
Diplom-Biologin Susanne Schöler

Zusammenfassung: Charakterisierung von Teratomcybriden mit der primären LHON-Mutation G11778A

Bei der zelltypspezifischen Mitochondriopathie LHON kommt es zum plötzlich einsetzenden und schnell verlaufenden Untergang retinaler Ganglienzellen (*RGC*) mit entsprechender Degeneration des Nervus opticus, die zu schwerer Visusminderung oder Erblindung führt. Primäre Ursache sind maternal vererbte Punktmutationen der mitochondrialen DNA mit Aminosäureaustausch in Komplex I der Atmungskette. Nukleäre Gene, Ethanol und andere Noxen werden als weitere Faktoren kontrovers diskutiert, da nicht alle Mutationsträger erkranken und eine männliche Prävalenz vorliegt. Trotz zahlreicher Zellkulturstudien sind der präzise biochemische Mechanismus der LHON-Mutationen, sowie der Modus der Zelltodinduktion noch ungeklärt. Hinweise deuten jedoch auf eine Synergie zwischen Energiedepletion (ATP-Mangel) und oxidativen Stress hin. Richtungweisende Befunde stammen bislang vor allem aus einem einzigen Cybrid-Zellkulturmodell (143B.TK(-)-Osteosarkom). Zur näheren experimentellen Charakterisierung von LHON wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternatives Cybridmodell (NT2/D1-Teratom) verwendet, das zudem den Vorteil der neuronalen Differenzierbarkeit dieser Klone bietet.

Ein Aspekt umfasste die Auswirkungen von metabolischem Stress, ausgelöst durch Inkubation der Zellen in Galaktosemedium oder durch Differenzierung mit Retinolsäure. Hierdurch sollten die Wirkungen der Mutation detektierbar gemacht werden. Die mutierten Zellen zeigten im Vergleich zum Wildtyp unter Stressbedingungen jedoch keine verminderten Überlebensraten. Eine überwiegende Abhängigkeit des Energiestoffwechsels von der Atmungskette wurde auch durch Differenzierung mit Retinolsäure nicht erreicht. Ferner zeigte sich keine signifikante Erniedrigung der Atmungsraten mit Komplex I-Substraten und auch keine Verminderung des ATP-Gehaltes bei den Mutanten, letzteres im Gegensatz zu Vorbefunden im 143B.TK(-)-Modell. Nach Maßgabe klassischer bioenergetischer Parameter waren die Auswirkungen der Mutation somit nicht detektierbar.

Gemäß der These einer höheren Sättigung der antioxidativen Abwehr bei der Mutante, wurde die Reaktion der Zellen in einem Lebendzellzahltest auf externen oxidativen Stress geprüft. Proliferierende Zellen zeigten entgegen der theoretischen Erwartung eine geringere Sensitivität der Mutanten gegenüber H_2O_2 , ein Resultat, das durch Retinolsäure z.T. umgekehrt wurde. An proliferierenden Zellen ergab sich gleichzeitig eine signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhte Caspase-3-Aktivierung durch dieses Oxidans bei mutierten Zellen, sodass der im Lebendzellzahltest messbare Zelltod offenbar nur partiell apoptotisch war. Trotz verbliebener Unklarheiten stützten die Befunde eher die These einer erhöhten Sättigung der antioxidativen Mechanismen bei der Mutante, insbesondere im Zusammenhang mit jüngst publizierten Daten eines Kooperationspartners. Die Superoxid generierenden Substanzen Paraquat und Benzylviologen zeigten generell geringe Wirkung, ohne Korrelation mit dem Mutationsstatus. Entsprechendes galt für die Noxen Ethanol und Methanol. Selbst die Reaktion auf klassische Vermittler der intrinsischen und extrinsischen Apoptosewege (Staurosporin und *TRAIL*) war im NT2/D1-Modell sehr gering, im Vergleich zu 143B.TK(-)-Zellen, welche zu Kontrollzwecken mitgeführt wurden. Es zeigte sich auch hier keine Korrelation mit der Mutation.

Die Aktivitätsmessung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase ergab, z.T. im Gegensatz zu Vorbefunden, keine verminderten Enzymaktivitäten bei den Mutanten, auch nicht nach Differenzierung mit Retinolsäure. Nach Differenzierung fand sich ein mutationsspezifisch verminderter Gehalt an Glutathion ($p \leq 0,05$).

Die teilweise kontroversen Befunde dieser Arbeit im Vergleich zum bislang für LHON genutzten Modell deuten darauf hin, dass auch der Cybrid-Zelltyp einen wesentlichen Einfluss auf die Konsequenzen der G11778A-Mutation für den oxidativen Energiestoffwechsel und für den Zelltod unter metabolischen bzw. oxidativen Stressbedingungen hat. Aus diesem Grunde sollten die an Cybridkulturen gewonnenen Resultate, inklusive der sich daraus ergebenden pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten, nicht vorbehaltlos auf *RGC* übertragen werden.