

Dipl.- Biol. Anne Gieseler

Zusammenfassung der Dissertation zum

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

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

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

Unsere Kalzium-*Imaging*-Experimente konnten zeigen, dass Rotenon in kortikalen Neuronen zu einer veränderten zytosolischen Kalziumdynamik führt. In Anwesenheit des „klassischen“ mtPTP-Blockers Cyclosporin A (CsA) wird die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation verringert, was eine Beteiligung der mtPTP erkennen lässt. Diese Vermutung wurde durch die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützt, in denen Rotenon in isolierten Mitochondrien die Kalzium-induzierte mtPTP-Öffnung fördert. Im Zellkulturmodell zeigte sich, dass Minozyklin die Rotenon-induzierte Kalzium-Deregulation nahezu komplett verhindert und sich damit noch wirksamer als der reine mtPTP-Inhibitor CsA erwies. Neben einer Blockade der mtPTP sind die Radikalfängereigenschaften des Minozyklins als protektiv erkannt worden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die durch H₂O₂ stimulierte ROS-Produktion kortikaler Neuronen durch Minozyklin drastisch verringert wird. Zugleich konnte für das Pharmakon ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

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

Dipl.- Biol. Anne Gieseler

Englische Zusammenfassung der Dissertation mit dem

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

Neurodegenerative diseases represent a major problem in populations with increasing life expectancies. Parkinson's disease is one of the most frequent neurological disorders, caused by the degeneration of dopamine producing neurons in the *Substantia nigra pars compacta* of the midbrain. The underlying mechanisms remain poorly defined. In addition to genetic factors mitochondrial mediated metabolic disorders along with generation of free radicals as well as the increase in high intracellular calcium levels play an important role in the development of this disease.

The aim of the thesis was to establish a powerful cell culture model to investigate and confirm already described pathophysiological mechanisms. Therefore, the mitochondrial complex I of primary cultivated cortical neurons were inhibited by application of rotenone to study how this blockade affects the activity and opening of the mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), which plays an important role in neurodegenerative processes. The investigation of mtPTP relevant parameters, like cytosolic calcium dynamics, mitochondrial swelling as well as the production of reactive oxygen species (ROS) by using imaging techniques and biochemical assays provided information about modified mitochondrial functions. On the basis of this data the impact of the tetracycline-derivative minocycline is investigated, whose neuroprotective property is recently discussed controversial.

The calcium imaging experiments had shown that the application of rotenone results in changed cytosolic calcium dynamics of cortical neurons. The rotenone-induced calcium deregulation is decreased in presence of the classical mtPTP blocker cyclosporine A (CsA). This indicates the involvement of the mtPTP. This presumption is supported by the present finding that rotenone facilitates the calcium-induced mtPTP opening in isolated mitochondria. The cell culture model demonstrates that minocycline prevents a rotenone induced calcium deregulation almost completely and prove to be more effective than the mtPTP inhibitor CsA. However, other protective mechanisms, besides a blockade of the mtPTP, in particular the radical scavenging properties of minocycline, were shown to be beneficial. Accordingly, we could find that the H₂O₂-stimulated ROS production in cortical neurons is dramatically decreased by minocycline. In contrast, a cytotoxic effect of minocycline could be observed.

Concluding from the results presented, we recommend to calculate precisely the beneficial and detrimental effects when minocycline is considered for application in neurodegenerative disorders.