

Zusammenfassung:

Die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) ist eine neurodegenerative Erkrankung des Sehnervs, die von der Mutter weitervererbt und durch Punktmutationen der mitochondrialen DNA verursacht wird. Die Fehlfunktion des betroffenen Komplexes I der Atmungskette führt zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und einer Abnahme der ATP-Synthese. Diese Situation kann zu ein Ungleichgewicht zwischen der Herstellung und der zum Überleben der Zelle benötigten Menge an Energie zu Folge haben. Unter solchen Bedingungen könnte die Zelle durch Apoptose sterben, was in LHON als Degeneration des Sehnervs offenkundig wird. Cybrid-Zellen sind das am häufigsten benutzte Modell für diese Erkrankung, da der Sehnerv von LHON-Patienten erst nach dem Tod zugänglich und zu diesem Zeitpunkt die Degeneration meist in vollem Umfang ausgeprägt ist.

Ziel der Untersuchungen war die Etablierung eines zellulären Schädigungsmodells für LHON, um einerseits die Wirkung von Antioxidantien und Neuroprotektiva zu beurteilen und andererseits die Beteiligung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mtPTP) bei der Ausprägung der Erkrankung zu untersuchen. Unter Verwendung von Cybrid-Zellen mit einer mitochondrialen LHON-Mutation an Position 11778 wurde die Wirksamkeit des vielversprechenden neuroprotektiven Tetracyclin-Derivats Minocyclin untersucht. Das Medikament erhöhte die Lebensfähigkeit der LHON-Cybrid-Zellen in MTT-Analysen nach Applikation des Apoptose auslösenden Stimulus Thapsigargin (TG). In der als Kontrolle verwendeten Ausgangszelllinie NT2 war, im Gegensatz dazu, diese Art des Schutzes nicht nachweisbar. Eine zu Minocyclin vergleichbare Protektion wurde nach Behandlung mit Cyclosporin A (CsA), einem bekannten Blocker der mtPTP, beobachtet. Der Einsatz eines allgemeinen Caspase-Inhibitors (z-VAD-FMK) konnte den durch TG induzierten Zelltod in keiner der beiden Zelllinien verhindern. Hingegen waren die Kondensation des Chromatins, mittels DAPI-Färbung, und die apoptotische Morphologie der Zellen erkennbar. Weiterhin konnte immunhistochemisch die Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien und dessen Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden, was auf mtPTP induzierte und Caspasen unabhängige Apoptose hinweist. Ratiometrische Messungen des intrazellulären Ca^{2+} ergaben, dass die durch Acetylcholin/TG ausgelöste Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Minocyclin und CsA abgeschwächt wird, was ebenfalls für eine Beteiligung der mtPTP spricht. Zusätzlich war das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der LHON-Cybrid-Zellen, ermittelt durch die Aufnahme von TMRM, signifikant besser konserviert nach einer Behandlung mit Minocyclin und CsA. Western blot-Analysen zeigten eine Abnahme des Verhältnisses von aktivierter Caspase 3 zu Procaspase 3 in den mit Minocyclin und CsA behandelten Gruppen nach TG-induziertem Zelltod, was auf die Regulation nachgeschalteter apoptotischer Ereignisse hinweist. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den unter Verwendung von z-VAD-FMK in den MTT-Experimenten erhaltenen Ergebnissen, welche auf einen Caspase unabhängigen Prozess hindeuten. Die Abgabe pro-apoptotischer Faktoren (z.B. AIF) von Mitochondrien und ebenfalls ablaufende Vorgänge, die die Aktivierung von Caspasen hervorrufen, stellen die Ursache für den beobachteten Zelltod dar. Eine Blockade der Öffnung der mtPTP durch CsA und Minocyclin kann den Untergang der LHON-Cybride verhindern. Zusätzlich verringerte

Minocyclin konzentrationsabhängig den oxidativen Stress in LHON-Zellen, was die guten antioxidativen Eigenschaften dieses Tetracyclins bestätigt.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass ein Öffnen der mtPTP an der Pathogenese der LHON beteiligt ist und Minocyclin, neben seiner Eigenschaft als Antioxidant, vorteilhafte Effekte durch die Hemmung der mtPTP besitzt. Weitere Untersuchungen zu den Auswirkungen von Minocyclin in *in vivo* Modellen dieser Erkrankung (z.B. an Mäusen mit ND4-Mutation) sind erforderlich, um den schützenden Mechanismus an retinalen Ganglienzellen und Sehnerv zu beweisen