

ZUSAMMENFASSUNG

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

ABSTRACT

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

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