

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methodenplattform zu etablieren, mit der in einem hochdurchsatzfähigen Ausleseverfahren Substanzen identifiziert werden können, welche spezifisch die Bildung von ROS in Mitochondrien inhibieren (Wirkung), ohne die Atmung zu beeinflussen (Ausschluß der Nebenwirkung). Ferner sollte untersucht werden, ob die neuroprotektiven Eigenschaften von Pramipexole auf einem antioxidativen und/oder mitochondrien-abhängigen Mechanismus beruhen, der unabhängig von der Dopaminrezeptorstimulation ist.

Die mitochondriale Oxidation von Amplex Red™ bzw. Reduktion von Resazurin in Mitochondrien sind hochdurchsatzfähige Modellsysteme, welche die Identifizierung neuartiger antioxidativer Substanzen mit mitochondrialem Wirkort ermöglicht. Hierzu wurden zunächst die Stoffwechselwege untersucht, welche an der zellulären und subzellulären Resazurin-Reduktion beteiligt sind. Da diese in Mitochondrien weitestgehend von der NADH-Verfügbarkeit abhängt, ist es möglich den Flux der Elektronen durch die Atmungskette qualitativ zu beurteilen. Diese Methode ersetzt daher Atmungsmessungen, die nur einen sehr begrenzten Probendurchsatz erlauben. Ferner wurde die H₂O₂-vermittelte Amplex Red™ Oxidation mit Hilfe von Mitochondrien und Xanthinoxidase charakterisiert, und durch Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus eingehend validiert. Durch die sequentielle Aneinanderreihung dieser Methoden und geeigneter Selektionskriterien ist es möglich, neben der überwiegenden Anzahl unwirksamer Substanzen, weitere unspezifisch wirkende Substanzen auszuschließen. Diese sind z.B. Atmungsinhibitoren bzw. -aktivatoren, Antioxidantien mit Wirkort innerhalb oder außerhalb der Mitochondrien oder Substanzen, die mit dem Detektionssystem interferieren. Am Ende dieses dreistufigen Verfahrens sollten Substanzen zur Verfügung stehen, welche spezifisch die mitochondriale Bildung von ROS inhibieren und nicht gebildete ROS entgiften.

Pramipexole wird in neurale Zellen und Mitochondrien aufgenommen. Die Aufnahme in Zellen und Mitochondrien erfolgt durch einen diffusionsabhängigen Prozess, der in Gegenwart eines Membranpotentials die Akkumulation in den Mitochondrien ermöglicht. Ferner ist Pramipexole und sein (+) Enantiomer (SND919CL2X) in der Lage, *in vitro* reaktive Moleküle wie H₂O₂, O₂^{•-} und NO[•] mit gleicher Effizienz zu entgiften und dadurch in hohen Konzentrationen oxidativen Stress zu erniedrigen und den Glutamat-induzierten Zelltod in HT-22 Zellen zu inhibieren. Ferner war die mitochondriale Aconitaseaktivität in Mäusen nach Pramipexolebehandlung erhöht, was auf eine Senkung der *in vivo* O₂^{•-}-Konzentration hindeutet.

Allerdings waren diese Eigenschaften nicht ausreichend, um eine Protektion in einem, von der Dopaminrezeptorstimulation unabhängigen, neurodegenerativen Modell zu erzielen. Während die Behandlung von SOD-2 „knock-out“ Mäusen mit dem SOD-Katalasemimetikum EUK-134 die Überlebenszeit von 7 auf 28 Tage verlängerte, war die Verlängerung der Überlebenszeit durch SND919CL2X-Behandlung nicht signifikant verlängert (10 Tage). Diese Tiere eignen sich daher zur Untersuchung der Effizienz antioxidativer Substanzen *in vivo*.