normalbedingungen wird durch dieses System L-Glutamat aus der Zelle und L-Cystin in die Zelle transloziert. Ist jedoch die extrazelluläre Konzentration an L-Glutamat deutlich höher als unter Normalbedingungen, so kann durch kompetitive Inhibition die Cystinaufnahme und somit auch die Glutathionversorgung einer Nervenzelle vermindert sein. Dies gilt insbesondere für Neurone, welche keine glutamatergen Rezeptoren tragen.

Ein Überfluß an extrazellulärem L-Glutamat kann verursacht werden durch Schädigung von glutamatergen Neuronen, welche infolge Energiemangels nicht mehr in der Lage sind, L-Glutamat aus dem synaptischen Spalt und allgemein dem Interstitium aufzunehmen. Neurone, die Glutamat-Rezeptoren tragen, gehen durch andauernde Stimulation dieser Rezeptoren im Verlauf der sog. Exzitotoxizität unter. Aber auch nicht-glutamaterge Neurone werden durch Blockade der Cystinaufnahme beeinträchtigt. In der Literatur wird diese Toxizität auch als sekundäre oder oxidative Glutamatoxizität bezeichnet [124]. Es gilt als gesichert, daß beiden Modellvorstellungen im Rahmen von neurologischen Erkrankungen wie Ischämie oder Epilepsie Bedeutung zukommt [125].

Glutamaterge Mechanismen bei **akuten** neurologischen Erkrankungen

| | |
|------------------------|---|
| sichere Evidenz | Zerebrale Ischämie, Hypoglykämie, Mechanisches Trauma |
| gute Evidenz | Epileptische Anfälle |

 Glutamaterge Mechanismen bei **chronischen** neurologischen Erkrankungen

| | |
|-----------------------|---|
| gute Evidenz | Huntingtonsche Krankheit, AIDS-Demenz-Komplex, neuropathischer Schmerz |
| mäßige Evidenz | zerebelläre Degenerationen, idiopathisches Parkinsonsyndrom, Amyolateralsklerose, Lebersche Optikusatrophie |

Tabelle 4-15: Erkrankungen des ZNS, die zumindest teilweise durch Stimulation von Glutamat-Rezeptoren verursacht sein könnten (modifiziert nach [126])

Als potentiell wirksame Pharmaka kommen Antagonisten von Glutamatrezeptoren gegen primäre Exzitotoxizität und Antioxidantien gegen oxidative Glutamatoxizität in Betracht. In einem experimentellen Modell von oxidativer Glutamatoxizität wurden mögliche Protektionsmechanismen von zwei Triaminopyridinverbindungen, welche beide als Medikamente für andere Indikationen bereits in Gebrauch bzw. in der Testung sind, im Hinblick auf Glutathionspiegel und Cystinaufnahme untersucht.



Abbildung 4-20: Strukturformeln von Flupirtin (links) und Retigabin (rechts)

Beide Substanzen wurden im Rahmen einer Kooperationsvereinbarung vom Arzneimittelwerk Dresden zur Verfügung gestellt, Flupirtin (Handelsname Katadolon, Ethyl-2-amino-6-(4-(4-fluorbenzyl)amino)-3-pyridylcarbamate, maleat) ist als nicht-opioides Analgetikum seit über 10 Jahren im klinischen Gebrauch [127]. Die Substanz hat zudem muskelrelaxierende

Wirkung. Retigabin (Desazaflupritin, N-(2-amino-4-(4-fluorbenzylamino)-phenyl)-carbamat, ethylester) ist ein erst kürzlich synthetisiertes Derivat, in welchem der zentrale Pyridinring durch einen Phenylring ersetzt ist. Diese Substanz hat in *in vitro* Experimenten antikonvulsive Wirkung gezeigt. Vor kurzem wurde als Interaktionspartner auf molekularer Ebene ein Kaliumkanal indentifiziert [128; 129; 130]. Im Hinblick auf neurodegenerative Prozesse wurde Flupirtin interessant, weil die Substanz sich als protektiv in zahlreichen verschiedenen Modellen von apoptotischem wie nekrotischem, exzitotoxischem (NMDA-Rezeptor vermittelten) und nicht durch Rezeptoren ausgelöstem neuronalem Zelltod erwiesen hat [131; 132; 133; 134]. Zudem wurde in einem Fall von einer Erhöhung zellulärer Glutathionspiegel und somit Protektion neuronaler Zellen durch Flupirtin berichtet [135]. In einem *in vitro* Ansatz wurden zudem antioxidative Eigenschaften nachgewiesen [136].

Als experimentelles Paradigma zur Ermittlung eventueller neuroprotektiver Eigenschaften beider Substanzen wurden PC 12 Zellen gewählt. Wie unter 3.3 beschrieben, synthetisiert dieser Zelltyp Dopamin und speichert es auch in Vesikeln. Unter bestimmten Bedingungen können PC 12 Zellen diesen Neurotransmitter sowohl ausschütten als auch aktiv aufnehmen. Dagegen exprimieren diese Zellen in undifferenziertem Zustand keine NMDA-Rezeptoren, obgleich auf Transkriptionsebene die mRNA einiger NMDA-Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen wurde. Mit diesen Einschränkungen kann also die PC 12 Zelle als dopaminerge Zelle ohne Glutamatrezeptoren angesprochen werden.

Zunächst wurde Art und Verlauf der Wirkung von L-Glutamat auf undifferenzierte PC 12 Zellen untersucht.

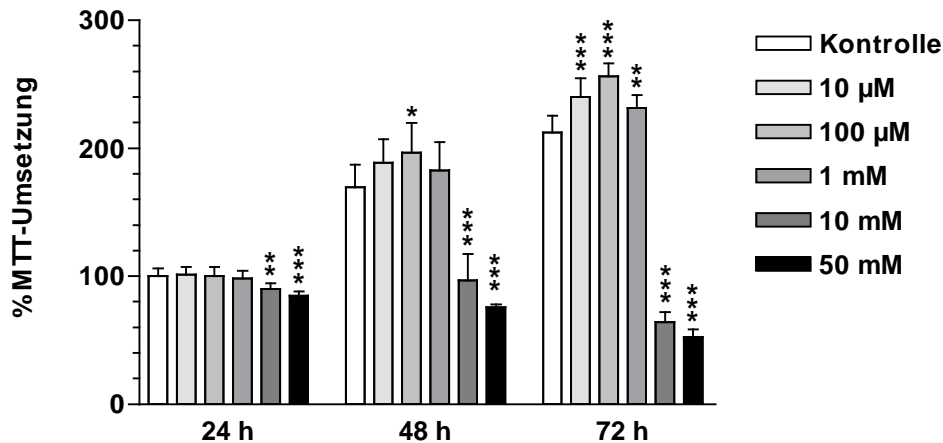


Abbildung 4-21: Evaluierung der Toxizität von L-Glutamat auf PC 12 Zellen. Die Zellkulturen wurden bis zu 72 h mit den aufgeführten Konzentrationen von L-Glutamat inkubiert. Die Quantifizierung der Zellüberlebensrate erfolgte durch photometrische Messung der Umsetzung von MTT, alle gemessenen Werte wurden auf den Wert der unbehandelten Kontrolle (=100 %) bei 24 h normiert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt).

Eine deutliche Toxizität übte L-Glutamat nur ab einer Konzentration von 10 mM aus, wohingegen niedrigere Konzentrationen das Wachstum der Kulturen leicht zu begünstigen schienen. Um die Frage einer Beteiligung von Glutamatrezeptoren zu klären, wurden Vergleichsexperimente mit dem synthetischen Agonisten des NMDA-Rezeptorkanals, N-methyl-D-aspartat (NMDA) und einem Antagonisten, 5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imin, maleat (MK 801) durchgeführt.

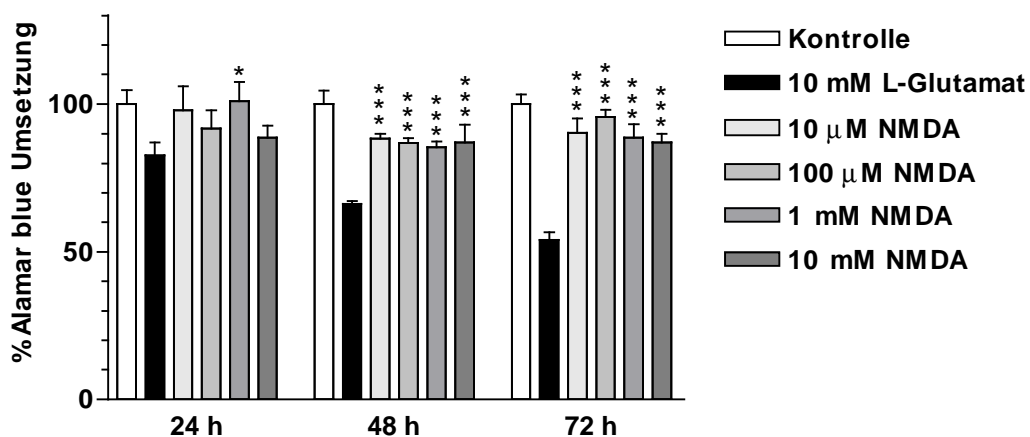


Abbildung 4-22: Messung der Wirkung von N-methyl-D-aspartat (NMDA) auf PC 12 Zellen. Die Quantifizierung der Zellüberlebensrate erfolgte durch fluorometrische Messung der Reduktion des Alamar blue Farbstoffes, alle gemessenen Werte wurden auf den Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (=100 %) normiert (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ gegenüber L-Glutamat).

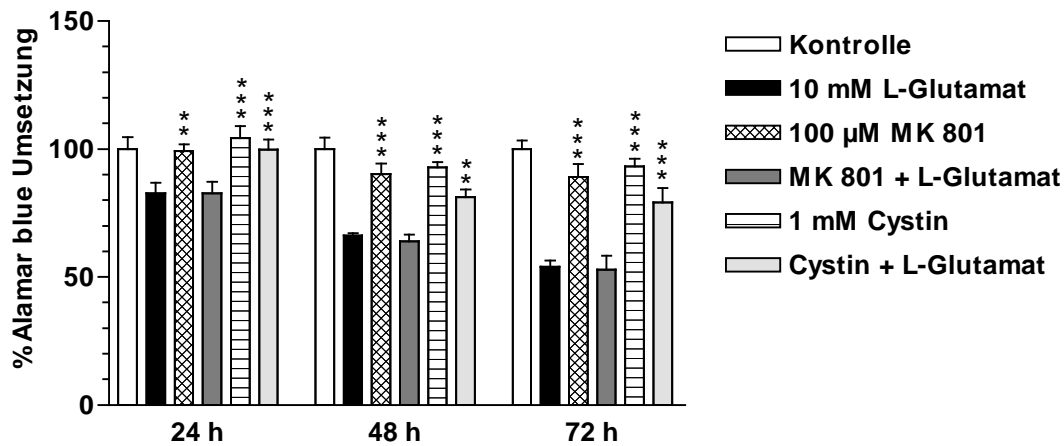


Abbildung 4-23: Messung der Wirkung von MK 801 und Cystin auf die durch L-Glutamat ausgelöste Toxizität in PC 12 Zellen. Die Quantifizierung der Zellüberlebensrate erfolgte durch fluorometrische Messung der Reduktion des Alamar blue Farbstoffes, alle gemessenen Werte wurden auf den Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (=100 %) normiert (: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ gegenüber L-Glutamat).**

Die Tatsache, daß einerseits NMDA keinen Zelltod auslöst und andererseits MK 801 den durch L-Glutamat induzierten Zelltod nicht vermindert, deutet nicht auf einen rezeptorvermittelten Mechanismus hin. Hingegen konnte durch Zugabe von Cystin zum Inkubationsmedium (Endkonzentration 1 mM) eine wesentliche Abschwächung der Glutamattoxizität erzielt werden. Beide Befunde stehen im Einklang mit Literaturdaten [137] und bestätigen somit die Annahme einer durch Inhibition der zellulären Cystinaufnahme hervorgerufenen oxidativen Glutamattoxizität. Mit mehreren Nachweisverfahren der Viabilität von Zellen wurden nun die Wirkungen von Flupirtin und Retigabin auf die von L-Glutamat (10 mM) ausgeübte Toxizität ermittelt.

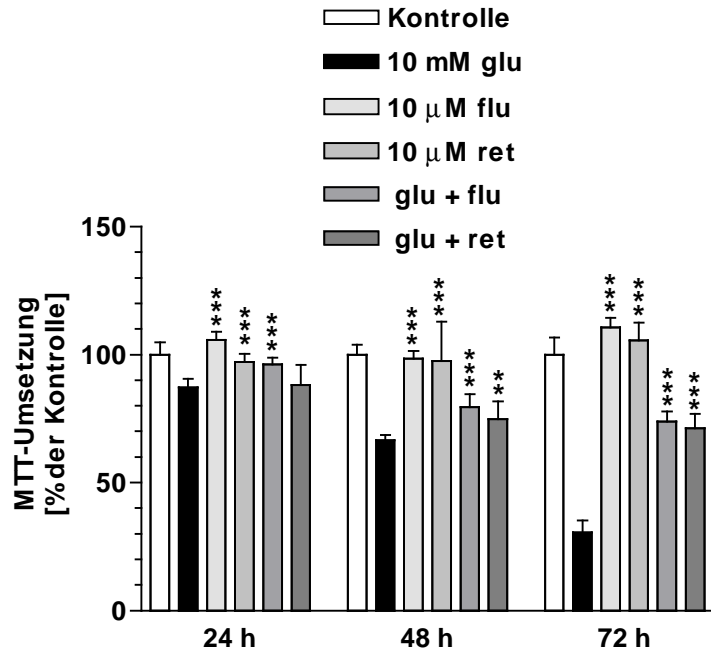


Abbildung 4-24: Messung der Effekte von Flupirtin (flu) und Retigabin (ret) auf die Toxizität von L-Glutamat (glu) in PC 12 Zellen. Die Quantifizierung der Zellüberlebensrate erfolgte durch photometrische Messung der Umsetzung von MTT, alle gemessenen Werte wurden auf den Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (=100 %) normiert (* : $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ gegenüber Kontrolle)

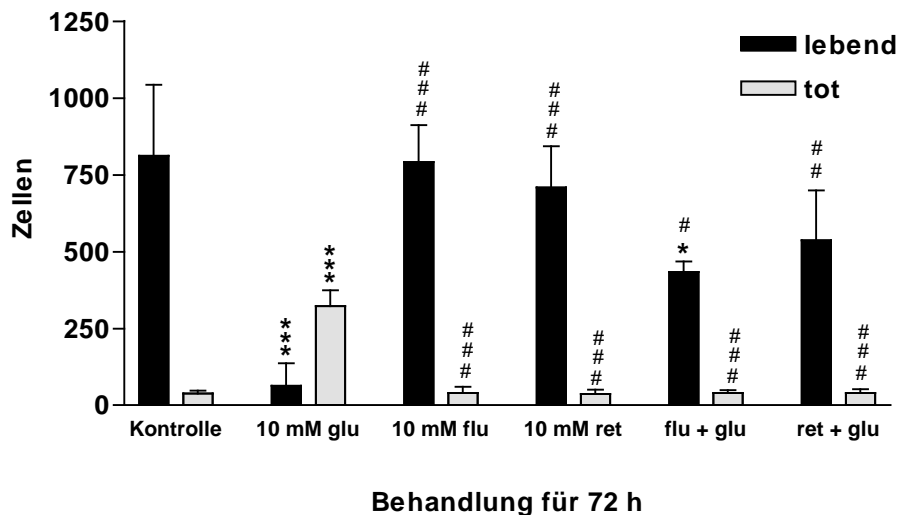


Abbildung 4-25: Bestätigung der protektiven Wirkung von Flupirtin (flu) und Retigabin (ret) bei Glutamat (glu)-Toxizität in PC 12 Zellen nach 72 h. Nach Färbung der Zellen mit Trypan-Blau wurden ungefärbte (lebende) und gefärbte (tote) Zellen ausgezählt (***: $p < 0,001$ gegenüber Kontrolle; #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ gegenüber 10 mM Glutamat).

Anschließend wurde die Art des Zelltods charakterisiert. Dazu wurden mit L-Glutamat behandelte Zellen fixiert und nach Osmifizierung wurde die Morphologie elektronenmikroskopisch untersucht.

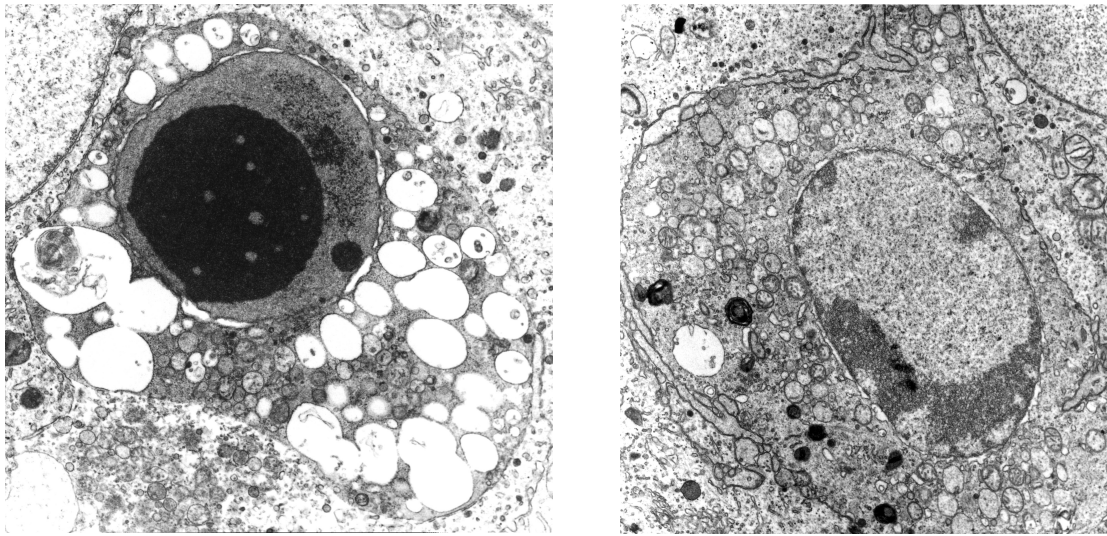


Abbildung 4-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PC 12 Zellen (Vergrößerung *7000), Links: Behandlung mit 250 µM L-DOPA für 48 h, Rechts: Behandlung mit 10 mM L-Glutamat für 72 h.

Die Analyse der Morphologie ergab eindeutige Hinweise für einen nekrotischen Zelltod von PC 12 Zellen nach Behandlung mit L-Glutamat. Hierzu zählen normale Dichte von Zellkernen, geschwollene Organellen, insbesondere Mitochondrien und Verlust der Integrität der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche für 48 h mit L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) behandelt waren, die für apoptotischen Zelltod charakteristische Morphologie: starke Kondensation des Heterochromatins im Zellkern, Schrumpfung der Zelle insgesamt und Vakuolisierung, jedoch intakte Plasmamembran. Diese Beobachtungen wurden untermauert durch ein zweites Verfahren zur morphologischen Analyse, die Anfärbung von Brüchen des DNA-Stranges mittels Verknüpfung von Deoxyuridintriphosphat (dUTP) durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase und anschließender Antikörperdetektion.

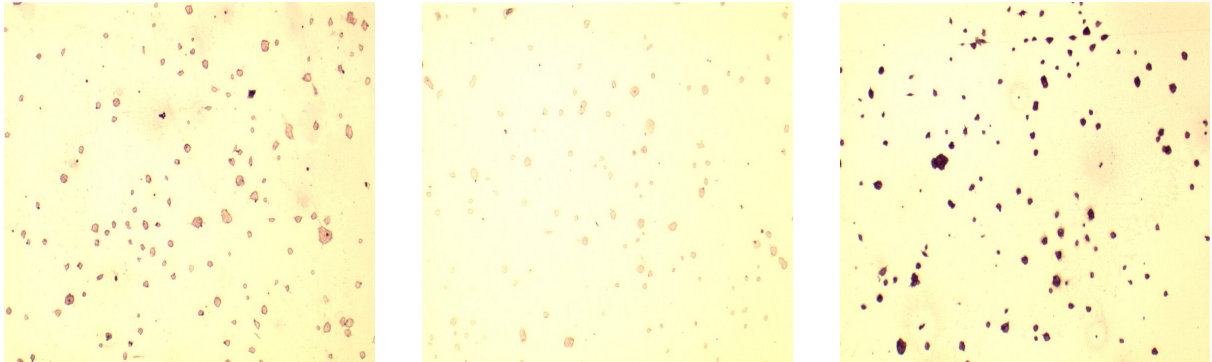


Abbildung 4-27: TUNEL-gefärbte PC Zellen; links: unbehandelte Kontrollen, Mitte: Negativkontrolle (Färbung ohne den Cofaktor CoCl_2 des Enzyms Terminale Deoxynucleotidyl Transferase), rechts: Positivkontrolle (Behandlung mit 1 mg/ml DNase, 10 min).

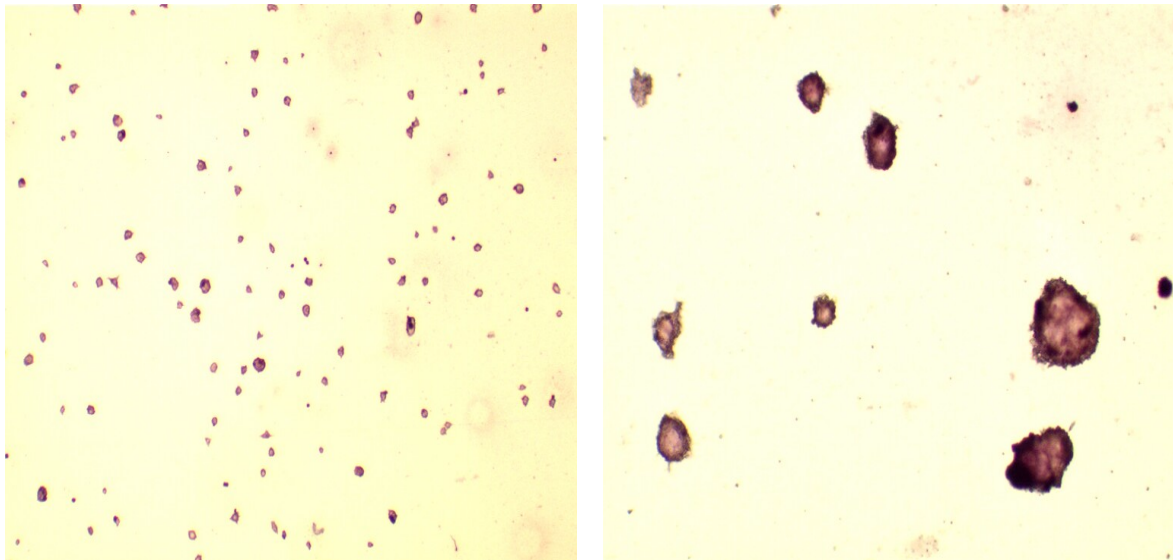


Abbildung 4-28: TUNEL-gefärbte PC 12 Zellen nach 24 h Behandlung mit 10 mM L-Glutamat, rechts: Ausschnittvergrößerung.

In unbehandelten Kulturen wurden nahezu keine TUNEL(Terminale deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling)-positiven Zellen gefunden. Hingegen zeigten für 24 h mit L-Glutamat behandelte Zellen eine schwache, diffus verteilte Anfärbung, was gut mit dem unkontrollierten DNA-Abbau eines beginnendem nekrotischen Zelltodes übereinstimmt.

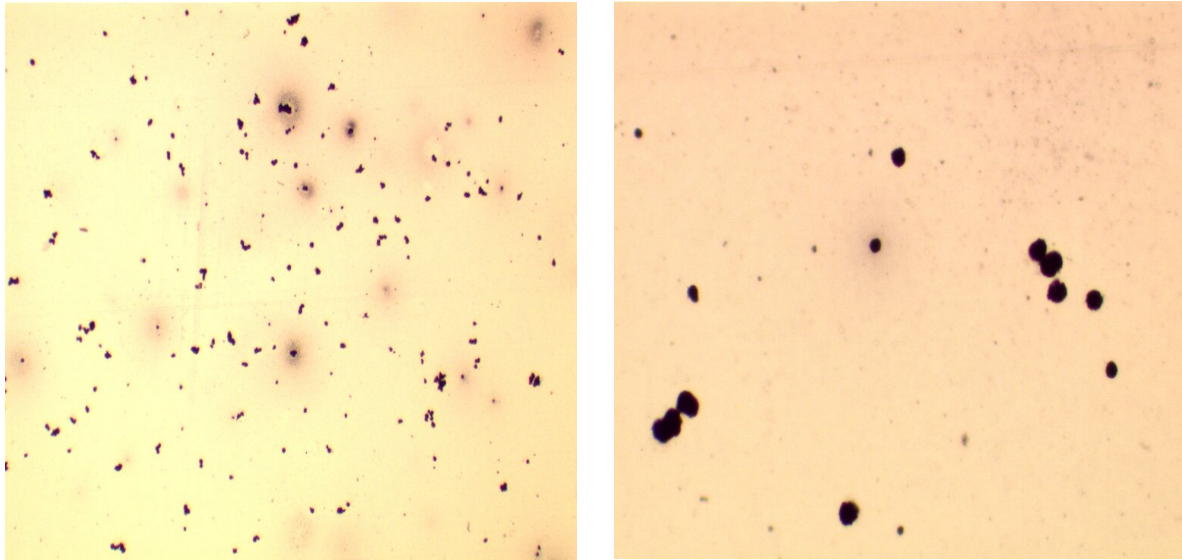


Abbildung 4-29: TUNEL-gefärbte PC 12 Zellen nach 24 h Behandlung mit 250 μ M L-DOPA, rechts: Ausschnittvergrößerung.

L-DOPA behandelte Zellen waren dagegen intensiv gefärbt und geschrumpft bzw. kondensiert, wie man es für die Kondensation und Fragmentierung bei apoptotischem Zelltod erwarten würde. Die morphologischen Untersuchungen erbrachten also klare Belege für einen nekrotischen Zelltod unter Bedingungen der nicht-rezeptorvermittelten Glutamatoxizität.

Ausmaß und Verlauf des durch die verwendete L-DOPA Konzentration erzeugten Zelltods waren massiver bzw. schneller als die untersuchte L-Glutamat-toxizität und konnten durch eine Ko-behandlung mit Flupirtin oder Retigabin nicht beeinflusst werden. Auch Konzentrationen bis 100 μ M Flupirtin oder Retigabin resultierten nicht in einem Schutz der Zellen vor L-DOPA-Toxizität.

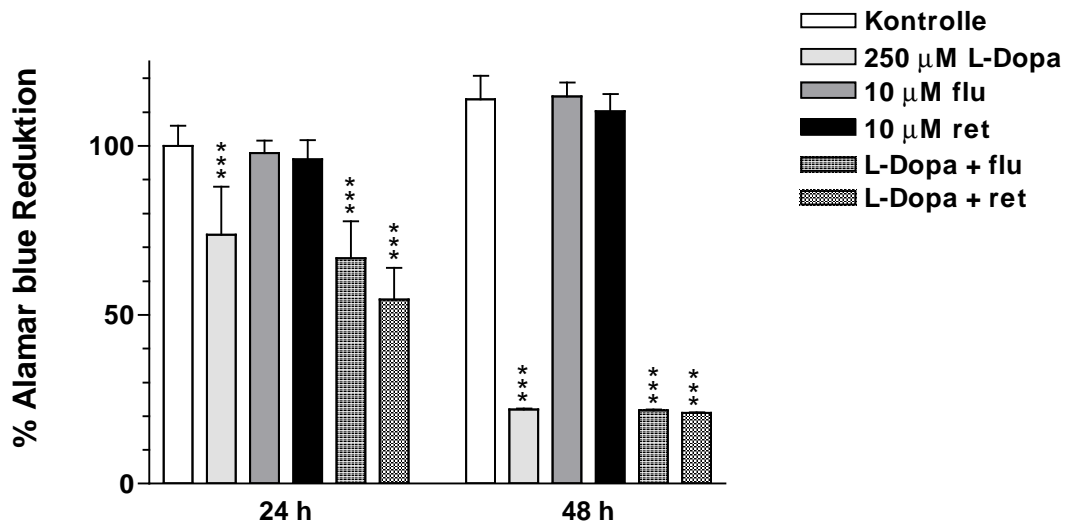


Abbildung 4-30: Toxizität von L-DOPA in PC 12 Zellen. Die Zellen wurden wie aufgeführt (flu = Flupirtin, ret = Retigabin) für 24 h oder 48 h behandelt. Die Überlebensrate wurde anhand der Reduktion des Alamar blue Fluoreszenzfarbstoffes ermittelt und auf den Wert der unbehandelten Kontrolle bei 24 h normiert (=100%). ***: $p < 0,001$ gegenüber Kontrolle.

Im weiteren wurde überprüft, ob der L-Glutamat-induzierte Zelltod von der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies begleitet ist.

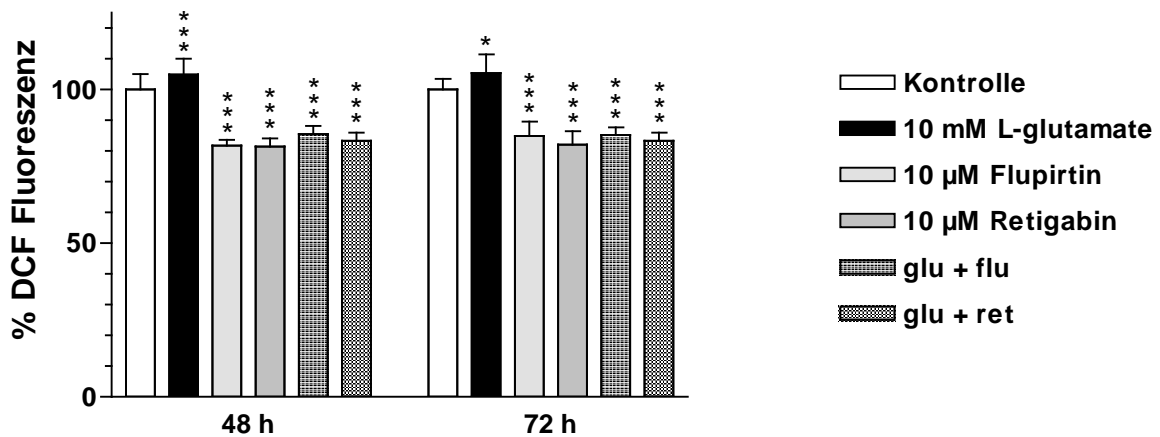


Abbildung 4-31: Messung reaktiver Sauerstoffspezies in L-Glutamat-behandelten PC 12 Zellen anhand der Oxidation eines Dichlorodihydrofluoreszein-Farbstoffes (DCF). Das jeweilige Fluoreszenzsignal wurde auf den Wert der unbehandelten Kontrolle (=100%) normiert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

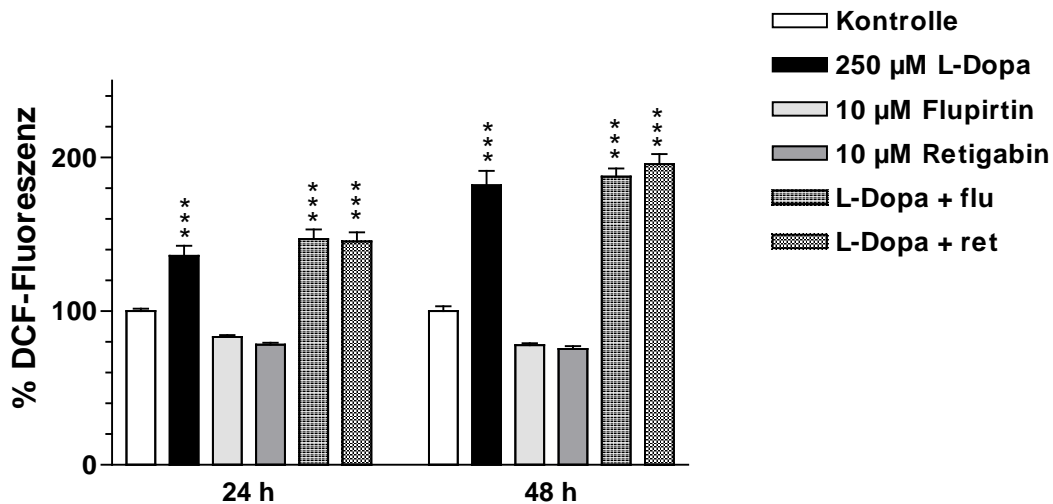


Abbildung 4-32: Messung reaktiver Sauerstoffspezies in L-DOPA-behandelten PC 12 Zellen anhand der Oxidation eines Dichlorodihydrofluoreszein-Farbstoffes (DCF). Das jeweilige Fluoreszenzsignal wurde auf den Wert der unbehandelten Kontrolle (=100%) normiert. *: $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.**

Es fand sich in unter L-Glutamat Behandlung nur ein sehr schwacher Anstieg des Niveaus reaktiver Sauerstoffspezies, während die Behandlung mit L-DOPA eine ausgeprägte Erhöhung der Dichlorofluoreszein-Fluoreszenz verursachte. Flupirtin wie Retigabin verringerten das basale Niveau reaktiver Sauerstoffspezies in unbehandelten Kontrollkulturen und unterdrückten die schwache Erhöhung dieses Parameters unter L-Glutamat-Behandlung. Der durch L-DOPA verursachte Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch beide Verbindungen nicht beeinflusst. Dieser Anstieg ist jedoch wahrscheinlich nicht Folge des Zelltods, sondern entsteht größtenteils durch Autooxidation des Catechols im Medium [138]. Auch hier war die 10fach höhere Konzentration beider Substanzen (100 µM) nicht wirksam im Sinne einer Minderung des Niveaus reaktiver Sauerstoffspezies (Daten nicht gezeigt). Da die protektive Wirkung von Flupirtin in einem Paradigma von Nervenzellendegeneration mit einer Erhöhung zellulärer Glutathionspiegel in Verbindung gebracht wurde [133; 135], erfolgte im folgenden Schritt die Messung der Glutathiongehalte von L-Glutamat-behandelten PC 12 Zellen.

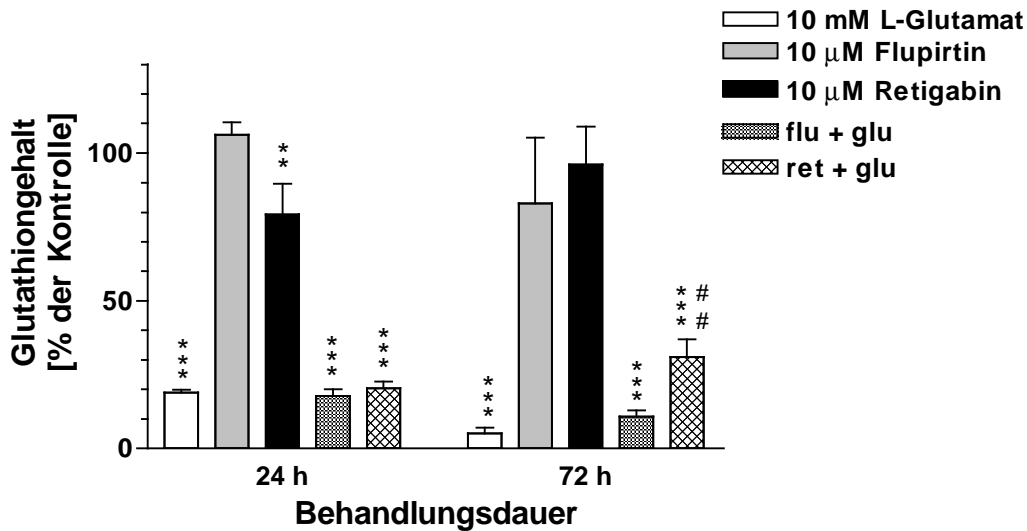


Abbildung 4-33: Effekt von Flupirtin (flu) und Retigabin (ret) auf den Glutathiongehalt von PC 12 Zellen unter L-Glutamat (glu) Behandlung. Die ermittelten Werte sind auf den Gehalt unbehandelter Kontrollen ($6,278 \pm 0,531$ nmol/mg Protein = 100 %) normiert. **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ gegenüber Kontrollen, ##: $p < 0,01$ gegenüber L-Glutamat.**

Es erwies sich, daß beide Triaminopyridine den Verlust zellulären Glutathions nach L-Glutamat-Behandlung kaum abschwächten, lediglich Kobehandlung mit Retigabin führte nach 72 h zu einer signifikanten Erhöhung des Glutathiongehaltes von $30,9 \pm 6,1$ % der Kontrolle gegenüber $5,1 \pm 1,9$ % bei ausschließlicher Inkubation mit L-Glutamat. Verglichen mit dem Verlauf des Zelltods unter L-Glutamat geht der Glutathionverlust dem Zelltod voraus, bereits nach 24 h haben die Zellen nur $18,9 \pm 0,9$ % des normalen Gehaltes. Ebenso wie der durch L-DOPA ausgelöste Zelltod und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies war auch der durch L-DOPA verursachte Glutathionverlust durch Kobehandlung mit Flupirtin oder Retigabin nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

Flupirtin und Retigabin hatten keinen Effekt auf die durch L-Glutamat verursachte Glutathiondepletion. Somit ist es unwahrscheinlich, daß der Protektionsmechanismus durch eine Modulation der Cystinaufnahme (das normale Komplettmedium enthält $200 \mu\text{M}$ Cystin) der Zelle erfolgt, da die Cystinaufnahme der limitierende Faktor der Glutathionbiosynthese ist. Um dies zu klären, wurden PC 12 Zellen 24 h nach der Aussaat in Cystin-freiem Medium weiterkultiviert und mit L-Glutamat bzw. Flupirtin/Retigabin behandelt.

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Kontrolle | 100 ± 7,3 | 166,9 ± 13,0 | 205,4 ± 16,9 | 301,4 ± 24,4 |
| - Cystin | 46,8 ± 3,5 ^a | 44,0 ± 4,4 ^a | 35,7 ± 7,5 ^a | 27,9 ± 1,5 ^a |
| 10 µM Flupirtin (-cys) | 86,3 ± 6,4 ^b | 132,0 ± 21,0 ^b | 115,9 ± 22,9 ^b | 45,8 ± 16,0 |
| 10 µM Retigabin (-cys) | 97,7 ± 5,9 ^b | 132,6 ± 11,0 ^b | 101,1 ± 8,4 ^b | 94,5 ± 15,3 ^b |
| 10 mM L-Glutamat (-cys) | 41,7 ± 2,4 | 31,7 ± 6,6 | 22,4 ± 0,3 | 21,4 ± 0,1 |
| Glu + flu (-cys) | 74,0 ± 4,4 ^b | 54,4 ± 5,6 | 33,1 ± 1,8 | 26,0 ± 1,7 |
| Glu + ret (-cys) | 79,7 ± 2,6 ^b | 61,1 ± 7,3 | 37,5 ± 2,3 | 31,8 ± 14,2 |

Tabelle 4-16: Auswirkung der Kultivierung ohne Cystin auf PC 12 Zellen. 24 h nach Aussaat in 96-well Kulturgefäßen wurde das Medium gewechselt. Mit Ausnahme der Kontrollen (Wechsel zu Komplettmedium) erhielten alle Kulturen Cystin-freies Medium (-cys) inklusive der angeführten Substanzen (glu = 10 mM L-Glutamat, flu = 10 µM Flupirtin, ret = 10 µM Retigabin). Die Zellüberlebensrate wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alamar blue ermittelt, das Signal wurde auf den 24 h-Wert der Kontrolle (= 100 %) normiert. a: p < 0,001 gegenüber der Kontrolle, b: p < 0,001 gegenüber Cystin-Entzug (-Cystin).

Der Entzug von Cystin führte zu einem schnellen Zellsterben, bereits nach 24 h waren über die Hälfte der Zellen abgestorben. Flupirtin und Retigabin vermochten diesen Zellverlust bis 72 h Behandlungsdauer aufzuhalten (Retigabin bis 96 h), jedoch ermöglichten beide Substanzen keine weitere Proliferation der Zellen über das Niveau von 24 h nach Mediumwechsel hinaus (=100 %), während Kontrollkulturen bis 96 h um das Dreifache gewachsen waren. Durch L-Glutamat wurde der durch Cystinmangel hervorgerufene Zelltod nicht verstärkt, jedoch wurde durch L-Glutamat der schützende Effekt von Flupirtin und Retigabin bei Cystinentzug für 24 h deutlich vermindert und bei längeren Behandlungszeiten völlig unterdrückt. Die Schlußfolgerungen aus diesem Experiment waren:

- Die schützende Wirkung von Flupirtin und Retigabin gegen L-Glutamat beruht nicht ausschließlich auf einer Modulation der zellulären Cystinaufnahme.
- Die toxische Wirkung von L-Glutamat besteht neben der Hemmung der Cystinaufnahme aus mindestens einer weiteren Komponente. Gegen diese sind Flupirtin und Retigabin nicht protektiv, wenn diese zweite Wirkung zeitgleich mit der Hemmung der Cystinaufnahme auftritt.

Weiterhin wurde das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies unter Cystin-freier Kultivierung von PC 12 Zellen untersucht.

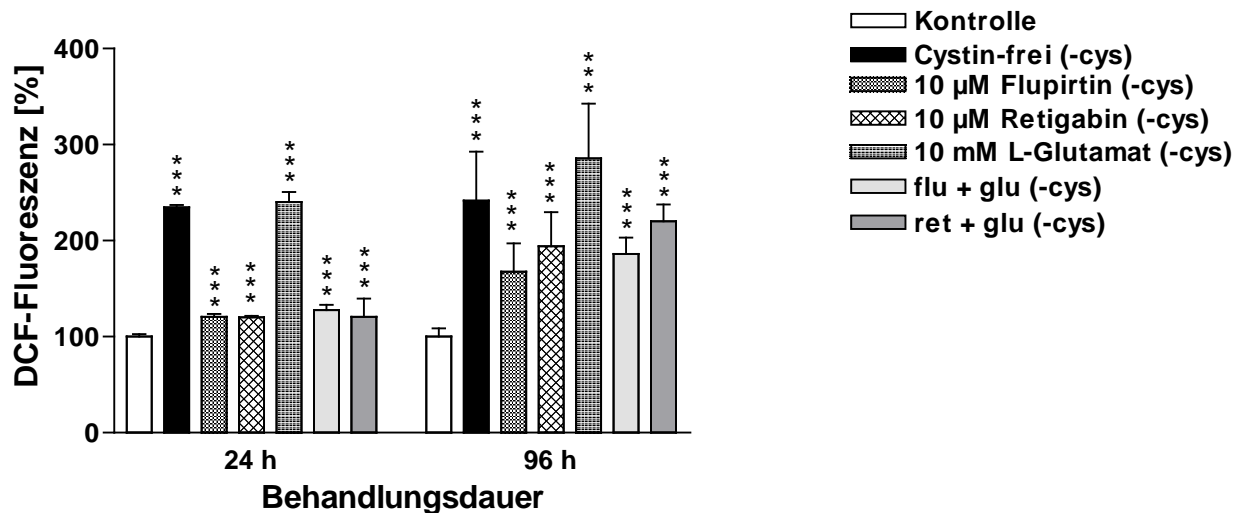


Abbildung 4-34: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Cystin-Entzug in PC 12 Zellen. 24 h nach Aussaat wurde das Medium durch Cystin-freies Medium (-cys) ersetzt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden auf den Wert der Kontrollen (Wechsel zu Vollmedium, = 100 %) zum entsprechenden Zeitpunkt normiert. ***: $p < 0,001$ gegenüber Kontrollen.

Die Zugabe von L-Glutamat unter Cystin-freier Kultivierung verursachte keinen signifikanten zusätzlichen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies. Hingegen war die Verminderung reaktiver Sauerstoffspezies in Cystin-freiem Medium durch Flupirtin und Retigabin auch bei Zugabe von L-Glutamat wirksam.

In einer Arbeit zur oxidativen Glutamatoxizität wird erhöhte Aktivität des Enzyms Monoamin-Oxidase (MAO) als weitere Komponente dieses Modells von Neurodegeneration vermutet [139]. Deshalb wurde die Bedeutung dieses Enzyms für die mit Flupirtin und Retigabin erhaltenen Daten untersucht. Zunächst wurde die Wirkung verschiedener MAO-Inhibitoren auf die L-Glutamatoxizität in PC 12 Zellen geprüft.

| | 24 h | 48 h | 72 h |
|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Kontrolle | 100 ± 6.7 | 126.3 ± 6.3 | 157.1 ± 6.5 |
| 10 mM L-Glutamat | 81.5 ± 12.9 | 79.8 ± 3.9 *** | 62.3 ± 6.4 *** |
| 10 µM Clorgylin | 101.8 ± 13.7 | 129.1 ± 12.7 | 160.2 ± 5.2 |
| 100 µM Clorgylin | 128.2 ± 10.9 *** | 140.2 ± 7.6 | 157.7 ± 1.4 |
| 10 µM Pargylin | 98.6 ± 8 | 133.8 ± 3.5 | 162.9 ± 13.3 |
| 100 µM Pargylin | 100.9 ± 4.9 | 127.7 ± 6.3 | 165.6 ± 15.1 |
| Glu + 10 µM Clorg | 84.5 ± 2.6 | 98.5 ± 7.7 *** | 87.9 ± 13.2 *** |
| Glu + 100 µM Clorg | 111.1 ± 16.7 | 123.3 ± 6.6 | 122.2 ± 8.6 *** |
| Glu + 10 µM Parg | 86.9 ± 7.3 | 86.2 ± 11.6 *** | 67.4 ± 6.6 *** |
| Glu + 100 µM Parg | 86.7 ± 4.1 | 77.4 ± 37.5 *** | 60 ± 2.7 *** |

Tabelle 4-17: Effekte der Monoamin Oxidase Inhibitoren Clorgylin (Clorg) und Pargylin (Parg) auf L-Glutamat (Glu) Toxizität in PC 12 Zellen. Überlebende Zellen wurden durch Färbung mit dem Alamar blue Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert und auf das Signal der Kontrolle bei 24 h (= 100%) normiert. *: p < 0,001 gegenüber Kontrollen.**

Das Enzym Monoamin Oxidase kommt in zwei Isoformen vor, abgekürzt MAO A und MAO B. Gemäß Literaturdaten inhibiert Clorgylin in micromolaren Konzentrationen selektiv und irreversibel die MAO A-Isoform [140; 141]. Ebenso ist beschrieben, daß die A-Isoform die vorherrschende MAO-Isoform in PC 12 Zellen ist [142; 143]. Pargylin in millimolaren Konzentrationen inhibiert beide Isoformen gleichermaßen [141], es ist jedoch bereits beobachtet worden, daß Pargylin in PC 12 Zellen Monoamin Oxidase Aktivität nicht im gleichen Maß inhibiert wie micromolare Konzentrationen von Clorgylin [144]. Dies entspricht den Ergebnissen dieses Versuches: Koinkubation mit Pargylin resultierte nicht in einem Schutz der Zellen gegenüber L-Glutamat-Toxizität, während 100 µM Clorgylin den Vitalitätsverlust durch L-Glutamat weitgehend aufhielten. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen [139] kann demnach die Rolle einer (überschiessenden ?) MAO-Aktivität bei oxidativer L-Glutamat-Toxizität bestätigt werden.

Weiterhin wurde der Effekt einer Inhibition der Monomamin Oxidase bei Cystin-Entzug von PC 12 Zellen evaluiert.

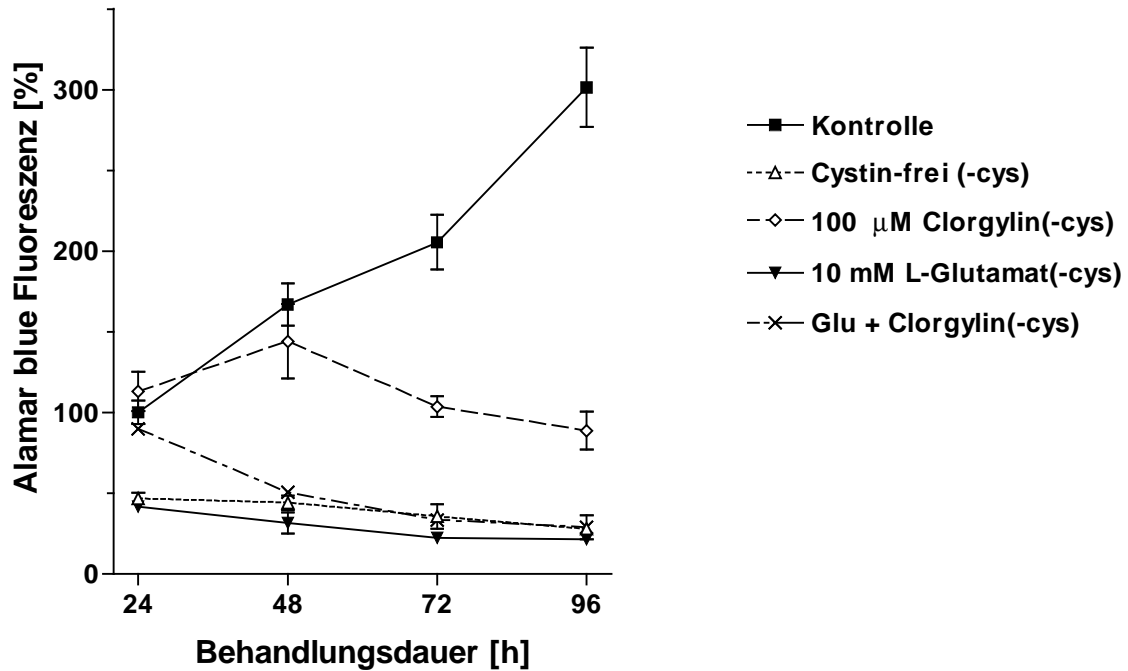


Abbildung 4-35: Effekt von Clorgylin auf das Überleben von PC 12 Zellen in Cystin-freiem Medium. Überlebende Zellen wurden mittels des Alamar blue Fluoreszenzfarbstoffes quantifiziert und auf das Signal der Kontrolle (Wechsel zu Vollmedium, = 100%) bei 24 h normiert.

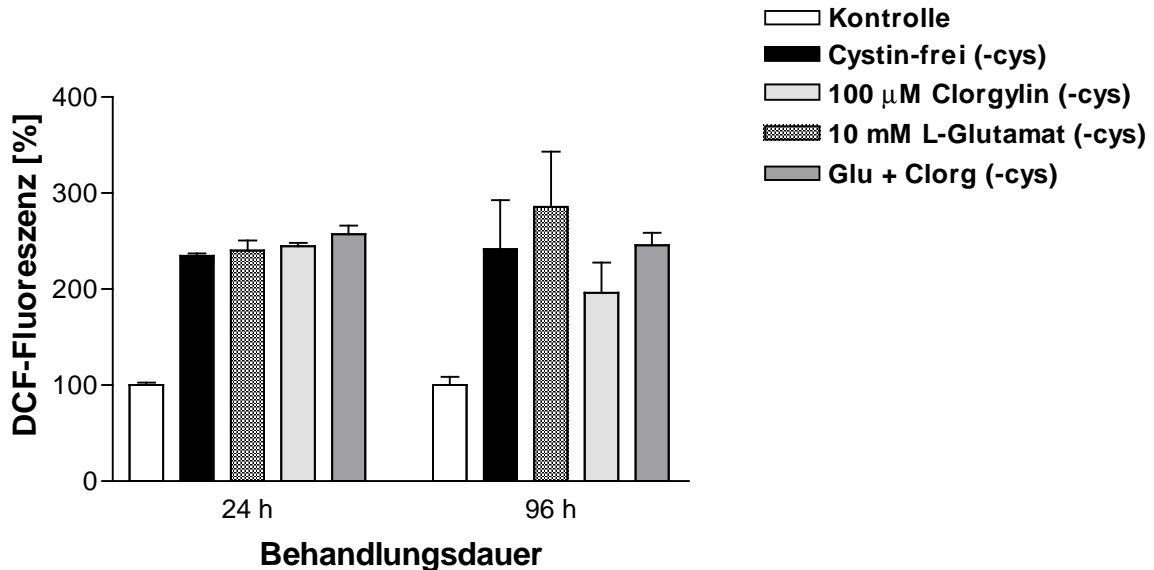


Abbildung 4-36: Wirkung von Clorgylin auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies unter Cystin-freier Kultivierung. Die gemessene DCF-Fluoreszenz wurde auf das Signal der Kontrolle (Wechsel zu Vollmedium, = 100 %) zum entsprechenden Zeitpunkt normiert. Alle dargestellten Werte sind signifikant ($p < 0,001$) gegenüber den Kontrollen.

Die Wirkung von Clorgylin bei Cystin-Entzug in PC 12 Zellen waren denen von Flupirtin und Retigabin sehr ähnlich: 100 µM Clorgylin verhinderten Zelltod in Cystin-freiem Medium bis zu 96 h, ermöglichten jedoch kein weiteres Wachstum über den 24 h Wert hinaus. Wiederum

wurde dieser protektive Effekt durch den zusätzlichen toxischen Stimulus von L-Glutamat in Cystin-freiem Medium unterdrückt. Ebenso war Clorglylin nicht signifikant protektiv gegen die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies während Cystin-freier Kultivierung.

Da die protektive Wirkung von Clorglylin einerseits und Flupirtin bzw. Retigabin andererseits hinsichtlich Ausmaß und Zeitverlauf des Zellüberlebens sehr ähnlich war, stellte sich die Frage, ob eine Inhibition der Monoamin Oxidase Aktivität auch durch beide Triaminopyridine hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wurden zunächst mehrere Methoden zur MAO-Aktivitätsbestimmung getestet. Zunächst wurde die Methode nach Szutowicz et al. [81] verwendet. Diese benutzt zur Detektion des bei der oxidativen Desaminierung entstehenden Wasserstoffperoxids eine zweite enzymatische Reaktion. Durch eine zugegebene Peroxidase (Meerrettich) wird unter Verbrauch von H_2O_2 das Farbsubstrat 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) oxidiert. Die Konzentration des intensiv grünen Oxidationsproduktes, ein Radikalkation, wird bei 414 nm im Photometer bestimmt. Monoaminoxidase ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und wird deshalb auch als Markerenzymaktivität für dieses Kompartiment der Organelle verwendet. Um also ein möglichst starkes Signal zu erhalten, wurden für die Messungen mitochondriale Fraktionen aus PC 12 Zellen eingesetzt. Das Isolationsprotokoll entspricht dem, welches für die Bestimmung mitochondrialer Enzymaktivitäten von PC 12 Zellen adaptiert und verwendet wurde (siehe 3.4.1). Kontrollexperimente zeigten, daß beide Moleküle das Niveau der basalen Oxidation des ABTS Substrates vermindern.

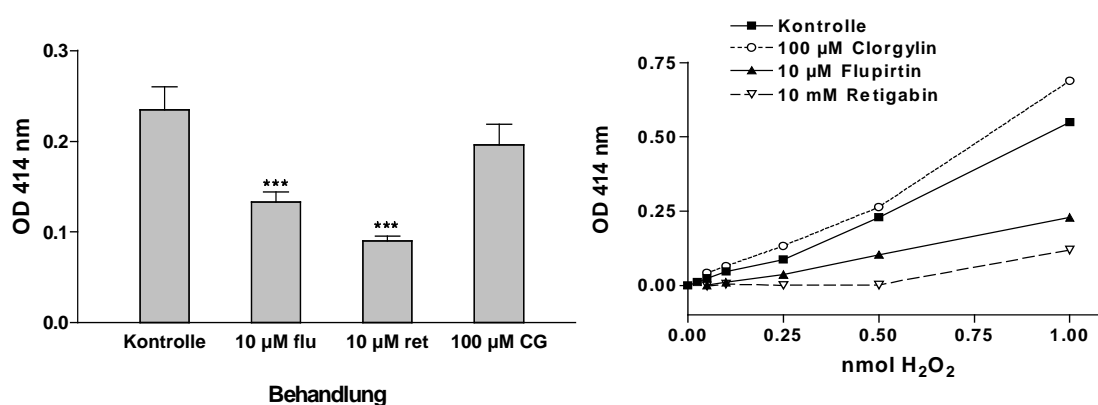


Abbildung 4-37: Evaluation der Wirkung von Flupirtin und Retigabin auf die ABTS/Peroxidase Reaktion mit H_2O_2 . Links: Der Effekt beider Substanzen auf die basale Rate der ABTS Oxidation (ohne Zugabe von H_2O_2 oder mitochondrialen Extrakten) nach 15 minütiger Inkubation. Rechts: Effekt von Flupirtin und Retigabin auf Oxidation von ABTS durch zugegebenes H_2O_2 nach 15 minütiger Inkubation.

So fand sich eine niedrigere Extinktion bei 414 nm in Proben, die 10 μM Flupirtin bzw. Retigabin enthielten, als in Kontrollansätzen ohne mitochondriales Protein als auch in Negativkontrollen, welche 100 μM Clorgylin enthielten. Ebenso unterdrückte die Anwesenheit von 10 μM Flupirtin oder Retigabin einen Großteil des Signals bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 . Dies würde bedeuten, daß Flupirtin wie Retigabin das durch Oxidation von ABTS entstandene Radikalkation wieder reduzieren, diese Erklärung wird unterstützt durch publizierte Untersuchungen von Re et al. [145]. Sie weisen nach, daß die Reduktion des ABTS-Radikalkations als Maß für die antioxidative Kapazität eines Moleküls interpretiert werden kann. Eine andere Möglichkeit zur Detektion des bei der oxidativen Deaminierung entstehenden Wasserstoffperoxids bietet die durch Sorbitol katalysierte Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} [80]. Das dreiwertige Eisenkation bildet mit dem Farbstoff Xylenolorange einen Komplex aus, dessen intensive, dunkelviolette Farbe bei 560 nm optisch vermessen werden kann.

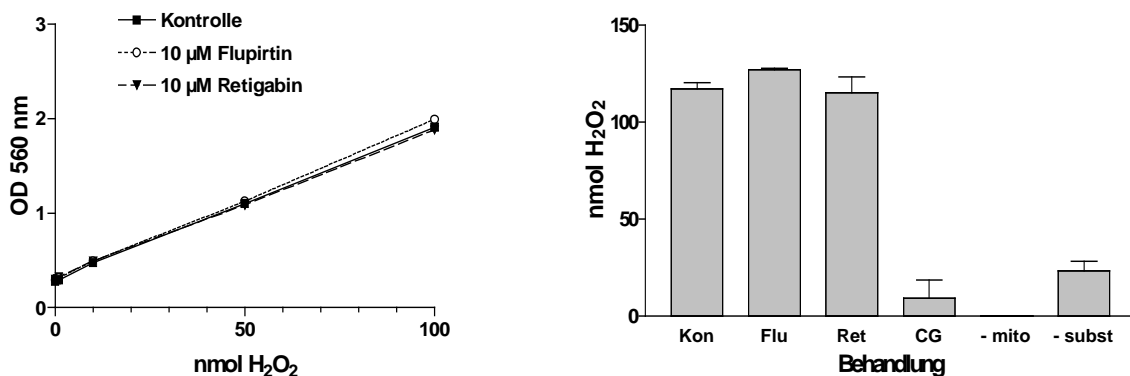


Abbildung 4-38: Bestimmung der MAO-Aktivität in mitochondrialen Extrakten nach Inkubation mit Flupirtin oder Retigabin. Links: Flupirtin oder Retigabin verändern nicht das Signal des Fe^{2+} /Xylenolorange Detektionssystems nach Zugabe von H_2O_2 . Rechts: Kein Effekt von Flupirtin und Retigabin auf die H_2O_2 -Generierung durch mitochondriale Extraktes. CG: 100 μM Clorgylin, -mito: keine Zugabe mitochondrialen Extraktes, -subst: keine Zugabe des MAO-Substrates (Tyramin).

Kontrollexperimente erwiesen, daß durch die Zugabe von Flupirtin oder Retigabin die Farbreaktion mit zugegebenem H_2O_2 nicht verändert wird. Dieser Befund deutet außerdem darauf hin, daß beide Verbindungen nicht mit H_2O_2 direkt reagieren. Die Messungen der MAO-Aktivitäten mitochondrialer Fraktionen mittels dieser zweiten Methode zeigten weiterhin, daß weder Flupirtin noch Retigabin in einer Konzentration bis 10 μM diese Enzymaktivität hemmen.

5 Diskussion

5.1 Vergleich der Toxizität von *L*-Buthioninsulfoximin und Etacrynsäure

Die zugrundeliegende Hypothese dieser Experimente war, daß innerhalb der Zelle dem in Mitochondrien kompartimentiertem Glutathion herausgehobene Bedeutung für die Verteidigung einer (Nerven)zelle gegen oxidativen Streß zukommt.

Der Abfall des zellulären Gesamt-Glutathions vollzog sich bei Behandlung der Zellen mit BSO oder EA während der ersten 4 h in vergleichbarem Ausmaß. Jedoch hatte EA bereits nach 90 min Inkubationsdauer eine deutliche Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge, wohingegen in BSO-behandelten Kulturen in diesem Zeitraum kein erhöhtes Niveau an oxidativem Streß und bis zu 3 d kein Zelltod nachweisbar war. Die Betrachtung der Glutathionspiegel in den fraktionierten Zelllysaten ergab, daß während der ersten 4 h der BSO-Behandlung der mitochondriale Glutathiongehalt nicht abfällt, sondern leicht ansteigt und erst zwischen 6 und 12 h Inkubationsdauer deutlich abfällt und auch nach 48 h nicht gänzlich unter die Erfassungsgrenze sinkt. Im Gegensatz dazu war in EA-behandelten Kulturen Glutathion in den mitochondrialen Zellfraktionen bereits nach 4 h komplett erschöpft. Auch das im Cytosol enthaltene Glutathion wurde bei der Behandlung mit BSO vermindert, allerdings langsamer als durch die EA-Behandlung. Im Cytosol BSO-behandelter Zellen fand sich nach 6 h nur 1/20 des Normalwertes an Glutathion, trotzdem wurden keine erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies unter diesen Bedingungen gemessen. Die Kinetik der Glutathionverminderung im Cytosol und in den Mitochondrien unter BSO-Behandlung legt vielmehr den Schluß nahe, daß Mitochondrien bei beginnender Glutathionverknappung, d.h. fehlender Glutathionsynthese durch Transport aus dem Cytosol den eigenen Glutathionspiegel für eine begrenzte Zeit aufrechterhalten können und letztendlich eine Restmenge bewahren, welche bei Abwesenheit weiterer Streßfaktoren ausreicht, um eine mitochondriale Überproduktion freier Sauerstoffradikale zu verhindern. Unterstützt wird diese Interpretation durch publizierte Untersuchungen zur Wirkung von BSO und den unterschiedlichen Halbwertszeiten des cytosolischen und mitochondrialen Glutathionpools [17; 18]. Dagegen ist die sehr rasche Depletion des mitochondrialen Glutathions durch Etacrynsäure ebenfalls in einer Studie an Astrozyten als Ursache einer rapiden und massiven Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben [146]. Das Vermögen, oxidativen Streß und Glutathiondepletion hervorzurufen, weisen viele cytotoxische Verbindungen mit

alkylierenden bzw. elektrophilen Eigenschaften auf [147; 148; 149]. Eine Besonderheit von Etacrynsäure ist jedoch, daß diese auch über die mitochondrialen Membranen wirkt und so mitochondriales Glutathion in vergleichbarem Ausmaß und Geschwindigkeit vermindert wie im Cytosol enthaltenes [146] und so die Glutathionaufnahme aus dem Cytosol unwirksam macht. Andere alkylierende Moleküle wie z.B. Dimethylmaleat vermindern im Gegensatz dazu die zellulären Glutathionkompartimente in einer BSO-ähnlichen Kinetik [17]. Eine Schwierigkeit für die Interpretation der biologischen Effekte von Etacrynsäure liegt auch in den chemischen Eigenschaften des Moleküls: durch unselektive Alkylierung von Thiolen vermag das Molekül viele Enzyme direkt zu inhibieren, deren Konformation und damit Funktion von Thiolgruppen abhängig ist. So ist eine Inhibition von Glutathionreduktase [146; 150] und Glutathion-S-Transferasen [151] sowie Enzymen des mitochondrialen Energiestoffwechsels beschrieben [152]. Eine systemische Gabe von Etacrynsäure in Tieren führt denn auch zu verschiedenen akuten Symptomen des Zentralnervensystems wie Konvulsionen und epileptischen Anfällen [153; 154], die gewiß nicht ausschließlich in der Glutathion-depletierenden Wirkung begründet sind. Die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette sind empfindlich gegenüber Veränderung des Redoxmilieus, insbesondere diejenigen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, die Eisen-Schwefel-Cluster-Strukturen enthalten, sind anfällig gegen Oxidation. Der Versuch mit isolierten Rattenhirnmitochondrien zeigt, daß EA-Behandlung schnell zum Funktionsverlust des Komplex II/III führt, ein Befund der durch Literaturdaten bestätigt wird [155]. Weiterhin verursacht Etacrynsäure pathologische Veränderungen der mitochondrialen Morphologie [156], vermutlich auch dies Folge von Oxidation von Thiolgruppen [110]. Es läßt sich also nicht definitiv folgern, ob der Niedergang mitochondrialer Funktionen auch ein direkter Effekt von Etacrynsäure ist oder ausschließlich Konsequenz von oxidativem Streß infolge der Verminderung des mitochondrialen Glutathions. Da Glutathion über 90 % der in der Zelle vorhandenen freien Thiolgruppen stellt und dadurch Thiolgruppen von Proteinen oder Membranen schützt, ist es plausibel, daß zunächst der größte Teil der Etacrynsäure durch freies Glutathion abgefangen wird. Darüberhinaus zeigen Daten in Abschnitt 4.2, daß Etacrynsäure im *in vitro* Versuch die Aktivität des Komplex I in stärkerem Maße hemmt, als die des Komplex II/III. Durch eine Inhibition des Komplex I per se wurde aber keine Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies hervorgerufen, wie die Experimente mit den Komplex I-Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon belegen (siehe Abschnitt 4.2.). Reaktive Sauerstoffspezies entstehen also in dieser Situation primär durch den Wegfall von Verteidigungsmechanismen (Glutathionspiegel und schützende Enzyme, bzw. deren Energiesubstrate) bei noch

funktionierendem Elektronentransport in der mitochondrialen Membran und erst sekundär bei Zerstörung der mitochondrialen Atmungskette. Daran anschließend dürften die vielen inhibitorischen Effekte der Etacrynsäure synergistisch wirken: eine Inhibition der Glutathiontransferase verhindert die Reduktion von GSH-Alkoxykonjugaten, eine Inhibition der Glutathionreduktase blockiert die Reduktion von GSSG, die Zerstörung der mitochondrialen Membranstruktur und Schädigung der Atmungskettenkomplexe schließlich unterbricht die Synthese von ATP und NADPH. Die Inhibition des Komplex III wiederum führt zu erhöhten Verweilzeiten von reduzierten Coenzym Q1-Molekülen mit der Folge eines gehäuften Auftretens der Ein-Elektronen Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxid-Anionradikal [157]. Die besondere Empfindlichkeit der Komplex II/III Aktivität verglichen mit der Komplex IV Aktivität, welche sowohl in den Fraktionen EA-behandelter Zellen als auch isolierter Rattenhirnmitochondrien ermittelt wurde, läßt sich mit den Eisen-Schwefel-Cluster Strukturen des Komplex III-Holoproteins gut erklären.

Die Behandlung mit niedrigen, nicht lethalen Konzentrationen an Etacrynsäure führte bei PC 12 Zellen und bei primären Körnerneuronen der Ratte zu (siehe hierzu [70]) einer deutlichen Erhöhung der Glutathionspiegel. Entsprechend der höheren Resistenz von immortalisierten PC 12 Zellen verglichen mit primären Neuronen betrug diese Konzentrationsschwelle bei ersteren 100 μM , bei letzteren 10 μM . Eine solche Streß-Antwort, die in der (allosterischen) Hochregulation der Aktivitäten von antioxidativen Schutzenzymen und in Veränderung der Genexpression bestehen kann, ist in vielen Zelltypen unter einer Vielzahl von Stimuli beobachtet worden [158]. Im Falle des Hirngewebes erfolgt eine antioxidative Schutzantwort vor allem auch durch Gliazellen. Als Auslöser von erhöhtem intrazellulärem oxidativen Streß kommen z. B. ionisierende Strahlung, Schwermetalle, Cytokine der Entzündungsreaktion oder Hitzeschock in Frage. Diese Situation wird von redox-sensitiven Domänen von Transkriptionsfaktoren erkannt, häufig vermittelt durch Disulfidbrücken. Deren veränderte DNA-Bindefähigkeit und somit Spezifität bewirkt dann die erhöhte Transkription und Expression antioxidativ wirksamer Gene. In den untranslatierten 5'-Promotorregionen vieler Gene der Glutathionsynthese und des Glutathionmetabolismus finden sich Bindestellen für diese Transkriptionsfaktoren [158]. Solche Mechanismen bieten möglicherweise auch Ansatzpunkte für eine Therapie bereits im Gange befindlicher neurodegenerativer Prozesse, da beispielsweise durch gentherapeutische Strategien die intrinsische antioxidative Kapazität von gefährdeten Zellen erhöht werden könnte, ohne den physiologischen Normalzustand zu verändern. Im Falle des Gehirns besteht zudem immer das Problem der geringen Verfügbarkeit systemisch eingenommener Pharmaka, so daß eingedenk der Risiken einer

kontinuierlichen Gabe von Stimulantien der antioxidativen Schutzantwort bislang nur direkt wirkende Antioxidantien wie Vitamin C und E am Menschen getestet wurden. Eindeutige Belege einer Schutzwirkung dieser Substanzen z.B. gegen die Parkinsonsche Erkrankung konnten jedoch bislang nicht erbracht werden [159].

BSO hat in einer Konzentration, welche das Gesamtglutathion der Zellen innerhalb von 24 h um mehr als 80 % reduziert, über 48 und 72 h keinen ausgeprägten Effekt auf das Überleben der Zellen und das Niveau reaktiver Sauerstoffspezies hat. Zumindest für den betrachteten Zeitraum sind also undifferenzierte PC 12 Zellen metabolisch in der Lage, ohne einen Großteil des normalerweise vorhandenen Glutathions auszukommen. In vielen immortalisierten Tumorzelllinien vermag die Behandlung mit submillimolaren Konzentrationen von BSO die Glutathionspiegel deutlich zu senken und auch die Proliferation zu stoppen [160; 161; 162]. Ein Grund hierfür könnte sein, daß Glutathion neben seinen anderen Funktionen auch ein wichtiger Kofaktor bei der Synthese von Desoxyribonucleotid-Vorläuferstufen für die DNA-Replikation ist [9]. Jedoch erst in sehr viel höheren als hier verwendeten Konzentration oder bei kontinuierlicher Behandlung über Wochen vermag BSO einen cytotoxischen Effekt auf Tumorzellen auszuüben [163; 161]. Die bereits bei nicht-toxischen BSO-Konzentrationen auftretende Glutathion-depletierende Wirkung hat auf nahezu alle Tumorzellarten den Effekt einer Sensitivierung sowohl für chemotherapeutische Substanzen als auch Bestrahlung [164; 165]. Insbesondere alkylierend wirkende Cytostatika werden bevorzugt durch Konjugation mit GSH entgiftet und so in ihrer Wirkung durch BSO verstärkt [162]. Wahrscheinlich haben die meisten Tumorzelllinien infolge des Transformationsvorgangs (welcher einer Selektion gleichkommt) eine verbesserte Fähigkeit entwickelt, eine Situation von gesteigertem oxidativen Stress bzw. Glutathionmangel zu kompensieren. Hierunter fallen erhöhte Spiegel an Glutathion oder gesteigerte Expression von entgiftend wirkenden Enzymen. Neben den eigentlichen antioxidativen Schutzenzymen haben hier die sog. multi-drug-resistance(MDR)-Proteine Bedeutung [166; 167]. Diese verleihen Resistenz, weil sie als membranständige Transportproteine cytotoxische Moleküle und auch Konjugate von Cytostatika und Glutathion aus der Zelle herauspumpen. Sehr viel größer ist die Toxizität von BSO gegenüber nicht-immortalisierten Primärzellen [166] oder ausdifferenzierten Neuronen (zur besonderen Vulnerabilität von Neuronen sei verwiesen auf Kap.2.4) [70]. Allerdings ist die Situation primärer Neurone in Kultur nicht mit der Situation in vivo zu vergleichen, weil im Hirn Gliazellen eine wichtige Rolle bei der Versorgung von Neuronen mit Glutathion zukommt. Wie bereits in Abschnitt 2.2 behandelt, nehmen Neurone kein Glutathion sondern vermutlich dipeptidische Vorstufen auf, welche durch γ -

Glutamyltranspeptidase katalysierte Hydrolyse von extrazellulärem Glutathion entstehen. Dieses stammt von Astrogliazellen [168; 169], welche verglichen mit Neuronen einen höheren Glutathiongehalt und höhere Aktivitäten an Enzymen der Glutathionsynthese und des Glutathionrecyclings aufweisen [25; 24]. Die Blut-Hirn-Schranke ist für BSO wenig permeabel [170], so daß die systemische Behandlung von Tieren mit BSO kein geeignetes Modell für oxidativen Streß im Hinblick auf Neurodegeneration darstellt. Werden junge Mäuse mit BSO behandelt, deren Blut-Hirn Schranke noch nicht vollständig ausgebildet ist oder bei Verwendung von hohen Dosen oder Zusätzen, welche die Blut-Hirn-Schranke permeabel machen, so läßt sich eine Senkung der Glutathionspiegel im Gehirn erzielen. Interessanterweise wurden in diesen Studien pathologische Veränderungen sowohl der Mitochondrien [171] als auch der dopaminergen nigrostriatalen Neurone [172] gefunden, obwohl der zweite Befund kontrovers erscheint [173]. Dies unterstützt Hypothesen bezüglich der Genese der Parkinsonschen Krankheit, wonach der als frühe pathologische Veränderung in Gehirnen von Parkinsonpatienten beschriebene Glutathionverlust zumindest Mitursache für den Verlust besonders streßanfälliger dopaminergener Neurone und mitochondrialer Funktionen sein kann. Neben den Unterschieden zwischen einem langewährenden, chronischen Degenerationsprozeß im Menschen und den akuten Szenarien im Tier- oder Zellkulturmodell ist auch zu bedenken, daß die Ursache des Glutathionsverlustes in Parkinsongehirnen nicht geklärt ist. Die Aktivitäten der Enzyme der GSH-Synthese und des Glutathionmetabolismus jedenfalls sind nicht verändert, es findet sich lediglich eine Erhöhung der γ -Glutamyltranspeptidase Aktivität, was sich am plausibelsten als kompensatorische Reaktion auf einen Glutathionmangel deuten läßt [174].

5.2 Komplex I-Aktivität und oxidativer Streß: Ursache oder Wirkung

Die Frage, ob der bei der Parkinsonschen Krankheit auftretende oxidative Streß die Folge oder Ursache einer Komplex I Inhibition ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ziel der in diesem Abschnitt dargestellten Experiment war es, den (möglichen) Zusammenhang zwischen Glutathiondepletion und Komplex I-Minderfunktion aufzuklären. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) wurde erstmals 1983 beschrieben als Nebenprodukt der Synthese von Meperidinderivaten, das bei intravenöser Gabe eine sehr selektive Zerstörung dopaminerger Neurone der Substantia nigra und ein Parkinsonsyndrom in Mensch und Tier auslöst [175]. Durch Monoaminoxidaseaktivität in Astrozyten erfolgt zunächst Oxidation zu 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) [176; 177]. Dieses wird selektiv durch Dopamintransporter dopaminerger Neurone aufgenommen und infolge seiner positiven Ladung in Mitochondrien akkumuliert [178; 179]. Dort inhibiert MPP^+ die Funktion des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Auch in post mortem Hirngewebe und peripheren Blutzellen von Parkinson-Patienten wurde eine Funktionsminderung des Komplex I festgestellt [49; 180]. Generell sind Neurone infolge eines hohen Energiebedarfs in hohem Maße anfällig für eine Komplex I-Hemmung. In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde jedoch bislang kein Agens identifiziert, welches durch einen ähnlichen Wirkmechanismus für die idiopathische Form der Parkinsonkrankheit, den maßgeblichen Anteil aller Krankheitsfälle, verantwortlich sein könnte.

Die Toxizität von Komplex I Inhibitoren in *in vitro* Experimenten spiegelt die Verschiedenheit der betrachteten Zelltypen wider. Im hier verwandten Behandlungsschema war bis 24 h kein Zelltod von PC 12 Zellen durch MPP^+ (250 μ M und 2,5 mM) festzustellen, dieser Zeitrahmen war in einer früheren Studie des Labors etabliert worden [106]. Dabei war gezeigt worden, daß MPP^+ in dieser Zelllinie einen Wachstumsarrest auslöst und das Absterben bei längeren Behandlungszeiträumen hauptsächlich aus der Erschöpfung von Nahrungssubstraten resultiert. Die meisten immortalisierten Zelllinien mit neuronalen Eigenschaften sind vergleichsweise resistent gegen MPP^+ im micromolaren Konzentrationsbereich [106; 181]. Hingegen sind primäre und insbesondere dopaminerge Neurone auch in Kultur wesentlich sensitiver gegenüber MPP^+ und Energieerschöpfung infolge Komplex I Inhibition [182; 183; 184]. Auch für PC 12 Zellen sind sehr unterschiedliche toxische Konzentrationen von MPP^+ berichtet worden [185; 186; 106]. Dies scheint im Differenzierungsstatus der Zelle und in der hohen klonalen Variabilität dieser Zelllinie begründet, sogar das Vorkommen von gegen MPP^+ völlig resistenten PC 12

Subklonen wurde festgestellt [187; 188]. Mit der Fülle von z. T. widersprüchlichen Literaturdaten noch am besten vereinbar ist die Vorstellung, daß die Folgen des primären Effektes von MPP^+ , die Inhibition des Komplex I, für das Überleben von Neuronen oder neuronalen Zellen sehr stark von deren Energieaustattung bzw. Vermögen zur Toleranz einer Energiemangelsituation abhängen. Proliferierende, immortalisierte Zellen können sich durch gesteigerte Glykolyse und Arretierung des Zellzyklus für einen bestimmten Zeitraum an diese Situation anpassen, während postmitotische Neurone infolge ihres hohen Energiebedarfs dazu in viel geringerem Ausmaß in der Lage sind und bei geringeren Konzentrationen in kürzeren Zeiträumen absterben. Ob dieser Zelltod apoptotisch oder nekrotisch verläuft, wird wiederum von der noch vorhanden Restenergie (ATP-Gehalt) einer Zelle determiniert. Vergleicht man die MPP^+ Toxizität mit anderen Komplex I Inhibitoren wie Rotenon, so fällt auf, daß bei Rotenon eine Komplex I-Inhibition und toxische Effekte bei um Größenordnungen niedrigeren Konzentrationen eintritt [181; 189; 190]. Erklärt werden kann dies mit der lipophileren Struktur des Rotenons, von zwei potentiellen Inhibitor-Bindestellen des NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase Komplexes liegt eine innerhalb der Membran [190].

Zahlreiche *in vitro* Experimente, durchgeführt an isolierten Mitochondrienpräparationen, zeigen die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch MPP^+ [191; 192]. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies nach Komplex I Inhibition scheint allerdings von biochemischen Rahmenbedingungen, nämlich einem reduzierten Zustand der Elektronencarrier der Elektronentransportkette [193], abhängig zu sein. Dies entspricht jedoch nicht der Situation in physiologisch atmenden Mitochondrien. Betrachtet man die Situation einer Zelle bei inhibiertem Komplex I noch vor dem Aufkommen von Folgeschäden, ist kein erhöhtes Niveau reaktiver Sauerstoffspezies, sondern das Gegenteil und eine Zunahme der reduzierten Spezies NADH und NADPH festzustellen [194]. Dies entspricht der Vorstellung, daß eine Blockade des Komplex I den Eintritt von Reduktionsequivalenten (NADH) in die Elektronentransportkette unterbindet und so auch die mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unterbricht. Dafür sprechen ebenfalls die in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschriebenen Experimente, welche demonstrieren, daß MPP^+ wie Rotenon die durch Etacrynsäure in PC 12 Zellen hervorgerufene Radikalentstehung unterdrücken. Eine mögliche Erklärung ist, daß die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies eine sekundär einzuordnende Folge von MPP^+ ist, die erst dann auftritt, wenn Energieerschöpfung die antioxidative Verteidigung lähmt oder die Membranstruktur der Mitochondrien infolge Depolarisation verlorenght. Entsprechend sehen auch andere Autoren Radikale als Folge einer MPP^+ -verursachten ATP-Depletion [195]. Die Frage, ob unter Komplex I-Inhibition durch MPP^+ die

Elektronentransportkette noch über Komplex II (Succinatdehydrogenase) mit Reduktionsequivalenten beladen wird, wird kontrovers diskutiert [196; 187]. Der Übergang von einer Situation primärer Komplex I Hemmung zu Energiemangelfolgeschäden ist konzentrationsabhängig, die unterschiedlichen Suszeptibilitäten verschiedener Zelltypen und auch Subklone der gleichen Zelllinien dürften einen Gutteil der scheinbar widersprüchlichen Literaturdaten zum Wirkmechanismus der MPP⁺-Toxizität erklären. Im Einklang mit dieser Hypothese deuten neuere Publikationen ebenfalls daraufhin, daß MPP⁺ in niedrigen Konzentrationen zwar Komplex I hemmt und zum Zelltod dopaminergener Neurone führt, aber unter diesen Bedingungen nicht zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies führt [197]. Dies bestätigt die nachgewiesene Wirkung von MPP⁺ auf PC 12 Zellen. Bei einer Konzentration von 250 µM MPP⁺ war in den Zellen eine mindestens 50 %ige Inhibition der Komplex I Aktivität meßbar. Wie bereits erwähnt, schwächte diese Konzentration auch signifikant die durch Etacrynsäure ausgelöste Radikalentstehung ab (Abbildung 4-8). Dagegen führten auch 2,5 mM MPP⁺ nicht zu erhöhter DCF-Fluoreszenz. Da Kang und Mitarbeiter in PC 12 Zellen einen schwachen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies unter 1 mM MPP⁺ nach 6 h Behandlung (detektiert mittels Durchflußzytometrie) berichten [107], wurde die Messung mit dieser Detektionsmethode wiederholt, aber ebenso keine Radikalentstehung gemessen. Die Messung thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen, vornehmlich mehrfunktionelle Aldehyde als Endprodukte von Lipidperoxidationsreaktionen, sollte zeigen, ob sich Produkte eines niedrigen (nicht erfaßbaren) oxidativen Streßniveaus über die Zeit akkumulieren. Jedoch war auch nach 2 d Inkubation mit MPP⁺ kein erhöhter Gehalt dieser Substanzen vorhanden. Der Vergleich mit Behandlung der Zellen mit Etacrynsäure bzw. Eisen(II)sulfat zeigt, daß mit zwei verschiedenen Ansätzen, nämlich Depletion mitochondrialen Glutathions und Forcierung von Fentonreaktionen und dadurch Hydroxylradikalen, reaktive Sauerstoffspezies erzeugt und detektiert werden können und daß unter solchen Bedingungen schnell Zelltod eintritt. Es scheint also, daß die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies erst bei MPP⁺-Konzentrationen auftritt, welche weit über den für eine Komplex I Hemmung nötigen liegen. Eine Reihe von zusätzlichen Wirkungen von MPP⁺ bei höheren Konzentrationen sind beschrieben, dies sind unter anderen eine Inhibition der α -Ketoglutaratdehydrogenase des Citratcyclus [198] und Destabilisierung der mitochondrialen Membranen [199]. Ersteres würde die Energieverknappung verstärken und beschleunigen, der zweite Effekt die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies infolge Zerstörung der räumlichen Anordnung der Elektronentransportkette begünstigen.

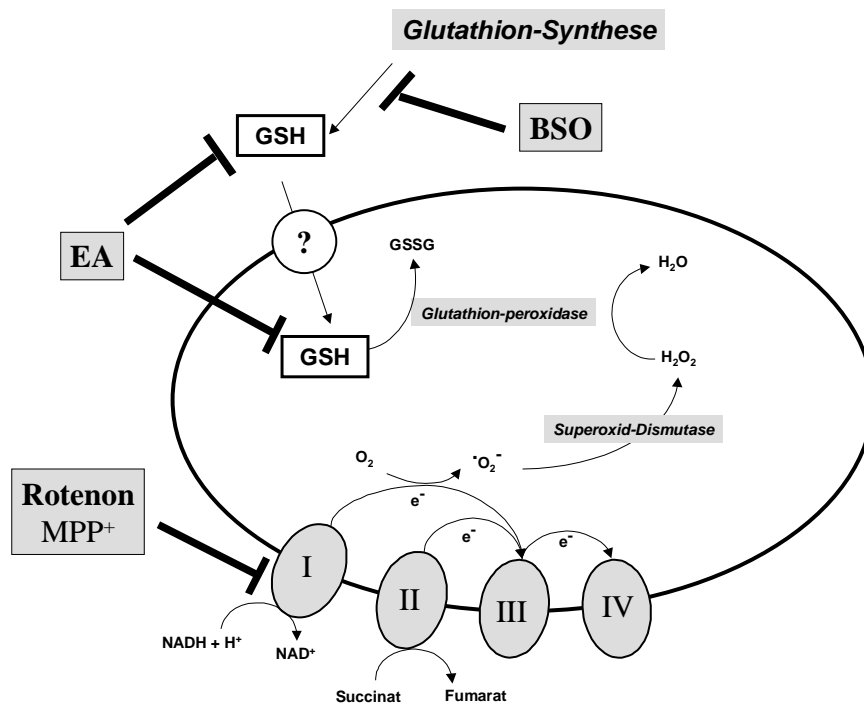


Abbildung 5-1: Vereinfachte, schematische Darstellung der Wirkungspunkte von BSO, EA und der Komplex I Inhibitoren MPP⁺ und Rotenon an der mitochondrialen Glutathion- und Redoxhomöostase. Die Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette sind mit I-IV nummeriert. Während EA durch direkte Inaktivierung mitochondrialen GSHs die mitochondriale Generation von reaktiven Sauerstoffspezies fördert, bewirkt eine Komplex I-Hemmung durch MPP⁺ (oder Rotenon) eine Verringerung des mitochondrialen Elektronentransports, der daraus entstehenden Sauerstoffspezies und einen geringeren Verbrauch von GSH. Eine Blockade der cytosolischen GSH-Synthese durch BSO führt, abhängig von der endogenen Streßlast, nur über längere Zeitspannen zu gesteigerten reaktiven Sauerstoffspezies.

MPTP wird astroglial durch Monoaminoxidase zu MPP⁺ oxidiert, Inhibitoren dieses Enzyms schützen vor MPTP-Toxizität, weil dann keine selektive Aufnahme von MPP⁺ durch Neurone erfolgen kann [200; 201]. Zudem kann diese Umsetzung, wie alle Monoaminoxidase-katalysierten Redoxreaktionen, oxidativen Streß erzeugen. Für die Situation dopaminerger Neurone gilt außerdem, daß die Metaboliten des catecholaminergen Stoffwechsels nichtkatalysiert Redoxreaktionen eingehen können, was zum Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies führt. Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß nahezu jeder Zelltod, mit der Ausnahme von Apoptose auf niedrigem, physiologischem Niveau, unter Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies abläuft. Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Entstehung freier Radikale durch MPP⁺ auf zellulärer Ebene besagt, daß MPP⁺ nach Aufnahme in die Zelle durch Konkurrenz am vesikulären Dopamintransporter zur Verdrängung von Dopamin aus den Speichervesikeln führt [202]. Die gestiegenen intrazellulären Konzentrationen an freiem Dopamin erzeugen über Autooxidationsreaktionen des Catechols ebenfalls vermehrt reaktive Sauerstoffspezies. Es gibt also zahlreiche Gründe, warum eine MPTP-Vergiftung mit nachfolgendem Untergang dopaminerger Neurone von der Entstehung reaktiver

Sauerstoffspezies begleitet ist, ohne daß diese unmittelbar aus der Komplex I-Inhibition durch das MPP^+ -Kation resultieren. Für die Entstehung der Parkinsonschen Krankheit stellt sich nun die Frage, ob eine Minderfunktion des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette am Beginn der Pathogenese stehen könnte. Der Komplex I Inhibitor Rotenon löst bei systemischer Gabe in Tieren ebenfalls eine der Parkinson-Pathologie sehr ähnliche Zerstörung nigraler, dopaminerger Neurone aus [203]. Die selektive Vulnerabilität dopaminerger Neurone wird hier mit dem hohen Energiebedarf und dem hohen Niveau an basalem oxidativem Streß dieser Nervenzellpopulation erklärt.

Ziel der folgenden Experimente war nun, die Frage zu klären, ob und wie ein Komplex I-Defekt als hypothetische erste pathologische Veränderung die Glutathionspiegel einer dopaminergen Zelle verändert. Es zeigte sich überraschenderweise, daß bei einer MPP^+ -Konzentration von 250 μM die zellulären Glutathionspiegel während der ersten 24 h Behandlungsdauer anstiegen. Erwiesenermaßen tritt in diesem Zeitraum noch kein Zelltod auf. Die Zunahme des zellulären Gesamt-Glutathions verteilte sich zu etwa gleichen Anteilen auf die reduzierte (GSH) und die oxidierte Spezies (GSSG), so daß sich die Ratio GSSG zu (GSSG+GSH) als Indikator für das zelluläre Redoxmilieu nur wenig veränderte. Dies korrespondiert mit dem Ausbleiben reaktiver Sauerstoffspezies und Thiobarbitursäure-reaktiver Metaboliten unter der 250 μM MPP^+ Konzentration. Vergleichbare Effekte auf die Glutathionspiegel hat ebenso Rotenon in Konzentrationen von bis zu 0,1 μM , diese Konzentrationen führen ebenso wie 250 μM MPP^+ zu einer etwa halbmaximalen Hemmung des Komplex I. Dieser Anstieg ist nicht ohne weiteres erklärbar, eine erhöhte Syntheseleistung z.B. durch Induktion der γ -GCS, des Schrittmachereozym der Glutathionsynthese, ist aus mehreren Gründen wenig wahrscheinlich. Typischerweise wird eine solche Streßantwort einer Zelle durch oxidativen Streß oder elektrophile Agenzien ausgelöst, reaktive Sauerstoffspezies waren jedoch nicht festzustellen und auch die Aktivität von NF κ B, eines der am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren, die während einer zellulären Streßantwort aktiviert werden, war nicht verändert. Eine gesteigerte Synthese von Glutathion würde darüberhinaus auch einen erhöhten Verbrauch von ATP bedeuten. Daß die Zelle bei inhibiertem Komplex I und anaerobem Metabolismus sich jedoch in einer Energiemangelsituation befindet, belegen auch Messungen des ATP-Gehalts von MPP^+ -behandelten Zellen [189]. Auch führte eine 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit 500 μM BSO nicht zu einem meßbaren Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies unter MPP^+ -Behandlung, so daß ein leichter oxidativer Streß als Ursache der erhöhten Glutathiongehalte unwahrscheinlich ist. Allerdings sind antioxidative Kompensationsreaktionen in vielen

Zellkulturmodellen für oxidativen Streß beobachtet worden [204], auch in dopaminergen Neuronen, welche mit MPP^+ behandelt wurden [205; 206]. Es kann also die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß auch im Falle der PC 12 Zellen die erhöhten Glutathionspiegel Teil einer unvollständigen bzw. durch andere als die erwähnten Stimuli ausgelösten Streßantwort der Zelle sind, trotz des Fehlens von Radikalen und ATP-Mangel. Eine zweite Möglichkeit wäre ein geringerer Verbrauch von Glutathion, infolge eines niedrigeren basalen Niveaus reaktiver Sauerstoffspezies bei inhibierter mitochondrialer Respiration. Andere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei einer Inhibition der mitochondrialen Atmungskette an Komplex I intramitochondrial die Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies abnehmen und die Menge an Reduktionsäquivalenten, primär des Komplex I-Substrates NADH und auch NADPH zunehmen [194]. Auch bei einer nicht gesteigerten Glutathionsynthese könnte so durch ein verändertes zelluläres Redoxmilieu die Menge an reduziertem Glutathion erhöht sein.

Wurden dagegen PC 12 Zellen mit 10- und 100-fach höheren Konzentrationen von Rotenon (1 und 10 μM) bzw. MPP^+ (2,5 mM) inkubiert, so kommt es neben einer maximalen Komplex I Inhibition (hinsichtlich der Komplex I-Inhibition durch Rotenon siehe: [108; 109]) auch zu den bereits erwähnten zusätzlichen Wirkungen der MPP^+ Kationen, nämlich Inhibition des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplex [198] und Destabilisierung der mitochondrialen Membran [199]. Alle diese Effekte dürften in einer rapiden und nachhaltigen Energieverarmung der Zelle resultieren, infolge dessen die Glutathionsynthese völlig zum Erliegen kommt, ebenso das NADPH-abhängige Recycling von GSSG durch Glutathionperoxidasen. Dies erklärt den starken Anstieg der GSSG-Spiegel in PC 12 Zellen, welche mit 1 und 10 μM Rotenon und 2,5 mM MPP^+ behandelt worden waren, die sinkenden GSH- und akkumulierenden GSSG-Mengen drücken sich in einer drastisch steigenden GSSG/(GSH+GSSG) Ratio aus. Trotz dieser Verschiebung des zellulären Redoxmilieus zu einem „oxidierten“ Zustand treten auch unter den hohen Konzentrationen beider Komplex I-Inhibitoren während der ersten 24 h Behandlung keine reaktiven Sauerstoffspezies auf. Da innerhalb dieses Zeitraums auch kein Zelltod auftrat, ist zu vermuten, daß Radikale in einem solchen Zellkulturmodell ein sekundäres Ergebnis von Zelltodprozessen sind, zumal wenn die antioxidative Kapazität der Zellen infolge Energiemangels erschöpft ist.

Im Hinblick auf die Parkinsonsche Erkrankung ist nicht geklärt, was die Ursache einer die Degeneration der besonders vulnerablen dopaminergen Neurone auslösenden Komplex I-Minderfunktion sein könnte. Da Rotenon auch als Pestizid Anwendung findet, wurden in der Landwirtschaft eingesetzte ähnliche Verbindungen verdächtigt. Epidemiologische

Untersuchungen ergaben eine erhöhte Rate von Parkinsonerkrankungen in ländlichen Gebieten, wo die Umwelt einen vergleichsweise hohen Gehalt an Pestiziden aufweist [207; 208]. Ein ursächlicher Nachweis für diese Hypothese oder die Identifikation eines spezifischen Pestizids fehlt jedoch bislang [209; 210]. Wiederum werden in diesem Zusammenhang multifaktorielle Ursachengefüge diskutiert [211], z. B. Umwelteinflüsse in Verbindung mit einer Mutation eines der Xenobiotika-metabolisierenden Enzyme der Cytochrom P 450-Familie [212]. Auch hier fehlen bislang noch eindeutige Belege [213]. Sieben der 42 Untereinheiten des Komplex I-Holoproteins sind auf dem mitochondrialen Genom kodiert. Im mitochondrialen Genom können sich durch Alterung und oxidativen Streß Mutationen akkumulieren (siehe Abschnitt 2.4.1), und in Fällen von familiär vererbtem Parkinsonismus wurden auch Punktmutationen der mitochondrialen DNA und mitochondriale Dysfunktionen der Betroffenen nachgewiesen [214; 215]. Solche Mutationen des mitochondrialen Genoms und der mitochondriale Funktionsverlust werden erwartungsgemäß maternal vererbt [51]. Studien des mitochondrialen Genoms von größeren Patientengruppen hinsichtlich Mutationen und Polymorphismen erwiesen jedoch, daß nur bei einem Bruchteil der idiopathischen Parkinsonerkrankungen Mutationen der mitochondrialen DNA nachweisbar waren [216; 217; 218].

Zusammengefaßt sprechen folgende Argumente dafür, daß beim größten Teil der idiopathischen Fälle von Parkinson eine Komplex I-Minderfunktion eher Folge denn Ursache des oxidativen Streß und Neuronenuntergangs ist:

Die Verringerung der Glutathionspiegel ist die am frühesten feststellbare biochemische Veränderung in Substantia nigra Gewebe, sie findet sich bereits bei der sog. incidental Lewy Body disease, welche als präsymptomatische Form der Parkinsonschen Krankheit gilt [48; 41]. Der Glutathiongehalt in der Substantia nigra solcher Patienten ist um ca. 35 % vermindert, was nur wenig unter dem Ausmaß der Glutathionverminderung in Gewebe von Parkinsonpatienten liegt. Dagegen findet sich im Gewebe dieser Patienten keine oder nur eine leichte Erniedrigung der Komplex I-Funktion, verglichen mit dem Gewebe von Patienten mit Parkinson'scher Erkrankung. Die Daten aus Abschnitt 4.2 (Tabelle 4-13) belegen, daß die Komplex I-Aktivität sehr empfindlich gegenüber oxidiertem Glutathion (GSSG) und EA, vermutlich also Oxidation von Thiofunktionen, ist. Neuere Untersuchungen demonstrieren in gleicher Weise die ausgeprägte Vulnerabilität des Komplex I gegenüber einer Verminderung zellulären Glutathions [111].

Entsprechend zeigen die Messungen der Glutathiongehalte MPP⁺-behandelter PC 12 Zellen, daß eine Konzentration dieses Komplex I-Inhibitors, welche noch keinen Zelltod auslöst, die

Glutathionspiegel nicht verringert und keine reaktiven Sauerstoffspezies verursacht. Demgegenüber ist der berichtete oxidative Streß bei akuter Wirkung von hohen Dosen MPTP und anderen Komplex I-Inhibitoren wahrscheinlich Folge des sich in kurzer Zeit vollziehenden Untergangs eines Großteils der dopaminergen Neurone der Substantia nigra. Beispielsweise würden hohe Konzentrationen des Transmitters Dopamin, freigesetzt aus den Zellkörpern, autooxidative Reaktionen unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eingehen. Dies entspricht jedoch nicht dem Modell einer über Jahre andauernden, chronischen Degeneration, welche sich erst im Alter nach Verlust von ca. 40-50 % aller ursprünglich vorhandenen dopaminergen Neurone, in einer motorischen Symptomatik äußert. Freilich wird diese Fragestellung am Menschen nicht zu klären sein, und die artifiziell herbeigeführten Zellkultur- und Tiermodelle für die Parkinsonsche Krankheit und oxidativen Streß können naturgemäß nur das Endergebnis, nicht aber den Verlauf der Krankheit widerspiegeln. Die Ursache eines zellulären Glutathionverlustes als erster Schritt in der Pathogenese ist daher ebenso unklar wie die Identität eines potentiellen exogenen Hemmstoffes des Komplex I. Da Glutathionsynthesekapazität (γ -GCS Aktivität) in post mortem Substantia nigra-Gewebe von Parkinsonerkrankten erscheint nicht verändert ist [174], entstand die Hypothese einer gestörten intrazellulären Glutathionhomöostase.

5.3 Mitochondrialer Glutathiontransport in Neuronen

Eine Reihe prinzipieller Überlegungen und experimenteller Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß Mitochondrien über einen spezifischen Mechanismus für die Aufnahme von Glutathion verfügen.

- Die innere der beiden mitochondrialen Membranen ist impermeabel für geladene Teilchen, alle Metaboliten und nukleär kodierte (im Cytosol synthetisierte) Proteine werden durch entsprechende, membrandurchspannende Transportproteine importiert [99; 219].
- Die mitochondriale Matrix ist gegenüber dem Cytosol negativ geladen, unter physiologischen pH-Bedingungen auch das Glutathionmolekül, dadurch ist eine Diffusion in die mitochondriale Matrix erschwert.
- Mitochondriales Glutathion hat eine längere Halbwertszeit als das übrige zelluläre Glutathion, in Mitochondrien jedoch wurde keine nennenswerte Aktivität des zentralen Synthesenzym γ -Glutamylcysteinylsynthetase (γ -GCS) nachgewiesen [18].
- An Mitochondrien isoliert aus Rattenleber, Rattenniere und *Xenopus* Oocyten, welche mRNA aus Rattenleber translatierten, wurde ein GSH-Transport nachgewiesen [21; 23; 20].
- Eigene (Abschnitt 4.1) und publizierte Untersuchungen an in vitro Systemen, z.T. auch mit neuronalen Zellen deuteten an, daß Mitochondrien unter Bedingungen eines zellulären Glutathionmangels einen separaten Glutathionpool auch gegen einen Konzentrationsgradienten zum Cytosol aufrechterhalten können [17; 220; 25].

Um einen GSH-Transport in Mitochondrien aus Neuronen zu untersuchen, wurden Rattenvorderhirne als Ausgangsmaterial zur Mitochondrienisolation verwandt, da die Evaluation verschiedener Ansätze zur Mitochondrienpräparation aus Zellkulturen erwies, daß aus diesen nicht hinreichend reine (nicht mit weiteren Zellbestandteilen, insbesondere Membranen anderer Organellen vergesellschaftete) Fraktionen in genügender Ausbeute gewonnen werden konnten. Natürlich enthält das Hirnparenchym auch nicht-neuronale Zellen, wie Astroglia aus dem Corpus callosum, Endothelien und periphere Blutzellen der Hirnkapillaren, deren Anteil kann aber als gering veranschlagt werden. Die für die Transportexperimente verwendete Präparation nach Lopez-Perez trennt im letzten Reinigungsschritt Synaptosomen ab, so daß die erhaltenen Mitochondrien vornehmlich aus Zellsomata stammen dürften. Obwohl die Reinheit und Funktionalität der erhaltenen Präparation nach morphologischer, elektronenmikroskopischer Analyse, Messungen von

Markerenzymaktivitäten und Sauerstoff-Respirometrie publizierten Präparationen voll entsprach, bestehen jedoch prinzipielle Bedenken hinsichtlich der natürlichen Konformation von Mitochondrien im isolierten Zustand. Insbesondere der unterschiedliche onkotische Druck, aber auch die Dauer einer Fraktionierung lassen eine Veränderung der Organellen gegenüber dem nativen Zustand innerhalb einer Zelle annehmen, dies gilt aber dann ebenso für früher gewonnene Daten zu mitochondrialem Glutathiontransport und verbietet somit nicht den Vergleich dieser Daten untereinander.

Die Bedingungen der Transportmessung wurde analog zu Studien von Collet [19] und Martensson [21] gewählt. Da die Isolationsprozedur ca. 3 h in Anspruch nahm, kann davon ausgegangen werden, daß so isolierte Mitochondrien ohne die normalerweise herrschenden millimolaren extramitochondrialen GSH-Konzentrationen an GSH verarmt sind, demnach also bei Inkubation in einem GSH-haltigen Medium dieses anfangs schnell aufnehmen sollten. Mit Erreichen des Gleichgewichts sollte eine Sättigung eintreten. Für die Phase vor der Gleichgewichtseinstellung mit linearer Zunahme des GSH-Gehalts sind unterschiedliche Zeiträume von weniger als 1 bis zu 10 min berichtet worden. Hier wurde ein Intervall von 30 Sekunden gewählt, um mit Sicherheit im Bereich linearer Anfangssteigung zu sein. Diese Anfangsgeschwindigkeit der Glutathionaufnahme wurde nun zunächst bei variierten exogenen GSH-Konzentrationen untersucht, um die Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration zu betrachten. Dieser Konzentrationsbereich bewegte sich zwischen 1 μ M und 75 mM. Bei Konzentrationen über 10 mM, was als Obergrenze der physiologisch vorkommenden intrazellulären GSH-Konzentrationen angesehen wird, wurde zunächst äquimolar weniger Saccharose im Puffer eingesetzt um die Osmolarität konstant zu halten, es zeigte sich, daß dies jedoch keine Auswirkungen auf die in diesem Konzentrationsbereich sehr variablen Aufnahmegeschwindigkeiten zur Folge hatte. Auch in anderen Veröffentlichungen ist dieses Phänomen der Instabilität des Transports bei sehr hohen Konzentrationen auch bei kurzen Inkubationszeiten beschrieben. Membranveränderungen der Organelle durch unspezifische Reaktionen zwischen Membranbestandteilen und dem Tripeptid sind vermutlich dafür verantwortlich.

Die Temperatur des Experiments wurde aus den erwähnten Gründen einer möglichen unmeßbar schnellen Gleichgewichtseinstellung bei 37°C auf Raumtemperatur (23 °C) festgelegt.

Für die hohe Varianz der Aufnahmegeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen sind eine Reihe experimenteller Ursachen anzuführen:

- Die Proteinbestimmung der isolierten mitochondrialen Fraktion nach der Bradford-Methode nimmt 30 min in Anspruch. Um eine weitere Schädigung der isolierten Mitochondrien durch diese Wartezeit zu vermeiden, wurde die Proteingehaltsbestimmung daher erst nach den Transportmessungen, an einem bei -80°C eingefrorenen Aliquot vorgenommen. Das bedeutet, daß pro Transportmessung gleichbleibende Volumina von Mitochondrienpräparationen unterschiedlichen Gehalts eingesetzt wurden. Zwar wurden immer die gleiche Anzahl Tiere pro Präparation (6) eingesetzt, die Ausbeute schwankte jedoch zwischen ca. 0,6 und 4,1 mg Protein. Der kritische Punkt ist hier wahrscheinlich der Homogenisationsschritt. Wie in Abschnitt 3.5 erläutert, war bei allen Bedingungen die aufgenommene Menge GSH um mindestens 3 Größenordnungen geringer als die Gesamtmenge GSH im Ansatz, trotzdem können natürlich nicht-lineare Effekte der eingesetzten Menge an Mitochondrien auf die Anfangsaufnahme nicht ausgeschlossen werden.
- Die Zeiträume von der Präparation bis zur Aufnahmemessung unterschieden sich naturgemäß ebenfalls, eine Versuchsreihe von Inkubationen mit radioaktivem GSH erstreckte sich ebenso über 2 bis 2,5 h, so daß die Mitochondrien von Meßpunkt zu Meßpunkt unterschiedlich lange auf Eis gelagert waren. Ein Verlust von ursprünglicher Funktionalität und Struktur der Organellen ist auch bei 4°C über diese Zeiträume zu vermuten.
- Die Kontrollexperimente mit ^{14}C -markiertem Inulin zeigten, daß die unspezifische Aufnahme als gering zu veranschlagen und die zweimalige Waschprozedur des Filters hinreichend effizient ist. Zudem wurde das Totvolumen eines Filters durch Wiederholung der Inkubations- und Filtrationsprozedur mit der jeweiligen GSH-Konzentration zu jedem Meßpunkt separat abgeschätzt und eingerechnet, die hier wiedergefundene Radioaktivität war über eine Versuchsreihe konstant. Da jedoch der Gehalt der eingesetzten Mitochondrienpräparationen sehr unterschiedlich ausfiel, war das Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer gefundener Radioaktivität ebenso Schwankungen unterworfen (ca. 10 – 50 %). Bei Messungen an wenig mitochondrialem Protein und geringen Aufnahmegeschwindigkeiten resultieren aus vergleichbaren Varianzen der ausgezählten Radioaktivität im Verhältnis höhere Varianzen des errechneten Glutathiongehaltes der auf dem Filter zurückgehaltenen Organellen.

Die Beurteilung der Aufnahmegeschwindigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten läßt vermuten, daß der Zeitpunkt der maximalen GSH-Aufnahme noch vor dem ersten Meßpunkt

nach 30 Sekunden Inkubation liegen könnte und daß sich das System zu diesem Zeitpunkt bereits auf den Gleichgewichtszustand zubewegt. Um das zu verifizieren, müßten mehr Meßpunkte bei kürzeren Zeitintervallen abgefragt werden, was aber im Bereich der ersten 30 Sekunden durch die experimentelle Durchführung nicht möglich war. Um den Prozeß zu verlangsamen und dadurch zeitlich besser auflösen zu können, müßten diese Messungen bei niedrigerer Temperatur reproduziert werden.

Trotz dieser Einschränkungen hinsichtlich der Varianz der experimentellen Bedingungen lassen die erhaltenen Daten Schlußfolgerungen über einen mitochondrialen Glutathiontransport in Neuronen zu. Zunächst zeigen isolierte Mitochondrien eine sättigbare Glutathionaufnahme im Bereich millimolarer GSH-Konzentrationen, welche physiologischen Bedingungen nahe kommen. Die Wahl einer Funktion für die mathematische Beschreibung des Prozesses ist eingedenk der hohen Varianzen der gemittelten Aufnahmegeschwindigkeiten nur von vorläufigem Charakter, es scheint jedoch so, daß ein Modell kooperierender Unterheiten (Gleichung 4, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) eine wesentlich bessere Annäherung liefert, als eine ein- oder zweistufige Michaelis-Menten Kinetik.

Die Hinzunahme eines linearen Terms für Diffusionsprozesse (Gleichung 5, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) zu einer einfachen Michaelis Menten Kinetik erbrachte keine verbesserte Annäherung, wegen der hohen Varianzen der Aufnahmegeschwindigkeiten im Sättigungsbereich wurde hier ein negatives Vorzeichen, d.h. negative Aufnahme = Efflux bei hohen Substratkonzentrationen, errechnet.

Eine ähnlich gute Annäherung beurteilt nach dem Regressionskoeffizienten wie das Modell kooperierender Unterheiten erbrachte nur noch das Modell zweier (oder mehr) kooperierender Substratmoleküle (Gleichung 6, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dieses Modell impliziert, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen der Transport infolge seltener gleichzeitiger Bindung zweier Substratmoleküle am Transporter langsam verläuft, wogegen bei hohen Substratkonzentrationen die Anzahl der Transportermoleküle limitierend auf den Transport wirkt [221]. Mathematisch beschrieben ergibt dies eine sigmoidale Form der Auftragung v gegen $[S]$, was dem plot der Meßwerte ähnelt. Möglicherweise ist ein Symport von Glutathion mit einem zweiten Metaboliten (z.B. Dicarboxylate, zu bekannten mitochondrialen Transportsystemen siehe unten und [99]) im experimentellen Ansatz nur unvollständig wirksam, da nur Succinat im Meßansatz enthalten war. Hierdurch könnte die apparente Ähnlichkeit mit einem solchen Transportmodell kooperierender Substratmoleküle, was ja einem Transport von 2 Glutathionmolekülen entsprechen würde, zustandekommen.

Jedoch ist angesichts der unrealistischen Werte dieser Regression für die V_{max} und K_m Parameter (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) das Modell der kooperierenden Unterheiten zu favorisieren.

Die meisten Publikation zu Glutathiontransport zeigen eine einfache Michaelis-Menten Annäherung der erhaltenen Daten, wobei aber meist keine weiteren Angaben zur Statistik der gewählten Annäherung und Vergleich mit anderen Ansätzen gemacht werden. Setzt man voraus, daß ein einziges Transportprotein ohne kooperierende Untereinheiten Ursache des Glutathiontransportes ist, so wäre eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik auch die naheliegendste Erwartung. Die von Garcia-Ruiz et al [20] beschriebene mRNA-Spezies eines vermeintlichen mitochondrialen Glutathiontransportproteins ist jedoch bislang nicht durch weitere Expressionsstudien validiert oder kloniert bzw. sequenziert worden. Ist jedoch der mitochondriale Glutathiontransport das Ergebnis des Zusammenwirkens mehrerer, verschiedener Transportproteine oder Untereinheiten, wie es die hier erhaltenen mathematischen Regressionsanalysen und publizierte Studien an Nierenmitochondrien plausibel erscheinen lassen, so würde eine einzelne, durch Fraktionierung nach Größe erhaltene mRNA-Spezies nur eine Komponente dieses Transports abbilden. Auch konnten zwei ebenfalls von Garcia-Ruiz und Kollegen beschriebene zelluläre GSH-Transporter der Leber bei Expressionsstudien an *Xenopus* Oocyten nicht bestätigt werden [222]. Zudem wurden in den von dieser Arbeitsgruppe publizierten cDNA Sequenzen von vermeintlichen plasmamembranständigen Glutathiontransportern Homologien zum Genom eines *E. coli*-Stammes (K 12) identifiziert, ein Phänomen, welches Klonierungsartefakte möglich erscheinen läßt. Die molekulare Identität eines spezifischen mitochondrialen Glutathiontransportproteins erscheint somit nicht gesichert.

Neuere Studien an Mitochondrien isoliert aus der Niere führten dann auch zur Hypothese, daß der Transport von Glutathion durch Mitochondrien nicht durch ein einzelnes, spezifisches Transportprotein geschieht, sondern Ergebnis der Aktivität von anderen, gleichsam multifunktionellen, mitochondrialen Transportsystemen ist. Dies erscheint plausibel, da viele der mitochondrialen Metaboliten über entsprechende Transportproteine ausgetauscht werden [99], und diese Metaboliten wie z. B. Malat, Glutamat, Succinat strukturell Glutathion ähnlich sind. So konnten Lash und Mitarbeiter zeigen, daß verschiedene bekannte Substrate und Inhibitoren dieser Transportsysteme die Glutathionaufnahme von Nierenmitochondrien beeinflussen können [23]. In diesem Modell wurde die Glutathionaufnahme offensichtlich durch die mitochondrialen Dicarboxylat- und Oxoglutarat-carrierproteine katalysiert. Die Aufreinigung und weitere Charakterisierung dieser mitochondrialen GSH-Transportaktivität

aus der Rattenniere bestätigte diese Beobachtungen, eine mathematische Annäherung wurde hier mit einer Polynomfunktion 2. Grades beschrieben [223]. Die mathematischen Beschreibungen der Transportmodelle kooperierender Untereinheiten und kooperierender Substratmoleküle (Gleichungen 4 und 6, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) weisen ebenfalls quadratische oder höhere Polynomterme auf. Dies deutet ebenfalls auf das Zusammenwirken von mehreren Proteinen oder mehreren Untereinheiten beim Transportprozess hin. Zudem sind die meisten der charakterisierten mitochondrialen Transportsysteme elektroneutral, das bedeutet sie schließen einen Symport von z. B. H^+ oder einen Antiport eines Anions (z. B. Malat) mit ein. Die extramitochondrialen Konzentrationen dieser Ionen im Experiment entsprechen unter Umständen nicht der physiologischen Situation, so daß eventuelle Effekte dieser Ionen auf das Transportverhalten in entsprechenden Experimenten abgeklärt werden müssen und auch eine andere Kinetik des Transportes ergeben könnten. Zusammengenommen widersprechen diese Befunde und Überlegungen, die auf eine Überlagerung mehrerer Effektoren für den Transport hindeuten, nicht dem hier gezeigten Modell eines kooperativen Prozesses. Wie bereits erwähnt, kann der Exponent h der verwendeten Michaelis-Menten Funktion einer kooperativen Bindung für die Anzahl der beteiligten Untereinheiten stehen, in diesem Fall ($h = 2,829 \pm 1,77$) würde man 2 oder 3 beteiligte Untereinheiten annehmen. Die übrigen Kenngrößen der so errechneten Annäherung (v_{\max} : $77,87 \pm 13,94$ nmol/min/mg und $K_{0,5}$: $13,66 \pm 4,19$ mmol) sprechen für einen niederaffinen Transport. Entsprechende publizierte Werte liegen für den Transport in der Niere bei > 10 nmol/min/mg für v_{\max} und 5-10 mmol für K_m (bei nicht kooperativen Michaelis Menten fits) [23]. Für die niederaffine Komponente des beobachteten mitochondrialen Leber GSH-Transports sind Werte von ca. 5 nmol/min/mg für v_{\max} und ebenso 5-10 mmol für K_m beschrieben [21; 19]. Die Gründe für die Diskrepanz vor allem des Wertes für v_{\max} sind wohl in den schwierigen experimentellen Bedingungen bei hohen GSH-Konzentrationen zu sehen, hier wurde in anderen Studien über diffusionellen Einstrom bis zum totalen Verlust der Sättigbarkeit der GSH-Aufnahme berichtet [21; 22]. Die in diesem Bereich besonders hohen Varianzen der Glutathionaufnahmemesswerte sprechen ebenfalls für den Einfluß nichtspezifischer Prozesse in diesem Konzentrationsbereich, z. B. unterschiedliche Temperaturen der einzelnen Messungen infolge unvollständiger Durchmischung der Komponenten eines Meßansatzes. Wie bereits erwähnt sind auch unterschiedliche Mengen an mitochondrialem Protein pro Messung eingesetzt worden und zumindest einige Studien haben deutlich mehr mitochondriales Protein pro Messung (4-6 mg) eingesetzt. Der ermittelte Wert für $K_{0,5}$ liegt dagegen näher an beschriebenen Werten und dem

physiologischen Bereich, ist aber ebenso als zu hoch zu beurteilen, daß heißt der Transport ist vermutlich höheraffin und die Halbsättigung tritt schon bei niedrigeren Konzentrationen (physiologischer Bereich 1-10 mM) auf. Denkbar ist außerdem, daß bei Messung der Glutathionaufnahme bei kürzerer Inkubationsdauer (15-20 sec) und höheren Mengen mitochondrialem Protein eine hochaffine Komponente zu identifizieren wäre. Dies zu überprüfen wird Ziel weiterführender Untersuchungen an Rattenhirnmitochondrien sein. Weiterhin wird auch das pharmakologische Profil des neuronalen mitochondrialen Glutathiontransports charakterisiert werden, d.h. die Stimulierbarkeit und Inhibierbarkeit durch verschiedene Substrate der bekannten mitochondrialen Transportsysteme, um so den beobachteten Glutathiontransport besser diesen Systemen zuordnen zu können.

5.4 Antioxidative Protektion gegen durch L-Glutamat verursachten oxidativen Streß

Eine toxische Wirkung von überhöhten, extrazellulären Glutamatkonzentrationen für Neurone ist seit langem bekannt [224]. Es gilt als gesichert, daß dieser Toxizität bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Ischämie und Epilepsie Bedeutung zukommt [125; 225]. Die meist exzitotoxische, d.h. durch Überstimulation von Glutamatrezeptoren, ausgelöste Zellschädigung kann klassischen nekrotischen oder apoptotischen Charakter annehmen [226], aber auch atypische Formen sind beschrieben [227]. Dies hängt unter anderem vom Differenzierungsgrad der betroffenen Neurone, Expressionsniveau und Subtypenkomposition der Rezeptoren ab [228; 229]. Der Vergleich der experimentellen Daten zur toxischen Wirkung von L-Glutamat auf PC 12 Zellen mit Literaturdaten zur Rezeptorvermittelten Glutamatoxizität in neuronalen Zellkulturen zeigt, daß letztere bereits bei um Größenordnungen niedrigeren Glutamatkonzentrationen in wesentlich kürzeren Zeiträumen auftritt [230; 231]. Untersuchungen an PC 12 Zellen bestätigen dagegen millimolares Glutamat als toxische Konzentration für PC 12 Zellen [232]. Die Morphologie von mit L-Glutamat behandelten PC 12 Zellen weist eindeutig auf einen nekrotischen Zelltod hin. Die Elektronenmikroskopie leistet hier natürlich keine quantitative Aussage, so daß ein geringer Anteil von apoptotischem Zelltod unter diesen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings zeigten auch nach der TUNEL-Methode gefärbte L-Glutamat-behandelte Kulturen keinen erhöhten Anteil an Apoptose-typischer DNA-Schädigung. Die Auslösung von Apoptose durch L-DOPA in PC 12 Zellen dagegen wird auch in publizierten Arbeiten beschrieben [233], hinsichtlich des Mechanismus der Apoptoseinduktion vermutet man eine wichtige Rolle der infolge Autooxidation des Catechols entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies [138]. Wiederum bestätigt die morphologische Evaluation durch Elektronenmikroskopie und TUNEL-Färbung die Literaturbefunde, es fanden sich typische Merkmale von apoptotischem Zelltod nach L-DOPA-Inkubation von PC 12 Zellen. Die Relevanz dieser in vitro erhobenen Befunde für die Degeneration dopaminerger, nigraler Neurone im Gehirn von Parkinsonpatienten, deren Haupttherapie ja nach wie vor in der Substitution des Transmitters Dopamin durch dessen Vorstufe L-DOPA besteht, ist freilich umstritten [234; 235; 236; 237; 137].

Sowohl Flupirtin als auch Retigabin vermochten den durch L-Glutamat induzierten Zelltod in PC 12 Zellen nach 72 h nahezu komplett zu unterdrücken. Dies zeigte sich sowohl wenn das Zellüberleben mittels Umsetzung von MTT quantifiziert wurde, als auch bei Auszählung lebender (und toter) Zellen nach Färbung mit Trypanblau. Ein konträres Bild ergab sich bei

Behandlung der Zellen mit L-DOPA: beide Triaminopyridine vermochten den apoptotischen Zelltod nicht aufzuhalten. Es existieren jedoch einige Berichte in der Literatur, in welchen eine anti-apoptotische Wirkung zumindest von Flupirtin beschrieben werden [132; 133; 238]. Es sind jedoch für apoptotische Prozesse die verschiedensten auslösende Stimuli und intrazelluläre molekulare Schritte beschrieben worden, bei dieser Vielzahl und Verschiedenheit solcher Vorgänge ist es durchaus möglich, daß eine Substanz abhängig von Zelltyp und apoptotischen experimentellen Modell unterschiedliche Auswirkungen hat. Unter den bislang beschriebenen anti-apoptotischen Effekten von Flupirtin war kein Modell einer durch L-DOPA ausgelösten Apoptose. Die Wirkung von Flupirtin scheint also vom spezifischen Apoptose-auslösenden Moment abhängig. Da Flupirtin dennoch bei einigen anderen experimentellen Modellen von Apoptose auch mit unterschiedlichen Auslösern protektiv wirkte, liegt es nahe, die Wirkungsweise in den hier und in Literatur beschriebenen [136] antioxidativen Eigenschaften des Moleküls zu vermuten. Allein wenn reaktive Sauerstoffspezies als Signalkomponente Teil eines apoptotischen Programmes sind, kann demnach Flupirtin antiapoptotische Wirkung entfalten. Im Falle der L-DOPA induzierten Apoptose wird reaktiven Sauerstoffspezies, produziert auch durch Autooxidationsprozesse des Catechols eine wichtige Rolle zugeschrieben. Offensichtlich reichen aber 10 µM Flupirtin nicht aus, um dies zu verhindern, auch 100 µM (hier nicht gezeigt) hatten keinerlei Effekt auf den L-DOPA induzierten Zelltod.

Daß Flupirtin und Retigabin antioxidativ wirken können, wird demonstriert durch die Messungen reaktiver Sauerstoffspezies in den behandelten Zellkulturen. Beide Substanzen senkten das basale Niveau von reaktiven Sauerstoffspezies, gemessen an der DCF-Fluoreszenz und beide Moleküle unterdrückten die Oxidation des ABTS-Chromophors im Meßansatz des Monoaminoxidase-assays nach Szutowicz [81], sowohl im Kontrollansatz als auch bei Zugabe von H₂O₂. Während L-Glutamat kaum vermehrt Radikale in PC 12 Zellen erzeugte, resultierte L-DOPA-Behandlung in 2-3-facher Steigerung des Radikalniveaus. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre, daß L-Glutamat durch Blockade der zellulären Cystinaufnahme die zellulären Glutathionspiegel nur langsam kontinuierlich erschöpft, so daß es ähnlich wie bei Blockade der zellulären Glutathionsynthese durch BSO nicht zur erhöhten Generation reaktiver Sauerstoffspezies kommt. Dafür spricht, daß bei Kultivierung von PC 12 Zellen in Cystin-freiem Medium das Ausmaß bzw. der zeitliche Verlauf des Zellverlustes schneller als im Falle von L-Glutamat aber weniger akut als bei L-DOPA-Behandlung eintrat. Offenbar reicht die antioxidative Kapazität von Flupirtin und Retigabin aus, um den vergleichsweise langsamen Zellverlust durch L-Glutamat zu verhindern, jedoch nicht für eine

Abschwächung des massiven von L-DOPA erzeugten oxidativen Streß. Wiederum sind die protektiven Effekte von Flupirtin und Retigabin im Falle des Cystin-Entzugs qualitativ zwischen der vollständigen Schutzwirkung gegen L-Glutamat und keinerlei Schutz gegen L-DOPA-Toxizität einzuordnen, sowohl hinsichtlich des Zellüberlebens als auch der Generation reaktiver Sauerstoffspezies. Zugegebenes H₂O₂ wurde durch beide Substanzen nicht reduziert, gemessen mittels des Fe²⁺/Xylenorange-meßverfahrens.

Mehrere Autoren berichten eine Erhöhung intrazellulärer Glutathionspiegel als Folge einer Behandlung von Zellen mit Flupirtin und sehen darin eine wesentliche Komponente der protektiven Wirkung [133]. In Übereinstimmung mit der postulierten, langsamen Erschöpfung zellulären Glutathions infolge Blockade des Cystin/Glutamat-Austauschers durch L-Glutamat und publizierten Studien an PC 12 Zellen [239; 237] ergaben auch die hier durchgeführten Glutathionmessungen, daß bei L-Glutamatbehandlung der Grad des Glutathionverlustes dem Zelltod vorseilt. Retigabin bewirkte eine geringere, wenngleich signifikante Bewahrung des zellulären Glutathions nach 72 h unter L-Glutamat, während Coinkubation mit Flupirtin keinen Effekt auf die Glutathionspiegel hatte. Dieser Befund läßt eine Interaktion von Flupirtin oder Retigabin mit einem der Enzyme des Glutathionmetabolismus sehr unwahrscheinlich erscheinen. Der geringe Effekt von Retigabin erklärt sich wahrscheinlich eher mit einem Minderverbrauch von Glutathion infolge antioxidativer Wirkung des Triaminopyridins. Der Mechanismus der Schutzwirkung von Flupirtin und Retigabin ist folglich in diesem experimentellen Modell von nicht Rezeptor-vermitteltem, L-Glutamat induzierten, nekrotischen Zelltod als grundsätzlich verschieden von der berichteten antiapoptotischen, Glutathion-erhöhenden Wirkung zu sehen. Perovic et al. führen den Effekt von Flupirtin auf zelluläre Glutathionspiegel auf eine gesteigerte Expression des antiapoptotischen Proto-oncogens *bcl-2* (B-cell-lymphoma) zurück [135], von dem beschrieben ist, daß es zu Veränderungen in der zellulären Glutathionverteilung und Redoxbalance führen kann [240; 241]. Die Überprüfung der *bcl-2* Expression durch Western blot von Flupirtin-behandelten PC 12 Zellextrakten zeigte jedoch keine Veränderung des BCL-2 Expressionsniveaus (Daten nicht gezeigt).

Zwei Komponenten der nicht-Rezeptor-vermittelten Glutamattoxizität sind bis dato charakterisiert worden:

- Durch Konkurrenz am plasmamembranständigen Glutamat-Cystin Austauscher unterdrückt überschüssiges Glutamat die zelluläre Versorgung mit Cystin. Da Cystein die limitierende Aminosäure für die Glutathionsynthese ist, führt dies auf lange Sicht zur

Glutathionverknappung und Oxidation von Thiolgruppen, Schädigung von Proteinkonformationen, Generation reaktiver Sauerstoffspezies und Zelltod [124; 237].

- Maher und Davis konnten außerdem zeigen, daß exzessive Aktivität des Enzyms Monoaminoxidase und anderer Oxidasen durch gesteigerte Entstehung des Reaktionsprodukts H_2O_2 zum oxidativen Glutamat-induzierten Zelltod beiträgt [139].

Die im folgenden diskutierten Experimente hatten die Aufklärung eines (vermeintlichen) Beitrages dieser beiden Mechanismen am hier untersuchten nicht-Rezeptor-vermittelten Glutamat-induzierten Zelltod in PC 12 Kulturen zum Ziel.

Flupirtin wie Retigabin konnten den Zelltod bei kompletten Entzug von L-Cystin aufhalten, wenn auch keine weitere Proliferation ermöglichen. Dieser antioxidative Effekt ist logischerweise unabhängig von der zellulären Cystinaufnahme, da er auch bei völligem Fehlen von L-Cystin im Kulturmedium auftritt und steht somit im Einklang mit dem Fehlen eines Effektes beider Substanzen auf die zellulären Glutathionspiegel. Wurde jedoch zusätzlich zum Cystin-Entzug L-Glutamat in das Kulturmedium gegeben, so verschwand auch der Rest der protektiven Wirkung von Flupirtin und Retigabin. Dies bedeutet, daß L-Glutamat neben der Blockade des Cystin-Imports noch mindestens eine weitere zellschädigende Wirkung ausübt, gegen welche die antioxidative Kapazität beider Triaminopyridine unter Bedingungen von Cystinmangel nicht mehr ausreicht.

Die Experimente mit Monoaminoxidase(MAO)-inhibitoren belegen, daß exzessive Aktivität dieses Enzyms vermutlich diese zweite Komponente der Glutamatoxizität darstellt. Clorgylin, der spezifische Inhibitor für die MAO-Isoform, welche in PC 12 Zellen exprimiert ist, vermochte den L-Glutamat-induzierten Zelltod zu verhindern, jedoch keine weitere Proliferation zu ermöglichen. Dieser Befund ist quantitativ sehr ähnlich dem Effekt von Flupirtin und Retigabin bei Cystin-Entzug der Zellkultur, d.h. von den beiden Mechanismen, die zur Generierung von oxidativem Streß beitragen, Cystinmangel und MAO-Aktivität, wird jeweils nur ein Teil durch Flupirtin oder Clorgylin gehemmt. Flupirtin und Retigabin wirken unspezifisch antioxidativ und nicht speziell auf den Cystintransport oder MAO-Aktivität und können deshalb die Toxizität von L-Glutamat völlig und die Auswirkungen von Cystinentzug partiell verhindern, sind aber ohne Effekt gegen die Kombination beider Insulte. Clorgylin dagegen verfügt über keinerlei antioxidative Wirkung, im Gegensatz zu Flupirtin und Retigabin reduziert es nicht das ABTS-Radikalkation im Kontrollansatz dieses Assays (Abbildung 4-37). In einer Konzentration von 100 μ M vermag es die Glutamatoxizität oder Cystinentzug (d.h. die MAO-Komponente dieser beiden Insulte) partiell abzuschwächen, ist aber ebenso ohne Wirkung gegen die Kombination. Die MAO-Aktivitätsbestimmungen

demonstrieren wiederum, daß Flupirtin und Retigabin keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms ausüben (nach dem Fe^{2+} Xylenolorange-Meßverfahren, siehe Abbildung 4-38) und exogen zugebenes H_2O_2 nicht reduzieren bzw. inaktivieren.

Unter der Annahme, daß Clorgylin neben der MAO-Inhibition keine weitere antioxidative Wirkung ausübt, muß man aus der partiellen Schutzwirkung dieser Substanz gegen Cystinentzug folgern, daß überschießende MAO-Aktivität auch in diesem Szenario ein Faktor in der toxischen Wirkung ist. Eine Hypothese, wie diese Aktivierung, z.B. über Streßsensor-mechanismen der Zelle, zustande kommt, existiert bislang nicht. Maher und Davis konnten lediglich Belege anführen, daß bei oxidativer Glutamatoxizität auch andere Peroxidasen und nicht nur MAO ausschließlich eine Rolle spielen [139].

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß Flupirtin und Retigabin in 10 μM Konzentration einen antioxidativen und daher protektiven Effekt auf die nicht-Rezeptor vermittelte, oxidative L-Glutamat-toxizität ausüben. Durch vollständigen Entzug von Cystin und folgende Glutamatzugabe konnte diese protektive Wirkung schrittweise unterbunden werden. Das Ausmaß der protektiven Wirkung des MAO(B)-Inhibitors Clorgylin (100 μM) war in allen getesteten Toxizitäts-paradigmen sehr ähnlich der von Flupirtin und Retigabin. Da beide Triaminopyridine keine MAO-inhibitorische und auch keine H_2O_2 -deaktivierende Wirkung (nach dem Fe/Xylenolorange-Assay) besitzen, könnte man spekulieren, daß die MAO-Überaktivität, deren Hauptprodukt H_2O_2 ist, eine Folge eines vorhergehenden Stimulus von anderen reaktiven Sauerstoffspezies darstellt, welche durch Flupirtin oder Retigabin blockiert werden können. Diese antioxidative Kapazität ist aber als eher gering anzusehen, da beide Substanzen nicht gegen L-DOPA (250 μM)-Toxizität schützen, wo reaktive Sauerstoffspezies zweifellos ein zentrales Ereignis der Schadenskaskade sind.

Im Gegensatz zu Flupirtin sind für das Deazaderivat Retigabin bislang keine antioxidativen, protektiven Wirkungen in Neurodegenerationsmodellen beschrieben worden. Bekannt sind anti-epileptische [242] und anti-krampflösende [243] Wirkungen, kürzlich wurde in vitro ein spannungsgesteuerter Kaliumkanal (KCNQ2/KCNQ3) als molekularer Interaktionspartner identifiziert [130]. Auch in PC 12 Zellen, allerdings ausschließlich im postmitotischen, differenzierten Stadium, aktiviert Retigabin einen Kaliumstrom [244], so daß interessant wäre, die protektive Wirkung von Retigabin in undifferenzierten PC 12 Zellen, wie hier gezeigt und solchen im differenzierten Status zu vergleichen, um Erkenntnisse über ein mögliches Zusammenspiel beider Effekte zu gewinnen. Diese Idee speist sich aus Daten zur NMDA-Rezeptor antagonistischen Wirkung von Flupirtin, die ebenfalls mit Kaliumströmen in Verbindungen gebracht werden [245]. Vorversuche zeigten allerdings, daß PC 12 Zellen in

differenziertem Zustand weniger empfindlich gegenüber exogenem L-Glutamat sind, also vermutlich unter neuronaler Differenzierung keine NMDA-Rezeptoren exprimieren.

5.5 Fazit und Ausblick

Die dargestellten Experimente zeigen, daß:

- dem in Mitochondrien kompartimentierten Glutathion eine Schlüsselstellung bei der Verteidigung der Zelle gegen vornehmlich mitochondrial entstehende reaktive Sauerstoffspezies zukommt. Demgegenüber bedeutet eine Verminderung cytosolischen Glutathions alleine noch keinen akuten oxidativen Streß. Da oxidative Schädigung von Mitochondrien ein häufiges Merkmal pathologischer und altersabhängiger neurodegenerativer Prozesse ist, ergibt sich hier ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt, auch unabhängig von der Ursache einer Pathologie. Beispielsweise zeigen erste Versuche mit Antioxidantien, welche chemisch an ein lipophiles Triphenylphosphoniumkation (TPP^+) gekoppelt sind und deshalb spezifisch von Mitochondrien akkumuliert werden können, eine gute Wirksamkeit gegen oxidativen Streß [246; 247].
- eine Glutathiondepletion nur bei langfristiger und sehr hoch dosierter Anwendung von Komplex I-Inhibitoren zu beobachten ist, wenn oxidativer Streß bereits sekundär als Folge eines Energiemangels oder von Nebeneffekten der Komplex I-Inhibitoren eintritt. Umgekehrt stellt eine Verringerung der Funktion des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette eine frühe Folge von mitochondrialem oxidativen Streß oder Verknappung von Antioxidantien dar. Eingedenk des frühen Glutathionverlustes und des Fehlens einer genetischen Ursache der Komplex I-Dysfunktion in der Substantia nigra von Parkinsonpatienten, scheint hier die Idee einer therapeutischen Erhöhung insbesondere mitochondrialer Antioxidantien die Möglichkeit zu bieten, auch die Komplex I-Dysfunktion zu verhindern.
- neuronale Mitochondrien konzentrationsabhängig und sättigbar Glutathion aufnehmen können. Die Analyse des Transportverhaltens und von Literaturbefunden legt den Schluß nahe, daß dieser Vorgang nicht auf ein einziges, spezifisches Transportprotein zurückgeht, sondern das Ergebnis mehrerer (möglicherweise multifunktionaler) Transportsysteme ist. Da diese bekannten Transportsysteme wichtige Metaboliten des mitochondrialen Energiestoffwechsels translozieren, ist anzunehmen, daß eine Minder- oder Fehlfunktion eines dieser Transportsysteme oder auch ein Ungleichgewicht der simultan transportierten Moleküle eine Störung der mitochondrialen Glutathionhomöostase hervorrufen können. Bei der Empfindlichkeit von Neuronen gegenüber (mitochondrialem) Energiemangel und oxidativem Streß ist es vorstellbar, gleichwohl schwer *in vivo* nachzuweisen, daß dieser

Zelltyp erstes Opfer von degenerativen Auswirkungen eines solchen Defektes der mitochondrialen Transportsysteme ist.

- antioxidativ wirksame Substanzen auch in nichtstöchiometrischen Mengen protektiv gegen ein Neurotoxin sein können, wenn eine geringe Menge reaktiver Sauerstoffspezies in einem frühen Stadium der Degeneration eine weiterleitende oder verstärkende Komponente bildet; im hier untersuchten Modell könnte dies die Aktivierung von Monoaminoxidase nach Blockade des zellulären Cystintransports sein. Dies ist insbesondere relevant, wenn eine schwache, antioxidative Wirkung nicht der einzige oder hauptsächliche Effekt eines Pharmakons wie bei Flupirtin und Retigabin ist und so auch bei chronischer, niedriger Applikation eine schützende oder vorbeugende Wirkung haben kann.

6 Literaturverzeichnis

- [1] de Rey Pailhade. Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre á froid. C. R. Acad. Sci. 1888; 106: 1683-1684.
- [2] Hopkins FG. On glutathione: a reinvestigation. J Biol Chem. 1929; 84: 269-320.
- [3] Meister A. On the discovery of glutathione. Trends Biochem Sci. 1988; 13 (5): 185-188.
- [4] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem. 1988; 263 (33): 17205-17208.
- [5] Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. J Neurochem. 1999; 73 (3): 889-902.
- [6] Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 1983; (52): 711-760.
- [7] Griffith OW, Meister A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound gamma- glutamyl transpeptidase as a discrete step in the gamma-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979; 76 (1): 268-272.
- [8] Schulman JD, Goodman SI, Mace JW, Patrick AD, Tietze F, Butler EJ. Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of gamma-glutamyl transpeptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975; 65 (1): 68-74.
- [9] Meister A. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. Methods Enzymol. 1985; 113 571-585.

- [10] Prchal J, Srivastava SK, Beutler E. Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts. *Blood*. 1975; 46 (1): 111-117.
- [11] Reddy VN. Glutathione and its function in the lens--an overview. *Exp. Eye Res.* 1990; 50 (6): 771-778.
- [12] Sies H, Bartoli GM, Burk RF, Waydhas C. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency. *Eur. J Biochem.* 1978; 89 (1): 113-118.
- [13] Yi JR, Lu S, Fernandez-Checa J, Kaplowitz N. Expression cloning of a rat hepatic reduced glutathione transporter with canalicular characteristics. *J. Clin. Invest.* 1994; 93 (4): 1841-1845.
- [14] Yi JR, Lu S, Fernandez-Checa J, Kaplowitz N. Expression cloning of the cDNA for a polypeptide associated with rat hepatic sinusoidal reduced glutathione transport: characteristics and comparison with the canalicular transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92 (5): 1495-1499.
- [15] Kannan R, Chakrabarti R, Tang D, Kim KJ, Kaplowitz N. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res.* 2000; 852 (2): 374-382.
- [16] Kannan R, Yi JR, Zlokovic BV, Kaplowitz N. Molecular characterization of a reduced glutathione transporter in the lens. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36 (9): 1785-1792.
- [17] Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 1982; 257 (7): 3747-3753.
- [18] Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82 (14): 4668-72.

- [19] Colell A, Garcia-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodes J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology*. 1997; 26 (3): 699-708.
- [20] Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A, Rodes J, Yi JR, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. Expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (27): 15946-15949.
- [21] Martensson J, Lai JC, Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87 (18): 7185-7189.
- [22] Schnellmann RG. Renal mitochondrial glutathione transport. *Life Sci.* 1991; 49 (5): 393-398.
- [23] Chen Z, Lash LH. Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 285 (2): 608-618.
- [24] Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJ. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* 1994; 62 (1): 45-53.
- [25] Huang J, Philbert MA. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* 1995; 680 (1-2): 16-22.
- [26] Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000; 62 (6): 649-671.

- [27] Zhang F, Dryhurst G. Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med. Chem.* 1994; 37 (8): 1084-1098.
- [28] Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 1980; 191 (2): 421-427.
- [29] Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 738 (8): 8-14.
- [30] Valentine, J.S. (1979) The chemical reactivity of superoxide anion in aprotic versus protic media: a review. In W.S. Caughey (Ed.), *Biochemical and clinical aspects of oxygen*, Academic Press, New York, pp. 659-697.
- [31] Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992; 307 (1): 108-112.
- [32] Fee, J.A. and Valentine, J.S. (1977) Chemical and physical properties of superoxide. In A.M. Michelson, J.M. McCord and I. Fridovich (Eds.), *Superoxide and superoxide dismutases*, Academic press, New York, pp. 19-60.
- [33] Chevion M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic. Biol. Med.* 1988; 5 (1): 27-37.
- [34] Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Med.* 1995; 27 (3): 369-377.
- [35] Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell.* 1994; 78 (6): 919-925.
- [36] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87 (4): 1620-1624.

- [37] Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 1995; 38 (3): 3566-3573.
- [38] Polidori MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci. Lett.* 1999; 272 (1): 53-56.
- [39] Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 1999; 9 (1): 147-163.
- [40] Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkowicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD. Cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology.* 1999; 52 (5): 1104-1105.
- [41] Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann. Neurol.* 1992; 32 82-87.
- [42] Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol.* 1994; 36 (6): 876-81.
- [43] Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science.* 2000; 290 (5493): 985-989.
- [44] Yamashita T, Ando Y, Obayashi K, Terazaki H, Sakashita N, Uchida K, Ohama E, Ando M, Uchino M. Oxidative injury is present in Purkinje cells in patients with olivopontocerebellar atrophy. *J. Neurol. Sci.* 2000; 175 (2): 107-110.

- [45] Schulz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Burk K, Matson W, Dichgans J, Beal MF, Bogdanov MB. Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology*. 2000; 55 (11): 1719-1721.
- [46] Gordon N. Friedreich's ataxia and iron metabolism. *Brain Dev*. 2000; 22 (8): 465-468.
- [47] Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol*. 1994; 36 (3): 348-355.
- [48] Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*. 1994; 35 (1): 38-44.
- [49] Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990; 54 (3): 823-827.
- [50] Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Jr., Davis RE, Parker WD, Jr. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 1996; 40 (4): 663-671.
- [51] Swerdlow RH, Parks JK, Davis JN, Cassarino DS, Trimmer PA, Currie LJ, Dougherty J, Bridges WS, Bennett JP, Jr., Wooten GF, Parker WD. Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family. *Ann. Neurol*. 1998; 44 (6): 873-881.
- [52] Zarepari S, Kaye J, Camicioli R, Kramer P, Nutt J, Bird T, Litt M, Payami H, Kay J. Analysis of the alpha-synuclein G209A mutation in familial Parkinson's disease [letter] [published erratum appears in *Lancet* 1998 Mar 7;351(9104):760]. *Lancet*. 1998; 351 (9095): 37-38.

- [53] Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. 2000; 404 (6776): 394-398.
- [54] Johns DR. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333 (10): 638-644.
- [55] Sastre J, Millan A, Garcia dIA, Pla R, Juan G, Pallardo, O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Vina J. A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24 (2): 298-304.
- [56] de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 1996; 10 (2): 333-338.
- [57] Suter M, Richter C. Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry.* 1999; 38 (1): 459-464.
- [58] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91 (23): 10771-10778.
- [59] Wüllner U, Löschmann PA, Schulz JB, Schmid A, Dringen R, Eblen F, Turski L, Klockgether T. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP⁺ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport.* 1996; 7 (4): 921-923.
- [60] Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 1993; 34 (4): 609-616.
- [61] Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267 (16): 4904-4911.
- [62] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996; 273 (5271): 59-63.

- [63] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976; 73 (7): 2424-2428.
- [64] Althaus JS, Decker DE, Von Voigtlander PF, Buxser SE. Effects of dopamine agonists on dopamine secretion from PC12 cells: lack of functional autoreceptor activity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1991; 72 (2): 131-42.
- [65] Courtney ND, Howlett AC, Westfall TC. Dopaminergic regulation of dopamine release from PC12 cells via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Neurosci Lett.* 1991; 122 (2): 261-4.
- [66] Kittner B, Brautigam M, Herken H. PC12 cells: a model system for studying drug effects on dopamine synthesis and release. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1987; 286 (2): 181-94.
- [67] Weatherspoon JK, Werling LL. Modulation of amphetamine-stimulated [3H]dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells by sigma type 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289 (1): 278-84.
- [68] Zhu WH, Conforti L, Millhorn DE. Expression of dopamine D2 receptor in PC-12 cells and regulation of membrane conductances by dopamine. *Am J Physiol.* 1997; 273 (4 Pt 1): 1143-50.
- [69] Pan Z, Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J. Neurochem.* 1993; 61 (5): 1713-1721.
- [70] Wullner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Loschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 1999; 826 (1): 53-62.

- [71] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5 (2): 227-31.
- [72] Hom DG, Jiang D, Hong EJ, Mo JQ, Andersen JK. Elevated expression of glutathione peroxidase in PC12 cells results in protection against methamphetamine but not MPTP toxicity. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 46 (1-2): 154-160.
- [73] Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris).* 1998; 56 (3): 305-19.
- [74] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969; 27 (3): 502-22.
- [75] Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* 1990; 190 (2): 360-365.
- [76] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193 265-275.
- [77] Srere PA. Citrate Synthase. *Methods Enzymol.* 1969; 13 3-18.
- [78] Estornell E, Fato R, Pallotti F, Lenaz G. Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett.* 1993; 332 (1-2): 127-31.
- [79] Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1994; 63 (6): 2179-2184.
- [80] Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 1990; 268 (1): 69-71.

- [81] Szutowicz A, Kobes RD, Orsulak PJ. Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Anal Biochem.* 1984; 138 (1): 86-94.
- [82] Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995; 260:406-17. 406-417.
- [83] Wüllner U, Weller M, Groscurth P, Loschmann PA, Schulz JB, Müller I, Klockgether T. Evidence for an active type of cell death with ultrastructural features distinct from apoptosis: the effects of 3-acetylpyridine neurotoxicity. *Neuroscience.* 1997; 81 (3): 721-734.
- [84] Colbeau A, Nachbaur J, Vignais PM. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1971; 249 (2): 462-492.
- [85] Moreadith RW, Fiskum G. Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. *Anal. Biochem.* 1984; 137 360-367.
- [86] Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1021 (2): 217-226.
- [87] Schnaitman C, Erwin VG, Greenawalt JW. The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 1967; 32 (3): 719-735.
- [88] Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, Zierz S. Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28 (2): 164-169.
- [89] Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K. The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the

- mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol. Cell Biochem.* 1994; 133-134 85-104.
- [90] Bonisch H. Transport and drug binding kinetics in membrane vesicle preparation. *Methods Enzymol.* 1998; 296 259-278.
- [91] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1970; 245 (18): 4724-4731.
- [92] Basford RE. Preparation and properties of brain mitochondria. *Methods Enzymol.* 1967; 10 96-101.
- [93] Brooks DB, Norris-Jones R. Preparation and analysis of two-phase systems. *Methods Enzymol.* 1994; 228 14-27.
- [94] Lopez-Perez MJ. Preparation of synaptosomes and mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol.* 1994; 228 403-411.
- [95] Coakley WT. Comparison of conditions of tissue fragmentation. *Brain Res.* 1974; 19;70 (2): 281-284.
- [96] Hajos F, Tapia R, Wilkin G, Johnson AL, Balazs R. Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. I. Preservation of large fragments of the cerebellar glomeruli. *Brain Res.* 1974; 19;70 (2): 261-279.
- [97] Laterveer FD, Gellerich FN, Nicolay K. Macromolecules increase the channeling of ADP from externally associated hexokinase to the matrix of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1995; 232 (2): 569-577.
- [98] Gellerich FN, Laterveer FD, Korzeniewski B, Zierz S, Nicolay K. Dextran strongly increases the Michaelis constants of oxidative phosphorylation and of mitochondrial creatine kinase in heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1998; 254 (1): 172-180.

- [99] Klingenberg M. Overview of mitochondrial metabolite transport systems. *Methods Enzymol.* 1979; 56 245-252.
- [100] Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* 1979; 254 (16): 7558-7560.
- [101] Dirr HW, Schabort JC. Purification and partial characterization of the glutathione S-transferase of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988; 957 (2): 173-177.
- [102] Tew KD, Bomber AM, Hoffman SJ. Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48 (13): 3622-3625.
- [103] Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 1975; 250 (4): 1422-1426.
- [104] Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (24): 14683-14689.
- [105] Mulcahy RT, Gipp JJ. Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 209 (1): 227-233.
- [106] Soldner F, Weller M, Haid S, Beinroth S, Miller SW, U Wl, Davis RE, Dichgans J, Klockgether T, Schulz JB. MPP⁺ Inhibits Proliferation of PC12 Cells by a p21(WAF1/Cip1)-Dependent Pathway and Induces Cell Death in Cells Lacking p21(WAF1/Cip1). *Exp Cell Res.* 1999; 250 (1): 75-85.

- [107] Kang D, Miyako K, Kuribayashi F, Hasegawa E, Mitsumoto A, Nagano T, Takeshige K. Changes of energy metabolism induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-related compounds in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 337 (1): 75-80.
- [108] Greenamyre JT, Higgins DS, Eller RV. Quantitative autoradiography of dihydrorotenone binding to complex I of the electron transport chain. *J Neurochem.* 1992; 59 (2): 746-9.
- [109] Grivennikova VG, Maklashina EO, Gavrikova EV, Vinogradov AD. Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1319 (2-3): 223-32.
- [110] Le-Quoc K, Le-Quoc D. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J. Biol. Chem.* 1985; 260 (12): 7422-7428.
- [111] Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJ, Andersen JK. Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity: implications for Parkinsons disease. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (34): 26096-26101.
- [112] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11 (2): 226-232.
- [113] Mercurio F, Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene.* 1999; 18 (45): 6163-6171.
- [114] Lezoualc'h F, Behl C. Transcription factor NF-kappaB: friend or foe of neurons? *Mol. Psychiatry.* 1998; 3 (1): 15-20.
- [115] Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic

- neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94 (14): 7531-7536.
- [116] Galter D, Mihm S, Droge W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur J Biochem.* 1994; 221 (2): 639-648.
- [117] Gius D, Botero A, Shah S, Curry HA. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicol. Lett.* 1999; 106 (2-3): 93-106.
- [118] Romero FJ, Sies H. Subcellular glutathione contents in isolated hepatocytes treated with L-buthionine sulfoximine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123 (3): 1116-1121.
- [119] Schnellmann RG, Gilchrist SM, Mandel LJ. Intracellular distribution and depletion of glutathione in rabbit renal proximal tubules. *Kidney Int.* 1988; 34 (2): 229-233.
- [120] Huster D, Hjelle OP, Haug FM, Nagelhus EA, Reichelt W, Ottersen OP. Subcellular compartmentation of glutathione and glutathione precursors. A high resolution immunogold analysis of the outer retina of guinea pig. *Anat. Embryol. (Berl).* 1998; 198 (4): 277-287.
- [121] Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 1990; 55 (6): 2091-2097.
- [122] Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1980; 255 (6): 2372-2376.
- [123] Bannai S, Tateishi N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr. Biol.* 1986; 89 (1): 1-8.

- [124] Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*. 1989; 2 (6): 1547-58.
- [125] Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988; 1 (8): 623-34.
- [126] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330 (9): 613-622.
- [127] Friedel HA, Fitton A. Flupirtine. A review of its pharmacological properties, and therapeutic efficacy in pain states. *Drugs*. 1993; 45 (4): 548-69.
- [128] Wickenden AD, Yu W, Zou A, Jegla T, Wagoner PK. Retigabine, A Novel Anti-Convulsant, Enhances Activation of KCNQ2/Q3 Potassium Channels. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58 (3): 591-600.
- [129] Main MJ, Cryan JE, Dupere JR, Cox B, Clare JJ, Burbidge SA. Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58 (2): 253-262.
- [130] Rundfeldt C, Netzer R. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci. Lett.* 2000; 282 (1-2): 73-76.
- [131] Block F, Pergande G, Schwarz M. Flupirtine reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res.* 1997; 754 (1-2): 279-84.
- [132] Lorenz B, Schluter T, Bohnensack R, Pergande G, Muller WE. Effect of flupirtine on cell death of human umbilical vein endothelial cells induced by reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56 (12): 1615-24.

- [133] Muller WE, Romero FJ, Perovic S, Pergande G, Pialoglou P. Protection of flupirtine on beta-amyloid-induced apoptosis in neuronal cells in vitro: prevention of amyloid-induced glutathione depletion. *J Neurochem.* 1997; 68 (6): 2371-7.
- [134] Rupalla K, Cao W, Krieglstein J. Flupirtine protects neurons against excitotoxic or ischemic damage and inhibits the increase in cytosolic Ca²⁺ concentration. *Eur J Pharmacol.* 1995; 294 (2-3): 469-73.
- [135] Perovic S, Schroder HC, Pergande G, Ushijima H, Muller WE. Effect of flupirtine on Bcl-2 and glutathione level in neuronal cells treated in vitro with the prion protein fragment (PrP106-126). *Exp Neurol.* 1997; 147 (2): 518-24.
- [136] Gassen M, Pergande G, Youdim MB. Antioxidant properties of the triaminopyridine, flupirtine. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56 (10): 1323-9.
- [137] Schubert D, Kimura H, Maher P. Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89 (17): 8264-7.
- [138] Basma AN, Morris EJ, Nicklas WJ, Geller HM. L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J Neurochem.* 1995; 64 (2): 825-832.
- [139] Maher P, Davis JB. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci.* 1996; 16 (20): 6394-401.
- [140] Denney RM, Fritz RR, Patel NT, Abell CW. Human liver MAO-A and MAO-B separated by immunoaffinity chromatography with MAO-B-specific monoclonal antibody. *Science.* 1982; 215 (4538): 1400-3.
- [141] White HL, Glassman AT. Multiple binding sites of human brain and liver monoamine oxidase: substrate specificities, selective inhibitions, and attempts to separate enzyme forms. *J Neurochem.* 1977; 29 (6): 987-97.

- [142] Naoi M, Suzuki H, Takahashi T, Shibahara K, Nagatsu T. Ganglioside GM1 causes expression of type B monoamine oxidase in a rat clonal pheochromocytoma cell line, PC12h. *J Neurochem.* 1987; 49 (5): 1602-5.
- [143] Youdim MB, Heldman E, Pollard HB, Fleming P, McHugh E. Contrasting monoamine oxidase activity and tyramine induced catecholamine release in PC12 and chromaffin cells. *Neuroscience.* 1986; 19 (4): 1311-8.
- [144] Basma AN, Heikkila RE, Nicklas WJ, Giovanni A, Geller HM. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced toxicity in PC12 cells: role of monoamine oxidase A. *J Neurochem.* 1990; 55 (3): 870-7.
- [145] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26 (9-10): 1231-7.
- [146] Huang J, Philbert MA. Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* 1996; 711 (1-2): 184-92.
- [147] Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Zhang J, Fariss MW. Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem. Biol. Interact.* 2000; 127 (3): 201-217.
- [148] Gupta A, Gupta A, Datta M, Shukla GS. Cerebral antioxidant status and free radical generation following glutathione depletion and subsequent recovery. *Mol. Cell Biochem.* 2000; 209 (1-2): 55-61.
- [149] Gerard-Monnier D, Fougeat S, Chaudiere J. Glutathione and cysteine depletion in rats and mice following acute intoxication with diethylmaleate. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 43 (3): 451-456.

- [150] Hoffman DW, Wiebkin P, Rybak LP. Inhibition of glutathione-related enzymes and cytotoxicity of ethacrynic acid and cyclosporine. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49 (3): 411-415.
- [151] Ploemen JH, van Ommen B, van Bladeren PJ. Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 40 (7): 1631-1635.
- [152] Manuel MA, Weiner MW. Effects of ethacrynic acid and furosemide on phosphorylation reactions of kidney mitochondria. Inhibition of the adenine nucleotide translocase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 460 (3): 445-454.
- [153] Inoue M, Uriu T, Otani H, Hara M, Omori K, Inagaki C. Intracerebroventricular injection of ethacrynic acid induces status epilepticus. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 166 (1): 101-106.
- [154] Inoue M, Hirose T, Fukai Y, Zeng XT, Yasukura T, Ohnishi S, Uriu T, Inagaki C. Ethacrynic acid-induced convulsions and brain noradrenaline in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 179 (1-2): 221-223.
- [155] Yanase M, Orita Y, Fukuhara Y, Okada N, Ando A, Abe H. Effect of ethacrynic acid on mitochondrial electron transport system and oxidative phosphorylation. *Arzneimittelforschung.* 1983; 33 (1): 120-124.
- [156] Soltys BJ, Gupta RS. Changes in mitochondrial shape and distribution induced by ethacrynic acid and the transient formation of a mitochondrial reticulum. *J. Cell Physiol.* 1994; 159 (2): 281-294.
- [157] Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂.-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 184 (1-2): 21-33.

- [158] Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27 (9-10): 922-935.
- [159] de Rijk MC, Breteler MM, den Breeijen JH, Launer LJ, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study. *Arch Neurol.* 1997; 54 (6): 762-5.
- [160] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood.* 1999; 93 (1): 268-277.
- [161] Dorr RT, Liddil JD, Soble MJ. Cytotoxic effects of glutathione synthesis inhibition by L-buthionine-(SR)-sulfoximine on human and murine tumor cells. *Invest New Drugs.* 1986; 4 (4): 305-313.
- [162] Reber U, Wullner U, Trepel M, Baumgart J, Seyfried J, Klockgether T, Dichgans J, Weller M. Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine sulfoximine in human malignant glioma cells: the role of bcl- 2. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55 (3): 349-59.
- [163] Dierickx PJ. Long-term buthionine-sulfoximine-mediated toxicity in cultured hepatoma cell lines. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1990; 67 (3): 423-426.
- [164] Bailey HH. L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 111-112:239-54 239-254.
- [165] Siemann DW, Beyers KL. In vivo therapeutic potential of combination thiol depletion and alkylating chemotherapy. *Br. J. Cancer.* 1993; 68 (6): 1071-1079.
- [166] Wan XS, St.Clair DK. Differential cytotoxicity of buthionine sulfoximine to "normal" and transformed human lung fibroblast cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1993; 33 (3): 210-214.

- [167] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92 (16): 1295-1302.
- [168] Sagara JI, Miura K, Bannai S. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 1993; 61 (5): 1672-1676.
- [169] Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* 1999; 19 (2): 562-569.
- [170] Griffith OW, Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76 (11): 5606-10.
- [171] Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; 88 (5): 1913-1917.
- [172] Andersen JK, Mo JQ, Hom DG, Lee FY, Harnish P, Hamill RW, McNeill TH. Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *Journal of Neurochemistry.* 1996; 67 (5): 2164-2171.
- [173] Toffa S, Kunikowska GM, Zeng BY, Jenner P, Marsden CD. Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J. Neural Transm.* 1997; 104 (1): 67-75.
- [174] Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1994; 36 (3): 356-61.
- [175] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983; 219 (4587): 979-980.

- [176] Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*. 1984; 311 (5985): 464-467.
- [177] Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci. Lett*. 1987; 75 (3): 323-328.
- [178] Schinelli S, Zuddas A, Kopin IJ, Barker JL, di Porzio U. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J. Neurochem*. 1988; 50 (6): 1900-1907.
- [179] Ramsay RR, Salach JJ, Singer TP. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1986; 134 (2): 743-748.
- [180] Yoshino H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T, Mizuno Y. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1992; 4 (1): 27-34.
- [181] Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res*. 1997; 777 (1-2): 110-8.
- [182] Michel PP, Dandapani BK, Knusel B, Sanchez-Ramos J, Hefti F. Toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium for rat dopaminergic neurons in culture: selectivity and irreversibility. *J. Neurochem*. 1990; 54 (4): 1102-1109.
- [183] Sanchez-Ramos JR, Michel P, Weiner WJ, Hefti F. Selective destruction of cultured dopaminergic neurons from fetal rat mesencephalon by 1-methyl-4-phenylpyridinium: cytochemical and morphological evidence. *J. Neurochem*. 1988; 50 (6): 1934-1944.

- [184] Mochizuki H, Nakamura N, Nishi K, Mizuno Y. Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in ventral mesencephalic-striatal cp-culture in rat. *Neuroscience Letters*. 1994; 170 191-194.
- [185] Itano Y, Kitamura Y, Nomura Y. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced cell death in PC12 cells: inhibitory effects of several drugs. *Neurochem Int*. 1994; 25 (5): 419-24.
- [186] Marongiu ME, Piccardi MP, Bernardi F, Corsini GU, Del Zompo M. Evaluation of the toxicity of the dopaminergic neurotoxins MPTP and MPP⁺ in PC12 pheochromocytoma cells: binding and biological studies. *Neurosci Lett*. 1988; 94 (3): 349-54.
- [187] Denton T, Howard BD. A dopaminergic cell line variant resistant to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem*. 1987; 49 (2): 622-30.
- [188] Andersen JK, Zhang MB, Zhong XH, Rozenberg YY, Howard BD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-resistant, flat-cell PC12 variants having a partial loss of transformed phenotype. *J Neurochem*. 1990; 55 (2): 559-67.
- [189] 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; 63 (5): 1987-90.
- [190] Gluck MR, Youngster SK, Ramsay RR, Singer TP, Nicklas WJ. Studies on the characterization of the inhibitory mechanism of 4'-alkylated 1-methyl-4-phenylpyridinium and phenylpyridine analogues in mitochondria and electron transport particles. *J. Neurochem*. 1994; 63 (2): 655-661.
- [191] Adams Jr JD, Klaidman LK, Leung AC. MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1993; 15 (2): 181-6.

- [192] Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Minakami S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170 (3): 1049-1055.
- [193] Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem.* 1992; 58 (2): 786-789.
- [194] Esposti MD, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S. Bcl-2 and Mitochondrial Oxygen Radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J Biol Chem.* 1999; 274 (42): 29831-29837.
- [195] Bates TE, Heales SJ, Davies SE, Boakye P, Clark JB. Effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium on isolated rat brain mitochondria: evidence for a primary involvement of energy depletion. *J Neurochem.* 1994; 63 (2): 640-8.
- [196] Hasegawa E, Asagami H, Kang D, Minakami S, Takeshige K. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) inhibits mitochondrial oxygen consumption mediated by succinate as well as malate in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 35 (2): 409-413.
- [197] Nakamura K, Bindokas VP, Marks JD, Wright DA, Frim DM, Miller RJ, Kang UJ. The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58 (2): 271-278.
- [198] Mizuno Y, Saitoh T, Sone N. Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 143 (3): 971-6.
- [199] Cassarino DS, Parks JK, Parker WD, Jr., Bennett JP, Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c

- in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1453 (1): 49-62.
- [200] Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 1984; 311 (5985): 467-469.
- [201] Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*. 1984; 225 (4669): 1480-1482.
- [202] Lotharius J, O'Malley KL. The Parkinsonism-inducing Drug 1-Methyl-4-phenylpyridinium Triggers Intracellular Dopamine Oxidation. A NOVEL MECHANISM OF TOXICITY. *J. Biol. Chem*. 2000; 275 (49): 38581-38588.
- [203] 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; 3 (12): 1301-1306.
- [204] Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem*. 1996; 66 (2): 501-510.
- [205] Desole MS, Miele M, Esposito G, Fresu LG, Migheli R, Zangani D, Sircana S, Grella G, Miele E. Neuronal antioxidant system and MPTP-induced oxidative stress in the striatum and brain stem of the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995; 51 (4): 581-592.
- [206] Bhave SV, Johannessen JN, Lash LH, Wakade TD, Wakade AR. Age-dependent sensitivity of cultured peripheral sympathetic neurons to 1-methyl-4-phenylpyridinium: role of glutathione. *J Neurochem*. 1996; 67 (2): 557-565.
- [207] Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*. 2000; 21 (4): 435-440.

- [208] Ritz B, Yu F. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int. J. Epidemiol.* 2000; 29 (2): 323-329.
- [209] Lockwood AH. Pesticides and parkinsonism: is there an etiological link? *Curr. Opin. Neurol.* 2000; 13 (6): 687-690.
- [210] Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, Myers RH. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 88 (6): 742-749.
- [211] Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 1999; 53 (3): 122-130.
- [212] Landi MT, Ceroni M, Martignoni E, Bertazzi PA, Caporaso NE, Nappi G. Gene-environment interaction in parkinson's disease. The case of CYP2D6 gene polymorphism. *Adv. Neurol.* 1996; 69:61-72 61-72.
- [213] Joost O, Taylor CA, Thomas CA, Cupples LA, Saint-Hilaire MH, Feldman RG, Baldwin CT, Myers RH. Absence of effect of seven functional mutations in the CYP2D6 gene in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1999; 14 (4): 590-595.
- [214] De Coo IF, Renier WO, Ruitenbeek W, Ter Laak HJ, Bakker M, Schagger H, Van Oost BA, Smeets HJ. A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome. *Ann. Neurol.* 1999; 45 (1): 130-133.
- [215] Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H, Mizuno Y. Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease. *Genomics.* 1998; 49 (1): 52-58.
- [216] Kirchner SC, Hallagan SE, Farin FM, Dilley J, Costa-Mallen P, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. Mitochondrial ND1 sequence analysis and

- association of the T4216C mutation with Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2000; 21 (4): 441-445.
- [217] Kosel S, Grasbon-Frodl EM, Mautsch U, Egensperger R, von Eitzen U, Frishman D, Hofmann S, Gerbitz KD, Mehraein P, Graeber MB. Novel mutations of mitochondrial complex I in pathologically proven Parkinson disease. *Neurogenetics*. 1998; 1 (3): 197-204.
- [218] Simon DK, Mayeux R, Marder K, Kowall NW, Beal MF, Johns DR. Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease. *Neurology*. 2000; 54 (3): 703-709.
- [219] Rassow J, Dekker PJT, van Wilpe S, Meijer M, Soll J. The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* 1999; 286 (1): 105-120.
- [220] Seyfried J, Soldner F, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA, Wullner U. Differential effects of L-buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on glutathione levels and mitochondrial function in PC12 cells. *Neurosci Lett*. 1999; 264 (1-3): 1-4.
- [221] Stein WD. Kinetics of transport: analyzing, testing, and characterizing models using kinetic approaches. *Methods Enzymol*. 1989; 171:23-62. 23-62.
- [222] Li L, Lee TK, Ballatori N. Functional re-evaluation of the putative glutathione transporters, RcGshT and RsGshT. *Yale J. Biol. Med.* 1997; 70 (4): 301-310.
- [223] Chen Z, Putt DA, Lash LH. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 373 (1): 193-202.
- [224] Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969; 164 (880): 719-21.

- [225] Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J.* 1992; 6 (15): 3338-44.
- [226] Ferrer I, Martin F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, Macaya A, Planas AM. Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta Neuropathol.* 1995; 90 (5): 504-10.
- [227] Sohn S, Kim EY, Gwag BJ. Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci Lett.* 1998; 240 (3): 147-50.
- [228] Chihab R, Oillet J, Bossenmeyer C, Daval JL. Glutamate triggers cell death specifically in mature central neurons through a necrotic process. *Mol Genet Metab.* 1998; 63 (2): 142-7.
- [229] Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis- necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol.* 1997; 378 (1): 70-87.
- [230] Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (16): 7162-6.
- [231] Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic- necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology.* 1998; 37 (10-11): 1419-29.
- [232] Froissard P, Duval D. Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int.* 1994; 24 (5): 485-93.

- [233] Walkinshaw G, Waters CM. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 1995; 95 (6): 2458-64.
- [234] Melamed E, Offen D, Shirvan A, Ziv I. Levodopa--an exotoxin or a therapeutic drug? *J. Neurol.* 2000; 247 Suppl 2:II135-9 II135-II139.
- [235] Smith TS, Parker WD, Jr., Bennett JP, Jr. L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity? *Neuroreport.* 1994; 5 (8): 1009-1011.
- [236] Ogawa N. Levodopa and dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease: advantages and disadvantages. *Eur Neurol.* 1994; 34 Suppl 3 20-8.
- [237] Pereira CM, Oliveira CR. Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23 (4): 637-47.
- [238] Osborne NN, Cazevieille C, Pergande G, Wood JP. Induction of apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells is counteracted by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38 (7): 1390-400.
- [239] Froissard P, Monroq H, Duval D. Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 1997; 326 (1): 93-9.
- [240] Voehringer DW, McConkey DJ, McDonnell TJ, Brisbay S, Meyn RE. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95 (6): 2956-2960.
- [241] Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science.* 1993; 262 (5137): 1274-1277.

- [242] Armand V, Rundfeldt C, Heinemann U. Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 359 (1): 33-9.
- [243] Rostock A, Tober C, Rundfeldt C, Bartsch R, Engel J, Polymeropoulos EE, Kutscher B, Loscher W, Honack D, White HS, Wolf HH. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 1996; 23 (3): 211-23.
- [244] Rundfeldt C. Characterization of the K⁺ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells. *Epilepsy Res.* 1999; 35 (2): 99-107.
- [245] Kornhuber J, Bleich S, Wiltfang J, Maler M, Parsons CG. Flupirtine shows functional NMDA receptor antagonism by enhancing Mg²⁺ block via activation of voltage independent potassium channels. Rapid communication. *J. Neural Transm.* 1999; 106 (9-10): 857-867.
- [246] Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA, Murphy MP. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 2000; .
- [247] Coulter CV, Kelso GF, Lin TK, Smith RA, Murphy MP. Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28 (10): 1547-1554.

Meine akademischen Lehrer, neben Prof. Dr. T. Klockgether, PD. Dr. U. Wüllner und Prof. Dr. K. A. Kovar an der Universität Tübingen, waren an der Technischen Universität Darmstadt die Herren Professoren:

| | |
|---------------------|-----------------------|
| K. Bächmann | Analytische Chemie |
| N. A. Dencher | Biochemie |
| K. P. Dinse | Physikalische Chemie |
| H. Elias | Anorganische Chemie |
| P. Friedl | Biochemie |
| H. G. Gassen | Biochemie |
| K. Hafner | Organische Chemie |
| K. H. Homann | Physikalische Chemie |
| G. Joppien | Anorganische Chemie |
| H. Klein | Anorganische Chemie |
| R. Kniep | Anorganische Chemie |
| F. W. Lichtenthaler | Organische Chemie |
| H. Lindner | Organische Chemie |
| H. Mayer | Organische Chemie |
| H. U. Reißig | Organische Chemie |
| A. Skerra | Biochemie |
| J. J. Veith | Organische Chemie |
| H. Vogel | Chemische Technologie |
| H. Wendt | Chemische Technologie |

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jan Christoph Seyfried
 Geburtsdatum: 30. 03. 1970
 Geburtsort: Darmstadt
 Familienstand: ledig
 Eltern: Dr. Christoph und Margrit Seyfried, geb. Kühne
 Nationalität: deutsch

Ausbildung

1976 – 1980 Grundschule Schuldorf Bergstraße in Seeheim-Jugenheim
 1980 – 1989 Altes Kurfürstliches Gymnasium in Bensheim
 Mai 1989 Allgemeine Hochschulreife
 1989 – 1990 Zivildienst, AOK Kurklinik in Alsbach
 1990 – 1996 Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Darmstadt
 1992 Vordiplom
 November 1995 Diplomprüfungen
 1995 – 1996 Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt
 Juli 1996 Abschluß als Diplom-Ingenieur Chemie
 1997 – 2000 Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen unter Prof. T Klockgether, naturwissenschaftlicher Betreuer: Prof. K.-A. Kovar, Stipendiat des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“.
 seit Februar 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Universitätsklinik Bonn