Die molekularen Mechanismen der Neurotoxizität der Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Fachbereich 2
Biologie/Chemie
der Universität Bremen

von
Sven Gottschalk
(Bremen, Dezember 2003)

Gutachter

Prof. Dr. Dieter Leibfritz

Dr. Natalie Serkova

SUMMARY

Cyclosporine A (CsA) causes neurotoxicity in transplant patients. Due to synergistic immunosuppressive activity and different spectra of side effects, combination of CsA with the m-TOR inhibitor sirolimus (Srl) or everolimus (RAD) improves immunosuppressive therapy. Clinical trials showed that Srl and RAD modulate cyclosporine toxicity. It was the aim of this work to characterize the mechanisms of the immunosuppressants neurotoxic effects. Metabonomic NMR-studies were combined with biochemical methods to reveal different aspects of the drugs neurotoxicity. Three different *in vitro* cell systems were tested as model system for immunosuppressant-toxicity.

- The C6-Glioma cell line is an insufficient model system, because of its tumor origin. The cell metabolism differs widely from normal glia-cells.
- Primary astrocytes fit best for the biochemical methods. Pharmacodynamic and pharmacokinetic effects, which play important roles *in vivo*, were inappropriately regarded as revealed by comparison with *in vivo* results.
- Rat brain slices are the best model system for the investigation of immunosuppressant neurotoxicity. Their cell metabolism is comparable to *in vivo* cell metabolism of young rats.
- Srl synergistically enhanced the toxic effects of CsA, oxidative stress as well as inhibition of energy metabolism. RAD in contrast antagonized CsA-toxicity, showing the same pattern as the antioxidant Vitamin E.

The *in vivo* part of this work demonstrated the importance of pharmacodynamic and pharmacokinetic effects, especially in the combination therapies.

- CsA entered into brain-mitochondria and inhibited mitochondrial energy production. The cells compensated this loss of energy by enhanced cytosolic energy production.
- Srl was unable to enter brain mitochondria, but increased the mitochondrial CsA-concentration and hence the toxic effects of CsA on mitochondrial energy metabolism. Srl demolished the adaptation processes for CsA-induced energy failure by inhibition of glycolysis.
- RAD distributed in competition to CsA into brain mitochondria, lowering mitochondrial CsA-concentration and CsA-toxic effects.
- Organ specific severity of immunosuppressant toxicity could be explained due to different concentrations of the drugs. The rat kidney-concentrations of the immunosuppressants were up to ten times higher than in rat brains. The energy metabolism of the kidney was hence more affected than that of rat brains.
- The distribution of CsA, Srl and RAD depended on age and sex of the rats. Different expression levels of the P-Glycoprotein (P-gp) led to different brain-concentrations of the immunosuppressants. Adult rats with a fully developed brain-blood-barrier, meaning a high level of P-gp, had a significantly lower brain-concentration of the drugs. The toxic effects were observed in adult rats to a much lesser extent than in young rats with lower levels of P-gp.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Dissertation wurden die Mechanismen neurotoxischer Wirkungen der Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus, Everolimus und der jeweiligen Kombination mit Ciclosporin an verschiedenen *in vitro* Rattenmodellen und *in vivo* an Wistar-Ratten untersucht. Dabei wurden biochemische Methoden und metabonomische NMR-Studien kombiniert, um verschiedene Aspekte der Immunsuppressivatoxizität zu beleuchten. Die Ergebnisse des *in vitro* Teils, in dem C6-Glioma-Zellen, primäre Rattenastrozyten und Gehirnschnitte von einer Woche alten Ratten Verwendung fanden und der Vergleich mit den Resultaten des *in vivo* Teils machten die Eignung der drei Modelle für die Betrachtung der Neurotoxizitäten deutlich.

- Die C6-Glioma-Zellen erwiesen sich als ungeeignet, da ihr Metabolismus aufgrund des tumorösen Ursprungs zu verschieden von normalen Gliazellen ist.
- Die primären Astrozyten sind das beste Modell, um die biochemischen Methoden anzuwenden. Die *in vivo* sehr wichtigen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Vorgänge finden jedoch in den primären Astrozyten nicht genügend Beachtung.
- Die Gehirnschnitte sind ein sehr gutes Modell. Wie sich im Laufe der *in vivo* Untersuchungen herausstellte, jedoch eher für junge Ratten. Ansonsten entsprechen sie in ihrem Metabolismus und Reaktionen sehr gut der *in vivo* Situation.
- Anhand der Kombinationsinkubationen wurde ersichtlich, dass Sirolimus die toxischen Wirkungen von Ciclosporin synergistisch verstärkte. Dies galt sowohl für oxidativen Stress, als auch für die Inhibition des Energiestoffwechsels. Everolimus im Gegensatz dazu antagonisierte die toxischen Wirkungen des Ciclosporins und zeigte einen ähnlichen protektiven Effekt wie das Antioxidationsmittel Vitamin E.

Der *in vivo* Teil der Arbeit machte deutlich wie wichtig pharmakodynamische und pharmakokinetische Parameter für die toxischen Wirkungen der Immunsuppressiva sind. Dies wurde besonders durch die Kombinationsbehandlungen sichtbar.

- Ciclosporin gelangte in Mitochondrien des Gehirns und inhibierte die mitochondriale Energiegewinnung. Die Zellen kompensierten diesen Energieverlust durch verstärkte cytosolische Energieproduktion.
- Sirolimus gelangte nicht in Mitochondrien, erhöhte jedoch die mitochondriale Konzentration von Ciclosporin und dadurch dessen toxische Wirkungen auf den Energiemetabolismus. Zudem störte Sirolimus durch Inhibition der cytosolischen Energiegewinnung Ausgleichsprozesse der Zellen.

➢ Everolimus gelangte in Konkurrenz zu Ciclosporin in Mitochondrien und senkte so die Konzentration und die toxischen Wirkungen von Ciclosporin.

➢ Organspezifische Wirkungen aufgrund von unterschiedlicher Gewebeverteilung der Medikamente wurden beobachtet. Die Konzentrationen in der Niere waren bis zum zehnfachen höher als im Gehirn der Ratten. Die Auswirkungen auf den Energiemetabolismus in der Niere waren entsprechend stärker ausgeprägt als im Gehirn.

➢ Für die Verteilung der Stoffe im Gehirn wurden Unterschiede zwischen Alter und Geschlecht gefunden. Unterschiedliche P-Glykoproteinexpression führte zu verschieden großen Konzentrationen der Immunsuppressiva im Gehirn. Erwachsene Ratten haben eine voll ausgebildete Bluthirnschranke, also eine große Menge an P-gp, dadurch waren die Konzentrationen der Medikamente und deren toxische Wirkungen geringer als bei jungen Ratten mit wenig P-gp.

Zusammenfassende Betrachtung der Immunsuppressivawirkungen auf den Zellstoffwechsel:

	CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD	Methode
Glykolyse (C3-Laktat)	↑	↓	↓	↓↓	**O**	^{13}C-NMR
Citratzyklus (C4-Glutamat)	↓	**O**	**O**	↓↓	**O**	^{13}C-NMR
Oxidative Phosphorylierung*	↓ **[+VE: O]**	**O**	↑	↓↓ **[+VE: O]**	**O**	^{31}P-NMR
Oxidativer Stress (ROS / LPO)	↑ **[+VE: O]**	↑	↑	↑↑	**O**	Fluoreszenz
Verteilung in Mitochondrien (Gehirn)	**++**	**O**	**+**	**CsA ++ Srl O**	**CsA + RAD ++**	HPLC/MS

* NAD^+- und NADH-Konzentration
VE: Vitamin E (α-Tocopherol)
ROS: Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
LPO: Lipidperoxidation

Abkürzungen

ANT	*adenine nucleotide translocator*
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Dibutylhydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
CsA	Ciclosporin A
DCF	2′,7′-Dichlorofluorescein
DCFH-DA	2′,7′-Dichlorofluorescin-Diacetat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DTNB	5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
EBSS	*Earle's Balanced Salts*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoehtylether)
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FDA	*U.S. Food and Drug Administration*
FK506	Tacrolimus
FKBP	*FK-binding protein*
GIDH	Glutamatdehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
LPO	Lipidperoxidation
MDA	Malondialdehyd
MDH	Malatdehydrogenase
MHC	*major histocompatibility complex*
MPT	*mitochondrial permeability transition*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NADH/NAD$^+$	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NADPH/NADP$^+$	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (red./ox. Form)
NFAT	*nuclear factor of activated T-cells*
NMR	*nuclear magnetic resonance*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PCA	Perchlorsäure
PCr	Phosphokreatin
PDH	Pyruvatdehydrogenase
P-gp	P-Glykoprotein
ppm	*parts per million*
RAD	Everolimus
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Srl	Sirolimus (Rapamycin)
TMSP	(Trimethylsilyl)-2,2,3,3-d_4-propionat
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzoesäure

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1 ORGANTRANSPLANTATIONEN 1
1.2 CICLOSPORIN A, SIROLIMUS, EVEROLIMUS 2
1.3 KLINISCHE RELEVANZ 7
1.4 AUFGABENSTELLUNG 8

2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION – *IN VITRO* 10

2.1 VERWENDETE IMMUNSUPPRESSIVAKONZENTRATIONEN 10
2.2 CYTOTOXIZITÄT 11
2.3 OXIDATIVER STRESS 12
2.3.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES DURCH IMMUNSUPPRESSIVA - GEHIRNSCHNITTE 13
2.3.1.1 Kurzzeit-Inkubationen 13
2.3.1.2 Langzeit-Inkubationen 14
2.3.1.3 Einfluss des Antioxidationsmittel Vitamin E 14
2.3.2 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES DURCH IMMUNSUPPRESSIVA - ZELLKULTUREN 15
2.4 APOPTOSE 17
2.5 FLUORESZENZMIKROSKOPIE 20
2.6 LAKTATDEHYDROGENASE – PRIMÄRE ASTROZYTEN 25
2.7 GLUKOSEMETABOLISMUS – NMR-MESSUNGEN 27
2.7.1 PRIMÄRE ASTROZYTEN 27
2.7.2 GEHIRNSCHNITTE 29
2.8 DISKUSSION – *IN VITRO* 33

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION – *IN VIVO* 45

3.1 VERWENDETE IMMUNSUPPRESSIVAKONZENTRATIONEN 45
3.2 ALLGEMEINE TOXIZITÄT – GEWICHTSABNAHME 45
3.3 BEHANDLUNG ERWACHSENER MÄNNLICHER RATTEN 46
3.3.1 ENERGIEMETABOLISMUS – BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN 46
3.3.2 OXIDATIVER STRESS 48
3.3.3 NMR-KORRELATION 49
3.4 JUNGE RATTEN VERGLICHEN MIT ERWACHSENEN MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN RATTEN 50
3.4.1 METABOLISMUS 50
3.4.2 P-GLYKOPROTEIN 52
3.4.3 GEWEBEVERTEILUNG DER IMMUNSUPPRESSIVA 53
3.5 UNTERSUCHUNGEN DER RATTENNIERE 54
3.5.1 PHARMAKOKINETIK – GEWEBEVERTEILUNG DER IMMUNSUPPRESSIVA 54
3.5.2 ENERGIEMETABOLISMUS IN DER NIERE – BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN 55
3.5.3 OXIDATIVER STRESS IN DER NIERE – LIPIDPEROXIDATION 56
3.6 DISKUSSION – *IN VIVO* 57
3.7 AUSBLICK 63

4. IMATINIB (GLIVEC™) 64

4.1 WACHSTUMSINHIBITION 64
4.2 APOPTOSE 65
4.3 VERÄNDERUNGEN IM METABOLISMUS 66

5. MATERIAL UND METHODEN 67

5.1 KLONALE C6-GLIOMA ZELLLINIE 67
5.2 PRÄPARATION PRIMÄRER ASTROZYTEN 68
5.2.1 VERWENDUNG VON VORKULTUREN 68
5.2.2 VERWENDUNG VON NYLONMEMBRANEN 69
5.3 KORTIKALE GEHIRNSCHNITTE 70
5.4 BEHANDLUNGSGRUPPEN 70
5.4.1 *EX VIVO* UND *IN VITRO* 70
5.4.2 *IN VIVO* 70
5.5 PROBENAUFBEREITUNG 71
5.5.1 SACCHAROSEPUFFER-EXTRAKTE VON GEWEBEN 71
5.5.2 PERCHLORSÄURE EXTRAKTION VON GEWEBEN 71
5.5.3 PERCHLORSÄURE EXTRAKTION VON ZELLEN 72
5.6 BIOCHEMISCHE ANALYSEN 72
5.6.1 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD 72
5.6.2 CYTOTOXIZITÄTSTEST MIT MTT 73
5.6.3 ENZYMATISCHE ANALYSEN 73
5.6.3.1 Laktatdehydrogenase (LDH) 74
5.6.3.2 Malatdehydrogenase (MDH) 74
5.6.4 ZELLMETABOLISMUS 75
5.6.4.1 Enzymatische Methode zur Bestimmung der Glutathionkonzentration 75
5.6.4.2 NADH/NAD^+ 76
5.6.5 OXIDATIVER STRESS 77
5.6.5.1 DCF-Messungen in Zellkultur 77
5.6.5.2 DCF-Messungen in Gehirnschnitten 78
5.6.5.3 Lipidperoxidation 78
5.6.6 WESTERN BLOT 79
5.7 DNA-LEITER ALS APOPTOSENACHWEIS 80
5.7.1 ISOLIERUNG VON DNA AUS ZELLEN 80
5.7.2 AGAROSE GELELEKTROPHORESE 81
5.8 FLUORESZENZMIKROSKOPIE 82
5.8.1 APOPTOTISCHE KERNFRAGMENTATION (HOECHST 33258) 82
5.8.2 MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL (RHODAMIN 123) 82
5.9 NMR-SPEKTROSKOPIE 83
5.10 HPLC/HPLC-MS 85
5.11 MATERIAL 86
5.11.1 CHEMIKALIEN 86
5.11.2 VERWENDETE LÖSUNGEN 87
5.11.3 GERÄTE 89

6. LITERATUR 90

ANHANG 98

1. Einleitung

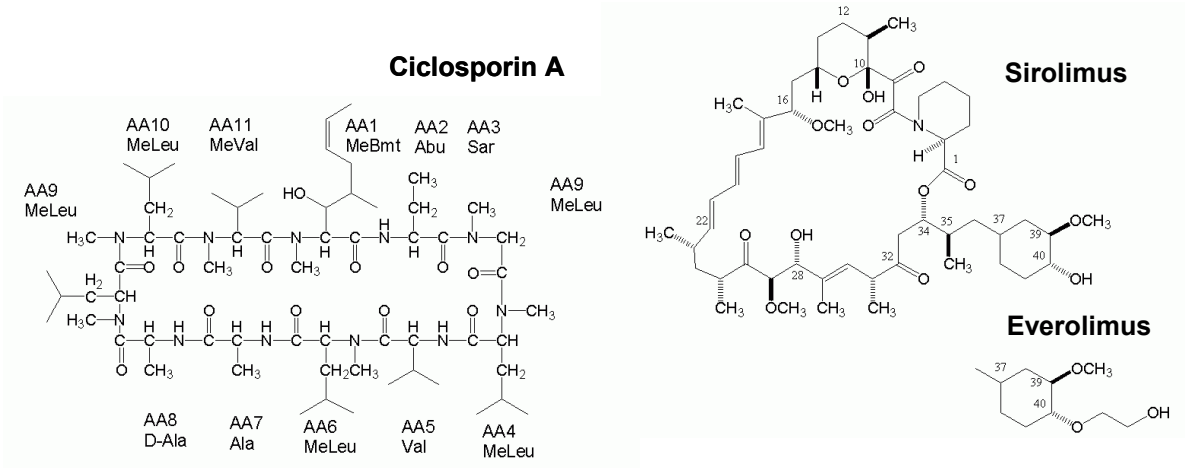
1.1 Organtransplantationen

Der Ersatz eines nicht mehr funktionstüchtigen, menschlichen Organs durch ein Transplantat ist heutzutage für alle lebenswichtigen Organe operativ möglich und teilweise bereits klinische Routine. Neben dem Mangel an Spenderorganen (*www.unos.org: united network for organ sharing*) stellt jedoch die alsbald einsetzende Zerstörung des übertragenen Gewebes, die so genannte Transplantatabstoßung, das Hauptproblem der Transplantationsmedizin dar. Dabei wurde die Erkenntnis, dass transplantiertes Gewebe ohne weitere Maßnahmen vom Empfänger abgestoßen wird, schon in den dreißiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts anhand von Hauttransplantationen bei Mäusen gewonnen (Staines, 1999). Schnell wurde klar, dass bei dieser Transplantatabstoßung das Immunsystem des Empfängers eine wichtige Rolle spielt. Die Charakteristik der Abstoßung entspricht in ihren Merkmalen sehr genau denen einer adaptiven Immunreaktion. Verpflanzt man weitere Transplantate vom selben Spender, werden diese nach einmal erfolgter Abstoßung rascher zerstört. Gleichartige Transplantate anderer Spender werden jedoch so langsam abgestoßen wie das erste Transplantat des zuerst genannten Spenders. Der Körper des Empfängers, also sein Immunsystem hat gelernt und reagiert beim zweiten Mal schneller. Dies sind von Virusinfektionen oder allgemein von Reaktionen an denen das Immunsystem beteiligt ist wohlbekannte Merkmale.

Das Immunsystem kann zwischen dem körpereigenen „selbst“ und „fremden“ Substanzen unterscheiden. Diese Selbsterkennung wird durch Proteine der Zellmembran ermöglicht, die Produkte des so genannten Hauptkomplexes der Histokompatibilitätsgene (MHC von „major histocompatibility complex“) sind. Diese Proteine existieren auf der äußeren Zellmembran aller Säugetierzellen und weisen einen ausgeprägten Polymorphismus auf, so dass es mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit zwei Individuen mit einem identischen Satz an MHC-Produkten gibt. Diese Variabilität führt jedoch dazu, dass die MHC-Moleküle auf den Zellen des Transplantats beim Empfänger als Antigene wirken. T-Lymphozyten des Empfängers erkennen kleinste Strukturunterschiede der MHC-Moleküle des Spendergewebes und lösen eine Immunreaktion aus. Insbesondere eine Untergruppe der T-Lymphozyten, die T-Helferzellen sind als hauptverantwortliche

Zelltypen des Immunsystems für die Vermittlung der Transplantatabstoßung anzusehen. Die Verwerfung von Fremdgewebe ist somit von wenigen Ausnahmen abgesehen biologisch unvermeidbar. Die einzige Möglichkeit eine Transplantatabstoßung zu verhindern oder zu mindern ist das gezielte Ausschalten der Signaltransduktion der beteiligten Immunzellen des Empfängers, eine so genannte Immunsuppression. Als größte Probleme stellen sich dabei mangelnde Spezifität und das richtige Gleichgewicht zu finden zwischen Suppression und notwendiger Funktionalität und Reaktivität des Immunsystems.

1.2 Ciclosporin A, Sirolimus, Everolimus



<u>Abbildung 1.1:</u> Strukturen von Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus

Die Nummerierung der Makrolide Sirolimus und Everolimus erfolgte gemäß den IUPAC-Richtlinien (IUPAC, 1993). Für Everolimus ist nur das zu Sirolimus unterschiedliche Strukturelement angegeben.

Ciclosporin A (*cyclosporine*, Cyclosporin, Ciclosporin, CyA, CsA, Sandimmune®, Neoral®) ist eines der wenigen spezifischen Medikamente zur Immunsuppression, das seit 1981 klinische Anwendung findet (Kahan, 1989). Sein immunsuppressiver Mechanismus in Lymphozyten beruht auf der Bindung an das cytosolische Protein Cyclophilin D (CyP). Dieser Komplex aus Ciclosporin und Cyclophilin hemmt die Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Calcineurin ist ein Teil der Signalkaskade, die in T-Zellen nach Antigenbindung im Weiteren zur IL-2-Synthese und IL-2-Ausschüttung führt. Die Inhibition von Calcineurin verhindert die Dephosphorylierung von NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), damit dessen Translokation in den Zellkern und als Folge die IL-2-Gentranskription. Die durch IL-2-Ausschüttung stimulierte Lymphozytenproliferation wird dadurch verhindert. (Abb. **1.2**;

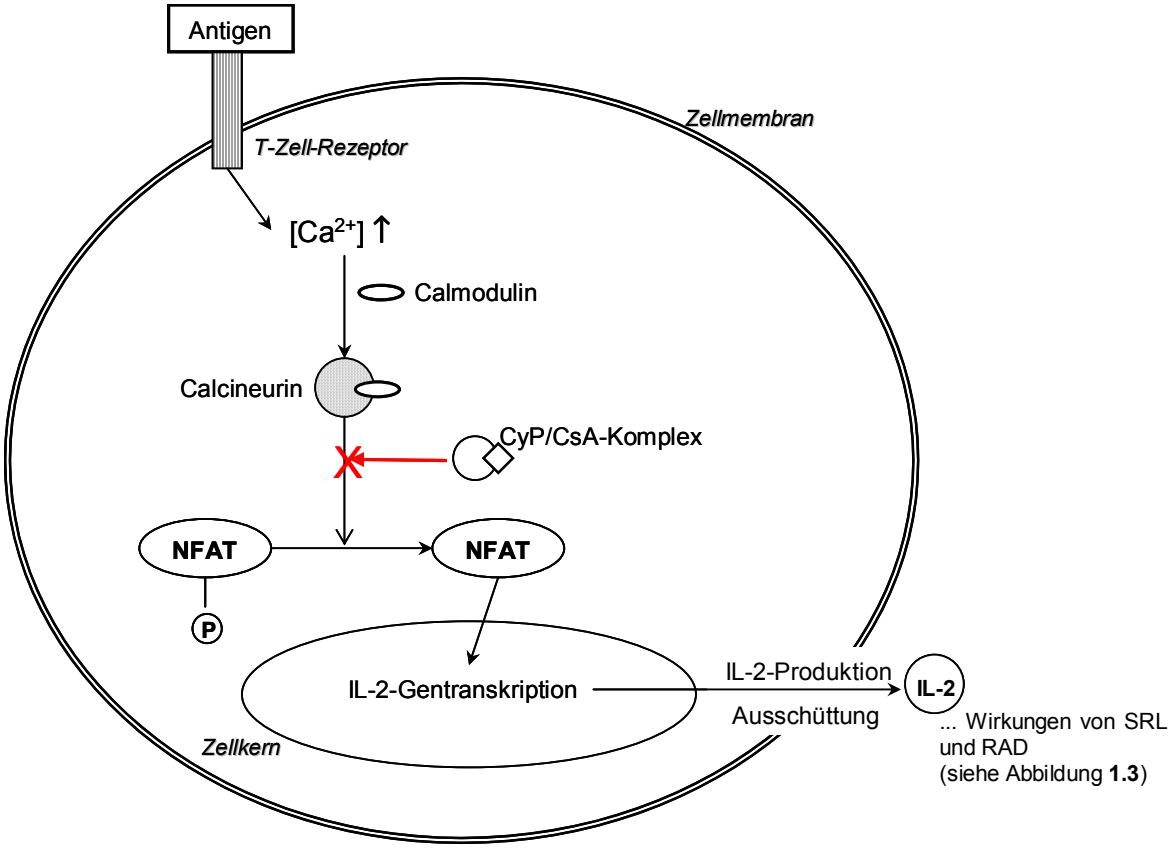
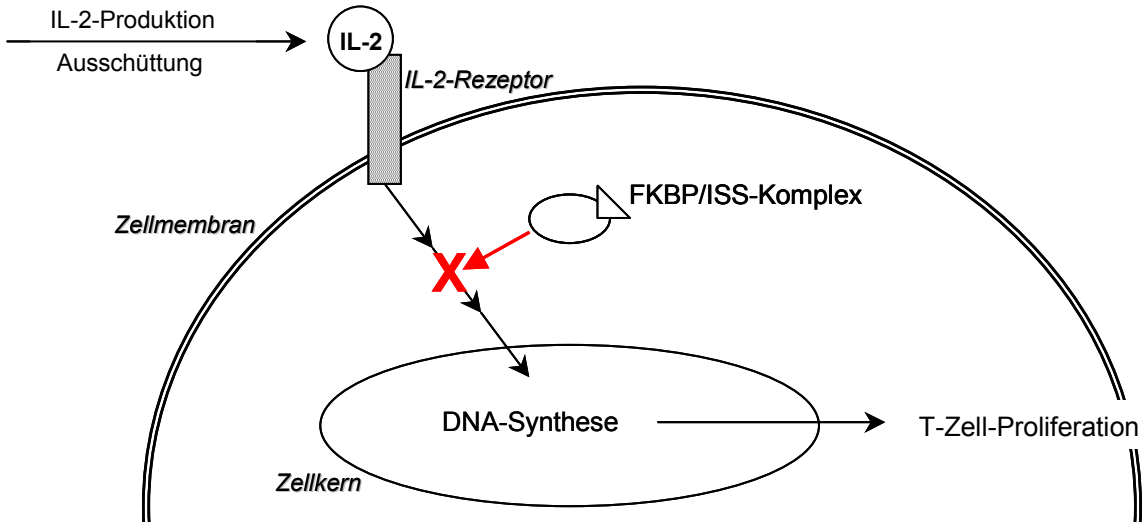


Abbildung 1.2: Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von Ciclosporin

Schreiber und Crabtree, 1992). Durch lange Erfahrungen im klinischen Bereich wurde Neurotoxizität nach Nierentoxizität als zweithäufigste Nebenwirkung von Ciclosporin identifiziert. Diese tritt je nach Transplantationsart bei bis zu 40% aller Fälle auf (Hauben, 1996; Gitjenbeek, 1999). Als wichtigste Symptome sind dabei Tremor, Depression, kortikale Erblindung, cerebrale Dysfunktion, Krämpfe, Schlaganfälle und Enzephalopathien zu nennen. Ebenso wurden in klinischen Studien morphologische Veränderungen im Gehirn mit Ciclosporin behandelter Patienten gefunden (Berden et al., 1985; Rubin und Kang 1987; Gitjenbeek, 1999). Diese beobachteten neurotoxischen Wirkungen des Ciclosporins zeigen deutliche Ähnlichkeiten zu Mitochondriopathien beziehungsweise den Auswirkungen neurodegenerativer Erkrankungen, in deren Zusammenhang funktionsgestörte Mitochondrien diskutiert werden (Serkova, Gottschalk et al., 2002). Dies spiegelt sich insbesondere in einem gestörten Energiestoffwechsel, Störung der Calciumhomöostase und oxidativem Stress beziehungsweise der vermehrten Bildung freier Radikale wieder (Beal, 1996 und 1998). Bei Untersuchungen von Ciclosporin *in vitro* in primären Rattenastrozyten und in Gehirnschnitten wurden vergleichbare Effekte nachgewiesen. So senkte Ciclosporin

die intrazelluläre Konzentration energiereicher Phosphate (Serkova et al., 1999). Dies wurde auch in der Niere, der Leber und anderen Organen nachgewiesen (Henke et al., 1992; Massicot et al., 1997; Salducci et al., 1996; Madsen et al., 1995). Im Gehirn jedoch wird der Energiehaushalt fast ausschließlich durch Glukose bestritten und der in den Mitochondrien lokalisierte Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung sind die Hauptquelle für energiereiche Phosphate.

Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen und der geringen therapeutischen Breite von Ciclosporin ist man bemüht die Konzentration im Körper möglichst gering zu halten. Eine Senkung der Ciclosporindosis und somit eine Verringerung der Nebenwirkungen ohne Verlust der therapeutischen Wirkung ist durch kombinierten Einsatz mit anderen immunsuppressiv wirkenden Substanzen möglich. In den letzten Jahren haben sich die Makrolide Sirolimus (Rapamycin, Rapamune) und Everolimus (RAD-001, SDZ-RAD, 40-O-(2-Hydroxethyl)-Rapamycin, Certican) als viel versprechende Kombinationspartner von Ciclosporin herauskristallisiert. Die beiden strukturell eng verwandten Stoffe (Abb. **1.1**) zeigen ein zu Ciclosporin abweichendes Nebenwirkungsprofil (Brattström et al, 1998; Trepanier et al., 1998; Neuhaus et al., 2001; Nashan, 2002) und greifen in einen späteren Schritt der Immunreaktion ein. Sirolimus und Everolimus binden beide an das cytosolische



<u>Abbildung 1.3:</u> Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von Sirolimus und Everolimus
(ISS = Sirolimus oder Everolimus)

Immunophilin FKBP (*FK-binding protein*) und wiederum ist es der Komplex aus Immunophilin und Immunsuppressivum, der ein Enzym inhibiert. In diesem Fall das so genannte mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Die Interaktion mit mTOR hat einen Stopp der IL-2 stimulierten Zellproliferation zwischen G_1- und S-Phase zur Folge (Abb. **1.3**; Brazelton und Morris, 1996; Sehgal, 2003). Die Kombinationen aus Ciclosporin und Sirolimus oder Everolimus offenbaren aufgrund der zeitlich verschiedenen Schritte, in die sie eingreifen, eine synergistische, immunsuppressive Wirkung (Kahan, 1997; Schuurmann et al., 1997). *In vitro* an Rattengehirnschnitten zeigte sich nicht nur ein Absenken energiereicher Phosphate durch Sirolimus alleine, zudem kam es zu einer synergistischen Verstärkung des Energieverlustes, der durch Ciclosporin verursacht wurde (Serkova, 1999). Anders hingegen Everolimus, das einen Verlust energiereicher Phosphate durch Ciclosporin *in* vitro teilweise wieder rückgängig machte und selbst keinen Einfluss auf den Energiestoffwechsel hat (Serkova, 2000). Die Nachteile der Gehirnschnitte als *in vitro* Modell für das Gehirn bestehen zum einen darin, dass sowohl pharmakokinetische Wechselwirkungen der Medikamente untereinander, als auch Verteilungseffekte in verschiedenen Geweben unbeachtet bleiben. Zum anderen besteht eine zeitliche Begrenzung der Inkubationszeit. Die Gehirnschnitte funktionieren nur für maximal 10 Stunden als ein hinreichendes Modell für das Gehirn (Serkova et al., 1999; 2000; Christians, Gottschalk et al. 2003). In den zitierten Untersuchungen wurde nur für zwei Stunden inkubiert. Bei diesen kurzen Zeiten können keine Veränderungen der Proteinexpression festgestellt werden, da es deutlich länger dauert, bis diese zum Tragen kommen. Weitergehende Experimente wurden daher an zwei Wochen alten Wistar Ratten durchgeführt (Serkova, 2001). Diese bieten aufgrund ihres Alters eine gute Vergleichsmöglichkeit zu den nur um eine Woche jüngeren Gehirnschnitten und erlauben als lebender Organismus die Möglichkeit einer längeren Behandlungszeit. Hinzu kommt dass in diesem Alter noch keine vollständig entwickelte Bluthirnschranke existiert, so dass dieselben Konzentrationen der Medikamente, wie im *in vitro* Modell der Gehirnschnitte leicht zu erreichen und zu halten sind, ohne dass die toxischen Wirkungen auf die Nieren überhand nehmen. Nach sechs Tagen Behandlung wurden die Rattengehirne auf zahlreiche Metaboliten des Energiestoffwechsels hin untersucht. Außer den energiereichen Phosphaten, die auch in den Gehirnschnitten bestimmt wurden, konnten die relativen Konzentrationen des neuronalen Markers N-Acetyl-Aspartat (NAA), der Neurotransmitter Glutamat (Glu), von Aspartat (Asp), von γ-Aminobuttersäure

(GABA), der zellulären Osmolyte Taurin, Myoinositol und Laktat als cytosolisches Endprodukt der Glykolyse ermittelt werden. Als Maßstab für das Verhältnis der Aktivitäten des Citratzyklus zur Glykolyse wurde die Summe der Signalintensitäten der Metaboliten Glu+Glutamin+Asp+GABA+NAA+Oxalacetat zu Laktat in Relation gesetzt. Da Glu, Asp, GABA und NAA aus Zwischenstufen des Citratzyklus synthetisiert werden, können diese auch als Marker für den mitochondrialen Glukosestoffwechsel benutzt werden. Es zeigte sich eine deutliche Inhibition des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch Ciclosporin, wobei nicht genau bestimmt werden konnte, an welchen Punkten diese stattfindet. Sämtliche messbare Metabolite des Citratzyklus beziehungsweise deren Folgeprodukte waren bis auf 60% der Kontrolle abgesenkt, wohingegen Laktat als Marker für die cytosolische Glykolyse stark erhöht war (140% der Kontrolle).

Die Auswirkungen von Sirolimus und Everolimus auf den Energiestoffwechsel unterschieden sich von denen des Ciclosporins, zeigten jedoch zueinander ein ähnliches Muster. Beide Makrolide erhöhten die Konzentration von Glutamin gegenüber der Kontrolle, während die Konzentrationen der restlichen Marker des mitochondrialen Glukosestoffwechsels leicht verringert waren. Im Gegensatz zu Ciclosporin führten Sirolimus und Everolimus zu einem niedrigeren Laktatgehalt von bis zu 70% der Kontrolle, was insofern nicht überraschend war, da beide sowohl antibiotische als auch antiproliferierende Eigenschaften besitzen. Die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus verschlimmerte den Energiehaushalt im Gehirngewebe dramatisch. Alle Werte waren gegenüber der Ciclosporinmonotherapie zusätzlich verringert und auch Laktat fiel auf 53% der Kontrolle. Everolimus hingegen verbesserte den durch Ciclosporin hervorgerufenen schlechten Energiezustand, ohne jedoch die Kontrollwerte zu erreichen. Die Konzentrationen der energiereichen Phosphate wurden auf 74% erhöht. Diese betrugen bei Ciclosporinmonotherapie 30% und in der Kombinationstherapie Ciclosporin + Sirolimus sogar nur 22% der Kontrolle (Serkova, 2001). Untersuchungen der Konzentrationen der einzelnen Medikamente im Blut und im Gehirn der behandelten Ratten zeigten einen deutlichen Einfluss von Sirolimus auf die Verteilung von Ciclosporin im Organismus. In der Kombinationstherapie von Ciclosporin und Sirolimus waren sowohl im Blut und im Gehirn, als auch in den Mitochondrien der Hirnzellen die Ciclosporinkonzentrationen erhöht, während hingegen Everolimus die Konzentration von Ciclosporin in den Mitochondrien auf weniger als die Hälfte reduzierte.

1.3 Klinische Relevanz

Sirolimus befindet sich seit zwei Jahren in der klinischen Phase IV nach der FDA-Zulassung für die gemeinsame Anwendung mit Ciclosporin an nierentransplantierten Patienten. Dabei wurden in Patienten, die zusätzlich mit Sirolimus behandelt wurden, höhere Kreatininserumkonzentrationen gefunden (Kahan, 2000; 2002). Die Kreatininausschüttung (*creatinine clearance*) durch die Niere dient als Maßstab für die Nierenfunktion und ist selbst Abbauprodukt des hauptsächlich in Muskeln befindlichen Kreatins. Aus Untersuchungen an Ratten ist bekannt, dass Sirolimus als Monotherapie keine Auswirkungen auf die Nierenfunktion hat (DiJoseph et al., 1992). Auch im Menschen besitzt Sirolimus alleine kein nephrotoxisches Potential, überraschenderweise zeigt sich aber in der klinischen Anwendung eine synergistische Verstärkung der Ciclosporintoxizität durch Sirolimus. Zugleich offenbarte sich eine pharmakokinetische Wechselwirkung zwischen Sirolimus und Ciclosporin. In der kombinierten Anwendung von Sirolimus und Ciclosporin erhöhte sich die Blutkonzentration von Ciclosporin gegenüber Behandlungen ohne Sirolimusgabe. Die verabreichte Ciclosporindosis konnte somit gesenkt werden, um die gewünschten Blutkonzentrationen zu erreichen und ohne die immunsuppressive Wirkung zu vermindern (Kahan, 2000; 2002). Ob dies auf Einflüsse des Metabolismus, der Aufnahme oder der Verteilung im Körper zurückzuführen ist, ist bis jetzt nicht genau bekannt. Ciclosporin und Sirolimus werden jedoch beide von der Cytochrom P450-3A4 Isoform des Cytochrom P450 Systems metabolisiert und sind zudem beide Substrate derselben Art P-Glykoprotein, das für die Aufnahme der Medikamente in die Zelle eine wichtige Rolle spielt. Sirolimus erhöhte zudem auch in Tierversuchen die Ciclosporinkonzentration in Nierengewebe (Napoli et al., 1998). Die Anwendung von Everolimus, welches sich momentan in der klinischen Phase III für Kombinationstherapien mit Ciclosporin befindet, erwies sich in den bisher durchgeführten Studien als vorteilhaft. In einer Studie war es durch die gemeinsame Gabe von Ciclosporin und Everolimus möglich die Ciclosporindosis um 65% zu senken, ohne Einbußen bei der immunsuppressiven Wirkung hinnehmen zu müssen. Diese Dosissenkung führte zudem zu verringerten Kreatininwerten. Eine Verstärkung der Ciclosporintoxizität wie bei der Anwendung mit Sirolimus wurde nicht beobachtet (Curtis et al., 2001).

1.4 Aufgabenstellung

Die drei Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus zeigten unterschiedliche Wirkungen auf den Energiestoffwechsel von Gehirnzellen im Allgemeinen und auf den Stoffwechsel der energiereichen Phosphate Phosphokreatin und der Nucleosidphosphate im Speziellen. In dieser Arbeit soll an verschiedenen Modellen für das Gehirn gezeigt werden, dass Ciclosporin den mitochondrialen Metabolismus beeinflusst, also eine metabolische Toxizität besitzt. Für Sirolimus und Everolimus soll belegt werden, dass ihr Einfluss hauptsächlich auf Einwirkungen auf die cytosolische Glykolyse beruht. Dies wird insbesondere unter der Beachtung der Wechselwirkungen der Medikamente untereinander bei Kombinationsbehandlungen vorgenommen. Zur Untersuchung cytotoxischer Wirkungen der drei Stoffe auf den Gesamtzustand der Zelle werden verschiedene Aspekte oxidativen Stresses und der Apoptose und Nekrose betrachtet. Die Vorgehensweise sieht wie folgt aus.

I. Oxidativer Stress, Apoptose und der Glukosemetabolismus werden *in vitro* an den folgenden drei Modellen untersucht:

- Gehirnschnitte von einer Woche alten Wistar-Ratten
- Primäre Astrozyten von zwei Tage alten Wistar-Ratten
- C6-Glioma Zellen

II. Aufbauend darauf werden *in vivo* Behandlungen an erwachsenen und zwei Wochen alten, Wistar Ratten mit klinisch relevanten Konzentrationen der Medikamente durchgeführt. Zur genauen Klärung der metabolischen Toxizität werden die Aktivitäten einiger Enzyme des Energiestoffwechsels ermittelt und als Parameter für die Cytotoxizität werden zudem verschiedene Aspekte oxidativen Stresses betrachtet. Der Energiemetabolismus wird an Gehirnextrakten mittels NMR-Spektroskopie, so genannten metabonomischen Studien, untersucht. Die Untersuchungen an zwei Wochen alten Ratten dienen zum einen der Korrelation zu den Ergebnissen der Gehirnschnitte und zum anderen dem Vergleich mit der erwachsenen Ratte. Da die jungen Ratten noch keine voll entwickelte Bluthirnschranke besitzen wird es so möglich Unterschiede in der Verteilung und Aufnahme der Immunsuppressiva aufzudecken. Dabei interessieren insbesondere wieder die Wechselwirkungen der Medikamente in der Kombinationstherapie untereinander.

III. Um die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik von Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus näher zu beleuchten, werden zur Gewährleistung einheitlicher Bedingungen Untersuchungen an erwachsenen, männlichen Ratten vorgenommen. Vergleichende Studien an weiblichen Ratten und an zwei Wochen alten Ratten schließen sich dem an. Die Hypothese ist, dass Ratten verschiedenen Geschlechts und Alters eine unterschiedliche P-Glykoproteinexpression besitzen. Dies würde zu verschiedenen Aufnahmeverhalten der Immunsuppressiva in das Gehirn durch die Blut-Hirnschranke führen. Das P-Glykoprotein (P-gp; *„efflux protein“*) ist Teil dieser Barriere zwischen Blutstrom und Hirnflüssigkeit und ist für die Aufnahme der Medikamente in das Gehirn mit verantwortlich. Die Expression des P-gp im Gehirn und weitere Enzymaktivitäten werden bestimmt.

IV. Da die Niere das Hauptziel für Ciclosporintoxizität darstellt (Kahan, 1989), wird ein Teil der unter II. beschriebenen Methoden zur Untersuchung des Nierenmetabolismus behandelter Ratten angewendet.

2. Ergebnisse und Diskussion – *in vitro*

2.1 Verwendete Immunsuppressivakonzentrationen

Eine Schwierigkeit der Medikamentenanwendung ist die möglichst genaue Regulierung ihrer Konzentration im Körper, so dass die bestmögliche therapeutische Wirkung erzielt und gleichzeitig das Auftreten von Nebenwirkungen am geringsten gehalten wird. Diese so genannte therapeutische Konzentrationsbreite gibt zum einen an, wie hoch die Dosis maximal sein darf um eine therapeutische Wirkung ohne lebensbedrohliche Toxizität zu erzielen. Zum anderen enthält sie welche Dosis mindestens gegeben werden muss, um überhaupt eine Wirkung zu erzielen. Diese Breite variiert nicht nur von Medikament zu Medikament, sondern auch von Patient zu Patient und wird durch zahlreiche Parameter wie zum Beispiel die Aktivität der Leberenzyme beeinflusst. Da die drei hier untersuchten Immunsuppressiva bereits alle klinischen Pharmakokinetik- und Pharmakodynamik-Studien hinter sich haben und Ciclosporin bereits seit Jahrzehnten im klinischen Bereich verwendet wird, sind die jeweiligen therapeutischen Konzentrationsbereiche hinlänglich bekannt. Basierend auf diesen Erfahrungen wurden für die *in vitro* Inkubationen Konzentrationen benutzt, die der klinischen Anwendung entsprachen (Kahan, 1989; 2000; Dumont, 2001). Das therapeutische Fenster für Ciclosporin beträgt etwa 100-500 ng/ml Serumkonzentration entsprechend 0,0831 – 0,415 µM (Kahan, 1989). Für Sirolimus und Everolimus wurden ebenso bemessene und an Ciclosporin angepasste Konzentrationen benutzt (Tab. ***2.1***). Für die cytotoxischen Untersuchungen an primären Astrozyten mussten sehr viel höhere Konzentrationen verwendet werden, da sich Effekte teilweise erst bei hundertfachen Konzentrationen der klinischen Anwendungen zeigten.

Tabelle 2.1 : Inkubationsdaten für die *in vitro* Versuche

	Oxidativer Stress / NMR [µg/L] / [µM]	**Apoptose / Nekrose / LDH / MTT [µg/L] / [µM]**
Ciclosporin	500 / 0,415	6000-60000 / 5-50
Sirolimus	100 / 0,1095	1200-12000 / 0-13
Everolimus	100 / 0,1045	1200-12000 / 0-13

2.2 Cytotoxizität

Die Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mit dem MTT-Test gibt erste Hinweise auf die Toxizität einer Substanz (Hansen et al., 1989; Berridge et al., 1996). Die primären Astrozyten als eines der verwendeten Modelle tolerierten die Immunsuppressiva über 24 Stunden auch mit sehr hohen Konzentrationen sehr gut. Erst ab Konzentrationen die etwa dem 400fachen der klinisch verwendeten Menge von Sirolimus und Everolimus entsprechen, starben die Zellen großmaßstäblich ab (Abb. **2.2**).

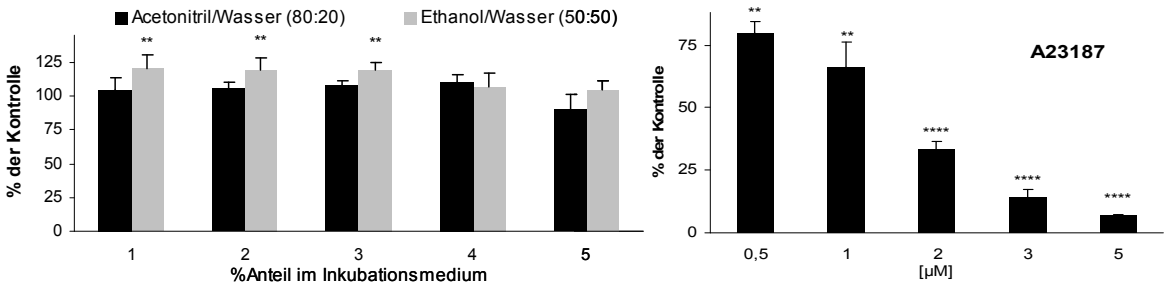


Abbildung 2.1: Cytotoxizität verwendeter Lösungsmittel und Positivkontrolle

Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen in primären Astrozyten nach 24 Stunden Inkubation mit den verwendeten Lösungsmitteln der Immunssupressiva und mit dem Apoptose induzierendem Calciumionophor A23187.
Ergebnisse des TTest gegen die Kontrolle: ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P<0,0001

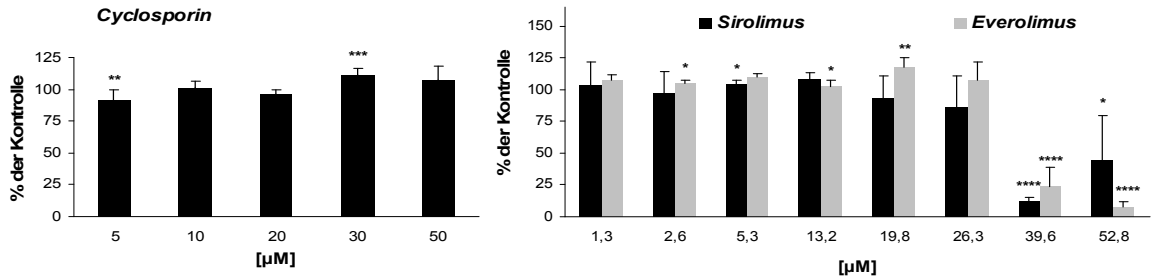


Abbildung 2.2: Cytotoxizität von Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus

Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen in primären Astrozyten nach 24 Stunden Inkubation mit den drei Immunssupressiva. ** P < 0,01; *** P < 0,001

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Zellen ebenfalls gut vertragen, wobei bei allen folgenden Inkubationen darauf geachtet wurde, dass ihr Anteil nicht deutlich über 1% lag. Abbildung **2.1** zeigt die Positivkontrolle für absterbende Astrozyten. Es wurde das Calciumionophor A23187 verwendet, das unter anderem in Gehirnzellen zeit- und konzentrationsabhängig Zellsterben induziert (Petersén et al., 2000).

Zusammenfassung 2.2: Keines der drei Immunsuppressiva zeigte *in vitro* im therapeutischen Rahmen Cytotoxizität an Gehirnzellen.

2.3 Oxidativer Stress

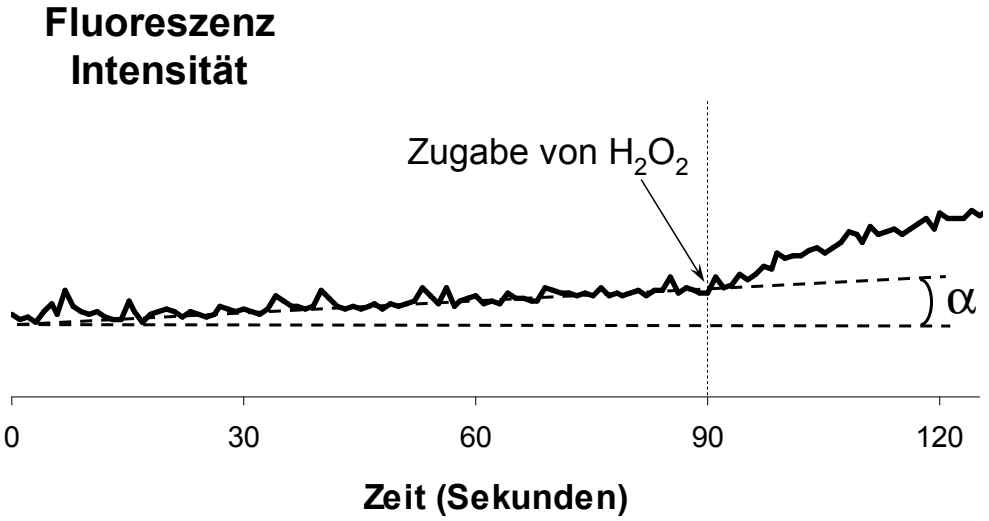


Abbildung 2.3: Bestimmung von oxidativem Stress

Der Anstieg in der Fluoreszenzintensität, berechnet aus dem Winkel α, korreliert mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Wasserstoffperoxid (H_2O_2; Endkonzentration 0,5 µM) wurde dazugegeben um die Aufnahme von DCFH zu überprüfen.

Die Cytotoxizität von Ciclosporin und insbesondere der durch Ciclosporin verursachte oxidative Stress wurden bisher hauptsächlich in Zellen nichtzerebralen Ursprungs untersucht (Wolf et al., 1997; Nguyen et al., 1999; Haberland et al., 1997; López-Ongil et al., 1998). Daher wurden perfundierte, lebende Gehirnschnitte als *ex vivo* - und primäre Astrozyten und C6-Glioma-Zellen als *in vitro* - Modelle für das Rattenhirn benutzt. Der oxidative Stress wurde mit einem Fluoreszenzassay bestimmt, dessen Prinzip in Abbildung **2.3** dargestellt ist. Der Anstieg in der Fluoreszenzintensität über einen gegebenen Zeitraum entspricht der

Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle beziehungsweise dem Gewebe. Somit erhält man eine Aussage darüber, ob das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und ROS-Abbau gestört ist.

2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies durch Immunsuppressiva - Gehirnschnitte

2.3.1.1 Kurzzeit-Inkubationen

Die Gehirnschnitte wurden für je drei Stunden mit den Immunsuppressiva alleine oder der Kombination mit Ciclosporin inkubiert. Die Werte für Gehirnschnitte sind als

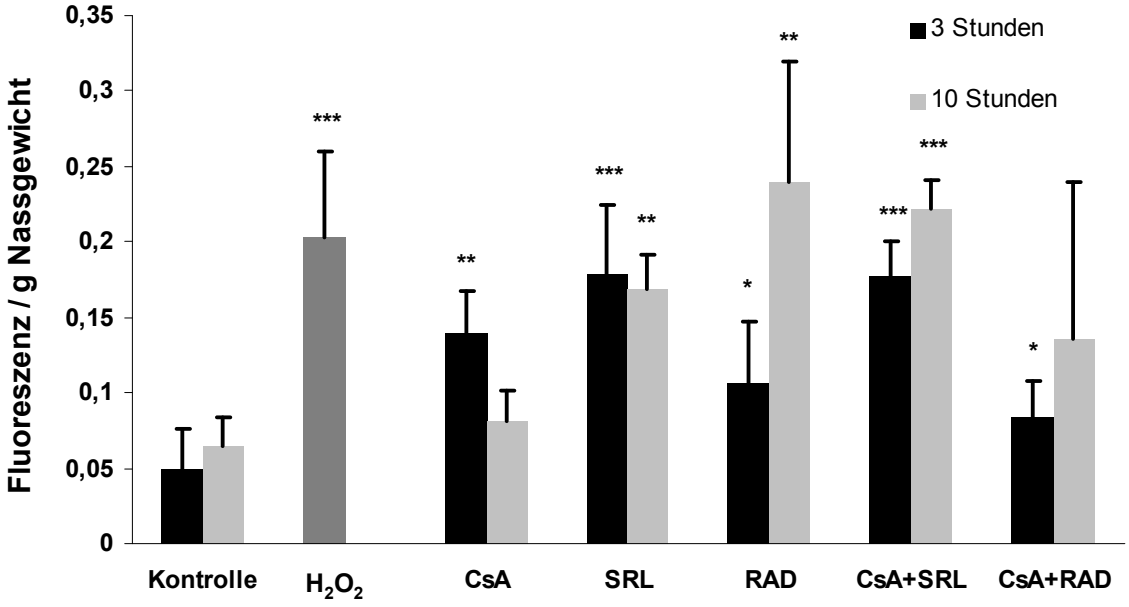


Abbildung 2.4: Oxidativer Stress in Gehirnschnitten

Rattengehirnschnitte wurden 3 oder 10 Stunden mit den Immunsuppressiva perfundiert. Inkubation mit 1 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 30 Minuten diente als positive Kontrolle für oxidativen Stress. Die Standardabweichungen entstammen drei bis sechs Experimenten. Ergebnisse des TTest gegen die Kontrolle: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Fluoreszenzintensitätsanstieg je Gramm Nassgewicht angegeben. Als Positivprobe für oxidativen Stress wurde halbstündige Inkubation mit 1 mM Wasserstoffperoxid vorgenommen. Die Kontrolle wurde mit einer entsprechenden Menge des Lösungsmittels Acetonitril/H_2O (80:20) behandelt, wobei dessen Endkonzentration immer unter 1% lag. In den Gehirnschnitten führten alle Medikamente nach drei Stunden Perfusion zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. **2.4**). Der höchste Wert wurde durch die halbstündige Inkubation mit Wasserstoffperoxid verursacht (0,203 ± 0,06) und der

normale Level an reaktiven Sauerstoffspezies in Rattenhirnschnitten lag bei 0,049 ± 0,027 relativem Fluoreszenzanstieg je Gramm Nassgewicht. Sirolimus und die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus produzierten die höchsten durch die Immunsuppressiva verursachten Werte an oxidativem Stress (Sirolimus: 0,179 ± 0,045; Ciclosporin+Sirolimus: 0,178 ± 0,022). Everolimus hingegen erhöhte den oxidativen Stress im Gewebe nur leicht (0,106 ± 0,042), verhinderte aber den durch Ciclosporin verursachten Anstieg der reaktiven Spezies (Ciclosporin+Everolimus: 0,084 ± 0,024; Ciclosporin: 0,140 ± 0,027). Der TTest hierfür ergab einen Wert von $P<0,01$ für den Vergleich der kombinierten Therapie gegen die Ciclosporinmonotherapie.

2.3.1.2 Langzeit-Inkubationen

Anders sah die Situation nach 10 Stunden Inkubation unter ansonsten gleichen Bedingungen aus (Abb. **2.4**). Der oxidative Stress in den mit Ciclosporin perfundierten Gehirnschnitten lag nur geringfügig über dem Kontrollwert (Kontrolle: 0,065 ± 0,019; Ciclosporin: 0,081 ± 0,02). Sirolimus und die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus führten jedoch auch nach 10 Stunden wieder zu stark erhöhten Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (Sirolimus: 0,169 ± 0,022; Ciclosporin+Sirolimus: 0,222 ± 0,020). Obwohl Everolimus in der Kurzeitinkubation der durch Ciclosporin verursachten Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies entgegenwirkte (siehe Abschnitt 2.3.1.1), war der nach zehn Stunden Kombitherapie mit Ciclosporin und Everolimus gemessene oxidative Stress nicht statistisch signifikant zur Kontrolle. Alle gemessenen Werte der Perfusionen an denen Sirolimus oder Everolimus beteiligt waren, lagen über den Ciclosporinwerten.

2.3.1.3 Einfluss des Antioxidationsmittel Vitamin E

Das als Radikalfänger bekannte Vitamin E (α-Tocopherol) hatte einen deutlichen, protektiven Effekt bezüglich durch Ciclosporin verursachten oxidativen Stress. Vitamin E bei einer Konzentration von 500 µM senkte die Menge reaktiver Spezies sowohl nach 3 Stunden Inkubation mit Ciclosporin, als auch nach der Langzeitperfusion für 10 Stunden. Die Perfusion mit 500 µM Vitamin E alleine führte nicht zu oxidativem Stress (Abb. **2.5**).

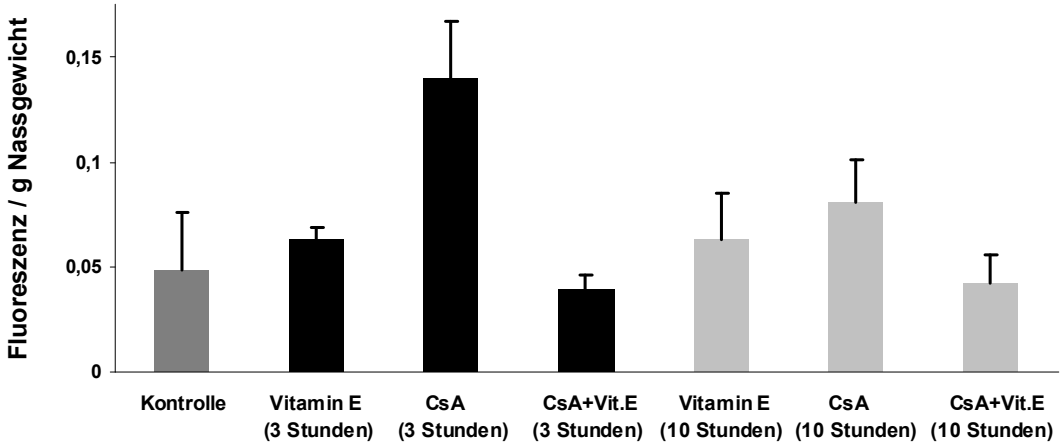


Abbildung 2.5: Einfluss von Vitamin E auf CsA-induzierten oxidativen Stress

Die Gehirnschnitte wurden mit Ciclosporin und/oder Vitamin E (500 µM) inkubiert. * P < 0,05

2.3.2 Reaktive Sauerstoffspezies durch Immunsuppressiva - Zellkulturen

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sind als Intensitätsanstieg je Gramm Protein, bestimmt nach Bradford, angegeben. Mit Ausnahme der Monoinkubationen mit Sirolimus und Everolimus waren die gefundenen Werte für oxidativen Stress in primären Astrozyten durchgehend höher als in der Tumorzelllinie C6 (Abb. **2.6**), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Zellen tumorösen Ursprungs allgemein resistenter sind als andere Zelltypen. Wie bei den Gehirnschnitten wurde auch bei den primären Astrozyten der höchste oxidative Stress nach 30 Minuten Inkubation mit Wasserstoffperoxid verursacht (relativer Fluoreszenzanstieg je mg Protein: 13,51 ± 4,13). Im Gegensatz zu den Gehirnschnitten war jedoch der Level reaktiver Sauerstoffspezies durch Sirolimus nicht höher als der durch Ciclosporin verursachte (Sirolimus: 7,59 ± 1,45; Ciclosporin: 9,97 ± 0,84). Ebenso wenig war ein signifikanter Unterschied zwischen Ciclosporinmonotherapie und der Kombinationstherapie mit Sirolimus feststellbar (Ciclosporin+Sirolimus: 10,90 ± 1,05). Everolimus hatte in primären Astrozyten auch keinen senkenden Einfluss auf durch Ciclosporin verursachten oxidativen Stress (Ciclosporin+Everolimus: 10,18 ± 0,57).

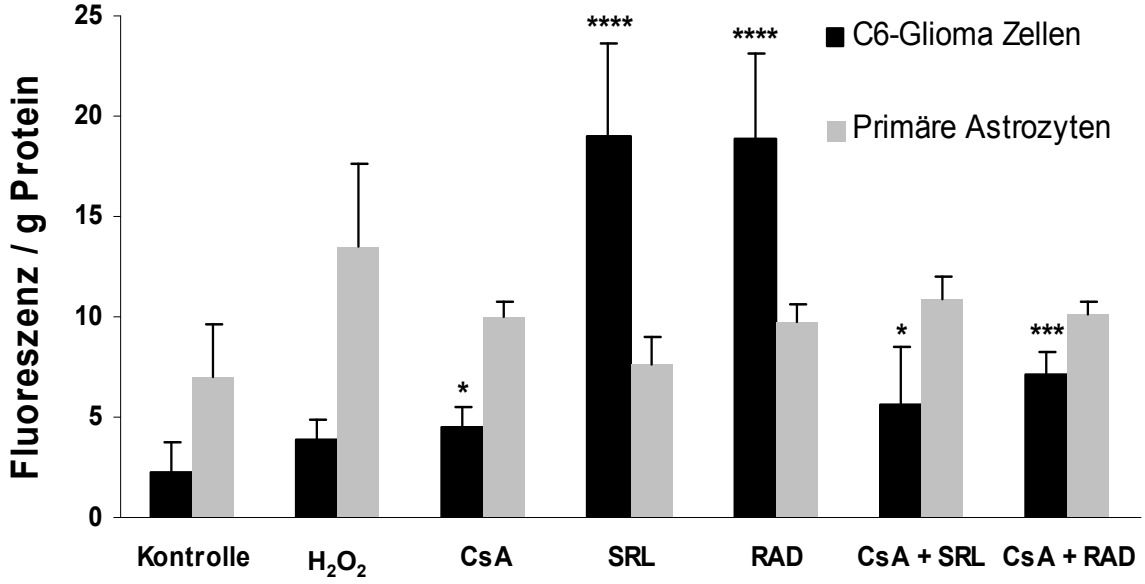


Abbildung 2.6: Oxidativer Stress in Zellkulturen

Primäre Astrozyten und C6-Glioma-Zellen wurden 3 Stunden mit den Immunsuppressiva inkubiert. Inkubation mit 100 µM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 30 Minuten diente als positive Kontrolle für oxidativen Stress. Die Standardabweichungen entstammen drei bis sechs Experimenten. Ergebnisse des TTest gegen die Kontrolle: * P < 0,05; *** P<0,0001

Die C6-Glioma-Zellen waren das einzige Modell, in dem die Inkubation mit Wasserstoffperoxid nicht zum höchsten Wert im Fluoreszenzanstieg führte, was sich ebenfalls wieder durch die höhere Resistenz der Zellen begründen lässt. Stattdessen zeigten die Inkubationen mit Sirolimus und Everolimus stark erhöhte Werte reaktiver Spezies, die 3 bis 4 mal so groß waren wie andere gemessene Werte (Abb. **2.6** – Anstieg der DCF-Fluoreszenzintensität je Gramm Protein, Sirolimus: 18,94 ± 4,7; Everolimus: 18,86 ± 4,3). Diese schwere Störung des ROS-Gleichgewichtes ist vermutlich auf die antiproliferierenden Eigenschaften von Sirolimus und Everolimus zurückzuführen, die insbesondere auf die schnell wachsenden Tumorzellen Einfluss haben (Brazelton und Morris, 1996; Solomon et al. 1998). Nepomuceno et al. (2003) konnten zeigen, dass Sirolimus nicht nur wachstumsinhibierend auf Zellen eines B-Zell-Lymphoms wirkte, sondern in diesen auch Apoptose induzierte. Alle anderen Inkubationen mit C6-Zellen erhöhten den Level an reaktiven Sauerstoffspezies etwa im selben Ausmaß (Abb. **2.6**).

Zusammenfassung 2.3: Ciclosporin führte in perfundierten Gehirnschnitten nach drei Stunden zu einer erhöhten Produktion von ROS, nach zehn Stunden jedoch nicht. Dabei

könnte es sich um Adaptionsprozesse der Zellen handeln. Sirolimus erhöhte in Kombination mit Ciclosporin synergistisch die Entstehung reaktiver Spezies sowohl nach drei, als auch nach zehn Stunden Behandlungszeit. Im Gegensatz dazu, antagonisiert Everolimus die negative Wirkung von Ciclosporin, in dem Sinne das weniger ROS als nach der Monobehandlung mit Ciclosporin entstanden. Somit lässt sich bezüglich der Entstehung von oxidativem Stress die folgende Reihe aufstellen: CsA+Srl >> CsA >> CsA+RAD

Die Gehirnschnitte erwiesen sich als viel empfindlicher gegenüber dem durch Ciclosporin induzierten oxidativen Stress, als die primären Astrozyten und die Gliomazellen. Die Gehirnschnitte stellen somit das bessere Modell für die Untersuchung der Neurotoxizität der Immunsuppressiva dar. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden als Publikation beim „*British Journal of Pharmacology and Biochemical Pharmacology*“ eingereicht und befinden sich zur Zeit in Überarbeitung.

2.4 Apoptose

Der Tod kann eine Zelle auf zwei prinzipiell verschiedene Arten ereilen. Die Nekrose beschreibt einen durch äußere Einwirkungen herbeigeführten, passiven Zelltod. Charakteristisch ist unter anderem ein Anschwellen der Zellen, was zumeist zum Zerplatzen und unkontrolliertem Freiwerden cytoplasmatischer Bestandteile führt, worauf eine Entzündungsreaktion folgen kann. Auf der anderen Seite steht ein aktiv gesteuertes

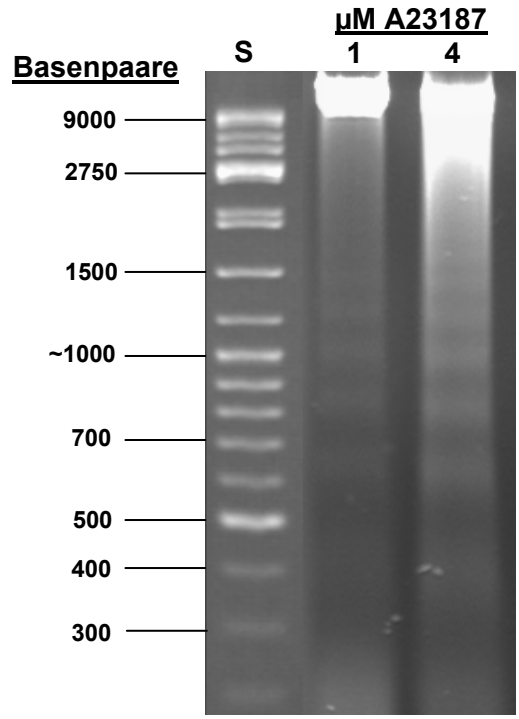


Abbildung 2.7: A23187-induzierte Apoptose

Primäre Astrozyten wurden für 24 Stunden mit dem Calciumionophor A23187 inkubiert. Mit 1 µM A23187 zeigt sich ein deutliches Leitermuster als Zeichen für Apoptose. Der starke Hintergrund der Bande bei 4 µM weist auf sekundäre Nekrose hin. A23187 hatte sich mit MTT in dieser Konzentration für primäre Astrozyten als sehr toxisch erwiesen (Kapitel 2.2). Als Standard (S) wurde ein Mix aus DNA-Fragmenten in der Größe von 100 bis 10000 Basenpaaren benutzt.

Selbstmordprogramm, die Apoptose, bei der keine Entzündungsreaktionen zu beobachten sind. Stattdessen zerfällt die Zelle gezielt in membranumschlossene Abschnürungen („apoptotic bodies"), die von anderen Zellen und Fresszellen aufgenommen und wiederaufbereitet werden. Die Apoptose auslösenden Signale sind so zahlreich und verschiedenen wie komplex. Ob eine Zelle Selbstmord begeht hängt von vielen sich teilweise gegenseitig beeinflussenden Faktoren ab (Ashe und Berry, 2003; Robertson und Orrenius, 2002; Reed, 2000; Kroemer et al., 1998). Es gibt einige charakteristische Punkte, die beobachtet werden können. Sobald jedoch erst das Auflösungsprogramm angelaufen ist, sieht der Zelltod immer gleich aus.
Ein bereits relativ später Schritt ist das Zerschneiden der DNA durch Endonukleasen in der Linkerregion zwischen den Histonen in Fragmente, deren Größe jeweils ein Vielfaches von 180 Basenpaaren beträgt. Nach Isolation der DNA und anschließender Auftrennung mittels Gelelektrophorese lässt sich im Falle von Apoptose ein „Leiter"-Muster erkennen. Eine vollständig verschmierte Bande mag ein Anzeichen von Nekrose sein, da diese völlig verschieden große Bruchstücke der DNA hervorrufen würde. Jedoch besteht in der Zellkultur das Problem, dass apoptotische Zellen nicht wie im Organismus aufgelöst werden, so dass eine so genannte „sekundäre Nekrose" auftreten kann. Diese würde eventuelle Anzeichen von Apoptose überdecken. Eine durchgehende Bande ließe also keine konkrete Aussage zu, wohingegen eine vollständig leere Bande sowohl Nekrose als auch Apoptose ausschließt.

Die Inkubation primärer Astrozyten mit klinisch relevanten Konzentrationen der Immunsuppressiva jeweils alleine oder mit den jeweiligen Kombinationen mit Ciclosporin erbrachte keine Hinweise auf DNA-Fragmentierung oder Nekrose. Da die primären Astrozyten ein dem *in vivo*-Zustand näheres Modell darstellen, als die ebenfalls verwendeten C6-Zellen wurde auf Versuche mit C6-Zellen verzichtet. Weil die primären Astrozyten jedoch auch immer neugeborene Wistar-Ratten erfordern, wurde ebenfalls auf die denkbaren und zahlreichen möglichen Kombinationsinkubationen verzichtet, zumal die verwendeten Konzentrationen keine klinische Relevanz mehr besitzen. Und die Untersuchungen der Cytotoxizität mit MTT zeigten eine gute Toleranz der Medikamente bis hin zu hohen Konzentrationen (Kapitel 2.2).
Die primären Astrozyten wurden für 24 Stunden mit den Ciclosporinkonzentrationen 0, 5, 10, 20 und 50 µM inkubiert. Gemäß den Verhältnissen der Kombinationsbehandlungen an

Gehirnschnitten wurden Sirolimus- und Everolimuskonzentrationen von je ca. 1,3; 2,6; 5,3 und 13,2 µM benutzt. Abbildung **2.7** zeigt die Ergebnisse mit dem bereits für die MTT-Versuche benutzten Calciumionophor A23187. Dieses induzierte bereits bei einer Konzentration von 1 µM nach 24 Stunden Apoptose, die deutlicher mit 4 µM sichtbar wurde. Mit 4 µM war jedoch auch deutlich eine Beteiligung von nekrotischen Prozessen zu erkennen, wobei nicht unterschieden werden kann, ob es sich nur um sekundäre Nekrose handelte. Als Standard wurde jeweils ein DNA-Fragmentmix mit den angegebenen Größen verwendet.

Ciclosporin induzierte als einziges der Immunsuppressiva Apoptose beginnend bei einer Konzentration von 20 µM und sehr deutlich sichtbar bei 50 µM (Abb. **2.8**). Inkubiert wurde auch hier wieder für 24 Stunden. Mit Sirolimus und Everolimus wurden mit den oben angegebenen Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubationszeit weder Anzeichen von Apoptose noch von Nekrose gefunden.

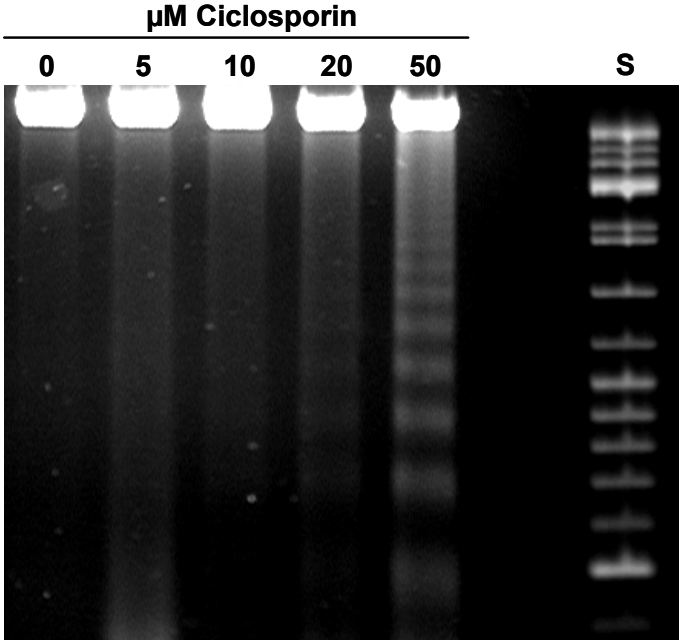


Abbildung 2.8: Ciclosporin-induzierte Apoptose

Primäre Astrozyten wurden 24 Stunden mit Ciclosporin inkubiert.

Zusammenfassung 2.4: Ciclosporin verursachte Apoptose in primären Astrozyten, allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie macht es möglich Veränderungen der Zelle leicht visuell zu erfassen. Im Laufe apoptotischer Prozesse erfährt eine betroffene Zelle teilweise drastische und teilweise subtile Veränderungen in ihrer Struktur, in ihrem „Aussehen“. Diese können bereits durch Lichtmikroskopie erkannt werden. So kann Apoptose zu Schwellungen des Zellkörpers oder zum so genannten „cell-blebbing“ führen, der Ausbildung einer Struktur, die im Mikroskop wie Blasen in der Zelle aussieht. Im Falle von Nekrose könnte die Zelle unkontrolliert platzen und in zahlreiche Bruchstücke zerfallen. Neben den durchlichtmikroskopischen Aufnahmen erlaubt die Fluoreszenzspektroskopie subtilere Veränderungen der Zellen zu erkennen. So kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimid) zum Beispiel die apoptotische Kernfragmentation erkannt werden.

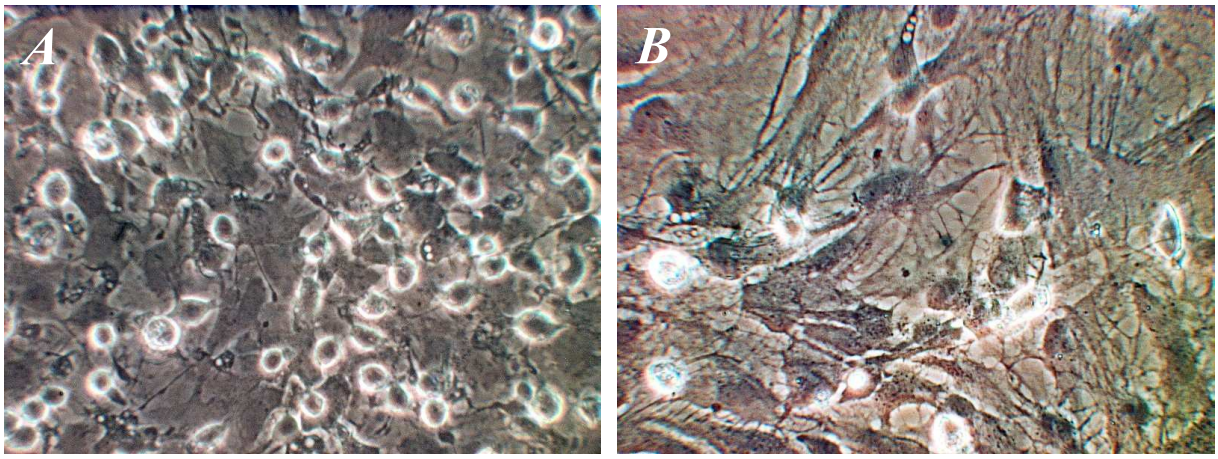


Abbildung 2.9:
Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Astrozyten nach 21 Tagen Wachstumszeit (Vergrößerung 400-fach)

Die Abbildungen **2.9A** und **2.9B** zeigen Durchlichtaufnahmen primärer Astrozyten nach 21 Tagen Wachstumszeit. Die vollständige Konfluenz der Astrozyten wie in Abbildung **2.9A** zu sehen, wurde nur bei ca. 90% der angesetzten Kulturen erreicht. Eine längere Kulturzeit als 21 Tage hätte jedoch das Risiko von Pilzinfektionen nur unnötig erhöht.
In den Abbildungen **2.9B** und **2.10A** sind die für Astrozyten typischen, strahlenförmig nach außen verlaufenden Fortsätze deutlich sichtbar. Dieser Ähnlichkeit zu „berstenden Sternen“ verdanken Astrozyten ihren Namen. Neben dieser Struktur können Astrozyten noch in mehreren Varianten erscheinen, z.B. flach und sehr dünn oder auch lang gezogen (vergleiche dazu auch Nauta und Feirtag, 1990).

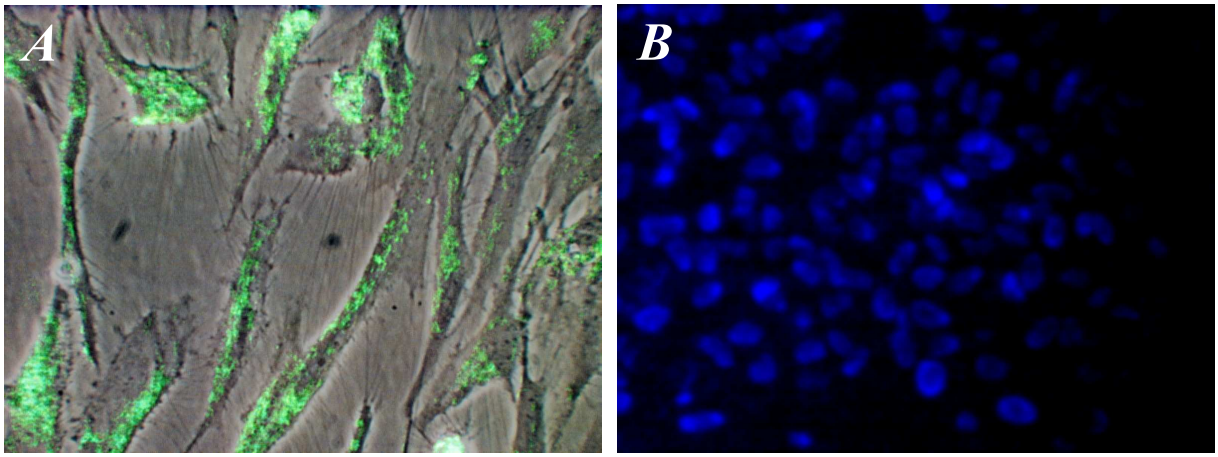


Abbildung 2.10:

Lichtmikroskopische und Fluoreszenzaufnahmen von primären Astrozyten nach 21 Tagen Wachstumszeit (Vergrößerung 400-fach)

A Komposition einer Durchlichtaufnahme mit der Fluoreszenz von Rhodamin123
B Aufgehellte und farblich intensivierte Aufnahme von Hoechst 33258-Fluoreszenz nach Inkubation mit 1,2% Acetonitril/H_2O (80:20) für 24 Stunden

Die Abbildung **2.10A** stellt eine Komposition einer Durchlichtaufnahme und einer Fluoreszenzaufnahme dar. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123 wurden die Mitochondrien in unbehandelten Astrozyten sichtbar gemacht. Rhodamin 123 als positiv geladener Farbstoff wird aktiv in den Mitochondrien angereichert. Deutlich ist die Verteilung der Mitochondrien über den gesamten Zellkörper und deren Häufung um die Zellkerne zu erkennen. Eine Fluoreszenzaufnahme der Hoechst 33258-Fluoreszenz ist in Abbildung **2.10B** zu sehen. Diese Zellen wurden mit dem Lösungsmittel (Acetonitril/H_2O, 80:20) der Immunsuppressiva in der höchsten vorkommenden Konzentration von 1,2% für 24 Stunden inkubiert. Das Bild wurde stark aufgehellt und farblich intensiviert. Hoechst 33258 interkaliert mit Doppelstrang-DNA von Zellen und ist selbst membranpermeabel. Im Falle von Apoptose konzentriert sich der Farbstoff in Kernfragmenten, wodurch diese deutlich sichtbar werden. Die mit dem Lösungsmittelgemisch Acetonitril/H_2O (80:20) inkubierten Zellen zeigten keinerlei Anzeichen von Apoptose und die Morphologie war identisch mit der unbehandelter Zellen.

Das Calciumionophor A23187 wurde wieder als Positivkontrolle für Apoptose verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation mit 3 µM A23187 zeigten sich nicht nur deutliche morphologische Veränderungen der Zellen (Abbildung **2.11A**). Diese Konzentration ergab mit dem MTT-Cytotoxizitätstest weniger als 25% überlebende Zellen. In Abbildung **2.11B** ist deutlich zu erkennen, dass sich Mitochondrien mit intakter Membran nur noch um die

Kernbereiche der Zellen herum befinden. Ebenso wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33258 eine deutliche Kernfragmentierung entdeckt (Abbildung **2.11C**). Diese konnte bereits nach 24 Stunden Inkubation mit 1 µM A23187 beobachtet werden (Abbildung **2.11D**).

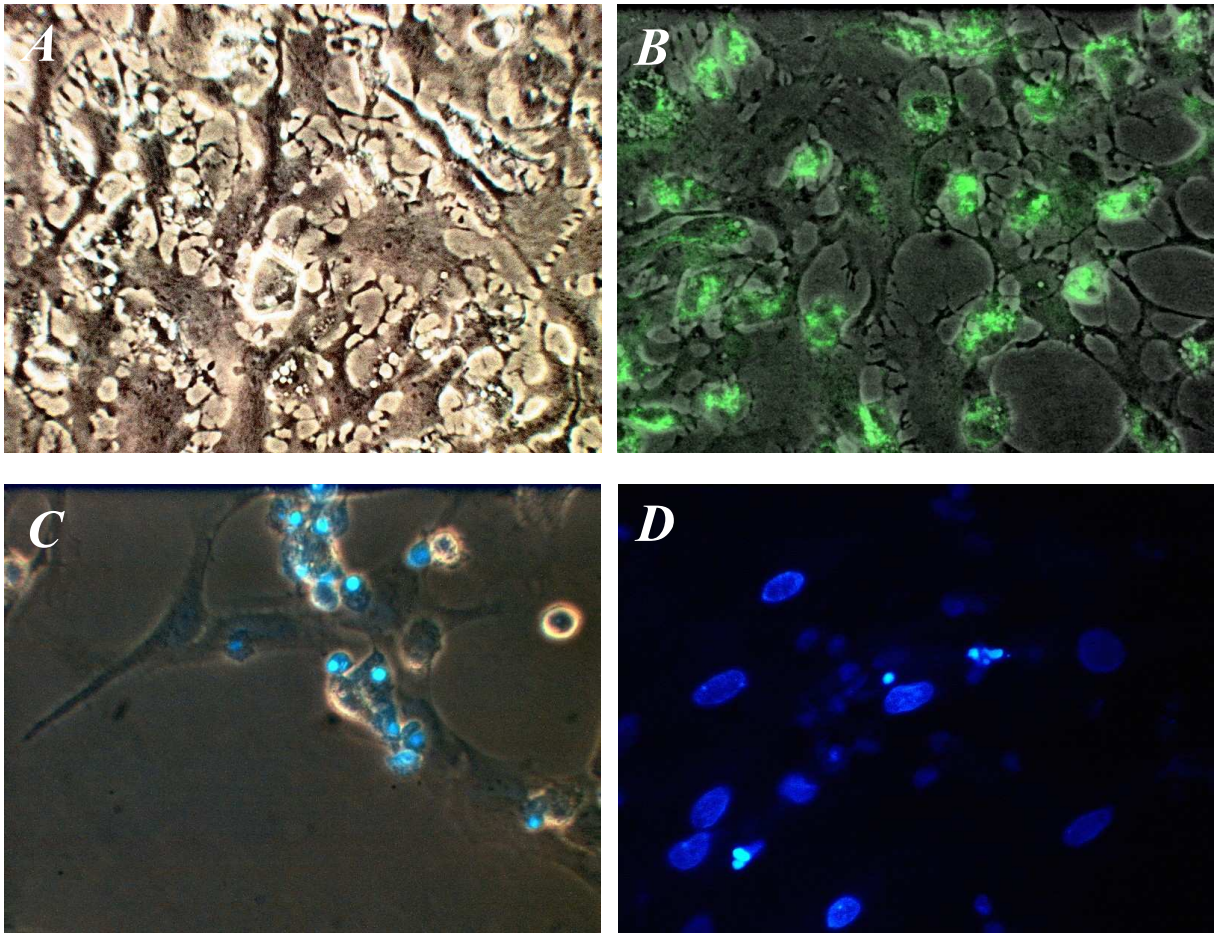


Abbildung 2.11:
Lichtmikroskopische und Fluoreszenzaufnahmen von primären Astrozyten (Vergrößerung 400-fach)

A Nach 24 Stunden Inkubation mit 3 µM A23187
B Nach 24 Stunden Inkubation mit 3 µM A23187; Komposition einer Durchlichtaufnahme mit der Fluoreszenz von Rhodamin 123
C Nach 24 Stunden Inkubation mit 3 µM A23187; Komposition einer Durchlichtaufnahme mit der Fluoreszenz von Hoechst 33258
D Nach 24 Stunden Inkubation mit 1 µM A23187; Fluoreszenz von Hoechst 33258

Die Abbildung **2.12** zeigt drei Kontrollaufnahmen desselben Astrozytenansatzes, von dem auch die nachfolgenden Bilder mit Ciclosporininkubationen stammen. Nach 24 Stunden Inkubation mit 20 µM Ciclosporin zeigten sich deutliche Veränderungen in der Morphologie. In Abbildung **2.13A** ist zu sehen, dass nicht nur einige Zellen zerstört waren, sondern auch die Anzahl der mit Rhodamin 123 angefärbten Mitochondrien geringer war

und diese erschienen nunmehr nur noch um die Zellkerne herum. In den Zellausläufern sind weitaus weniger Mitochondrien erkennbar als noch in Abbildung **2.10A**. Nach der Inkubation mit 20 µM Ciclosporin ähnelt die Verteilung der angefärbten Mitochondrien eher der, wie sie nach Inkubation mit dem Calciumionophor A23187 (Abbildung **2.11B**) zu beobachten war.

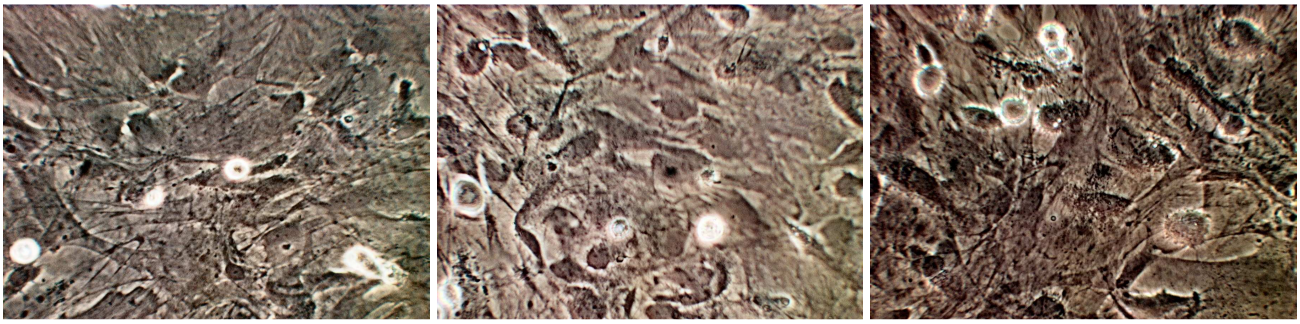


Abbildung 2.12:
Lichtmikroskopische Kontrollaufnahmen von primären Astrozyten (Vergrößerung 400-fach)

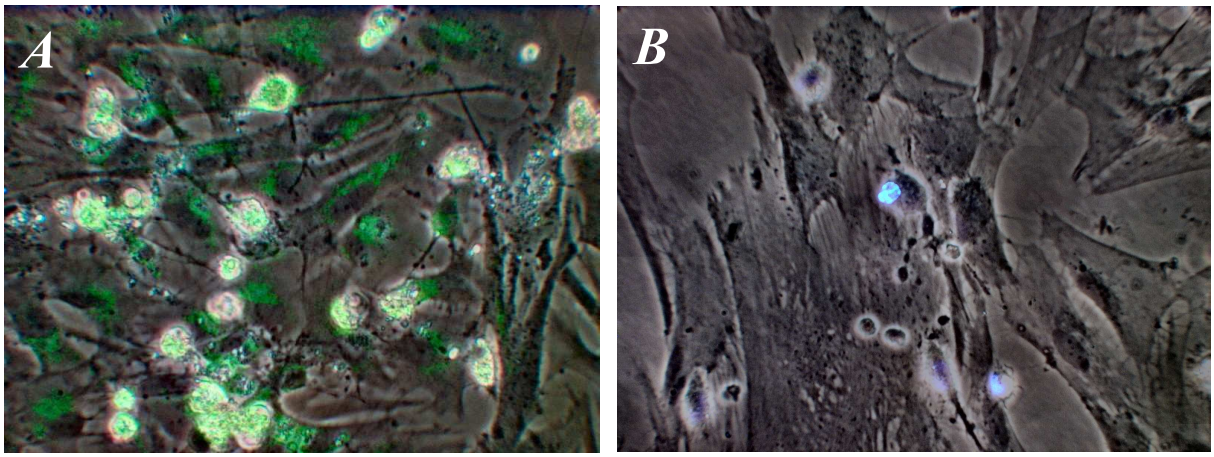


Abbildung 2.13:
Komposition aus Lichtmikroskopischen und Fluoreszenzaufnahmen von primären Astrozyten (Vergrößerung 400-fach)

A Nach 24 Stunden Inkubation mit 20 µM Ciclosporin; Rhodamin 123
B Nach 24 Stunden Inkubation mit 20 µM Ciclosporin; Hoechst 33258

Die Abbildung **2.13B** ist eine Komposition einer Durchlichtaufnahme und einer Fluoreszenzaufnahme mit Hoechst 33258 inkubierter Zellen desselben Ausschnitts. Die Zellkerne einiger Zellen waren dabei besser erkennbar, zudem zeigt ein Kern ein deutliches Kernfragmentierungsmuster, wie es für Apoptose typisch ist. Die Hoechst 33258 – Fluoreszenzintensität apoptotischer Kerne schien zudem in allen gemachten Aufnahmen

intensiver zu sein, als in normalen Kernen. Die Abbildungen **2.14A-C** zeigen weitere Aufnahmen nach 24 Stunden Behandlungszeit mit 20 µM Ciclosporin. Blasenwerfende Zellkerne und zerfallene Zellstrukturen sind auch darauf wieder gut zu sehen. Eine Inkubation mit 50 µM Ciclosporin über 24 Stunden führte zu noch drastischeren Veränderungen der Morphologie. Außerdem hatte sich eine große Anzahl an Zellen bereits abgelöst. Abbildung **2.14D** zeigt die Aufnahme eines einzelnen verbliebenen Astrozyten, der auch wieder deutliche Zeichen von Zellschädigung zeigte.

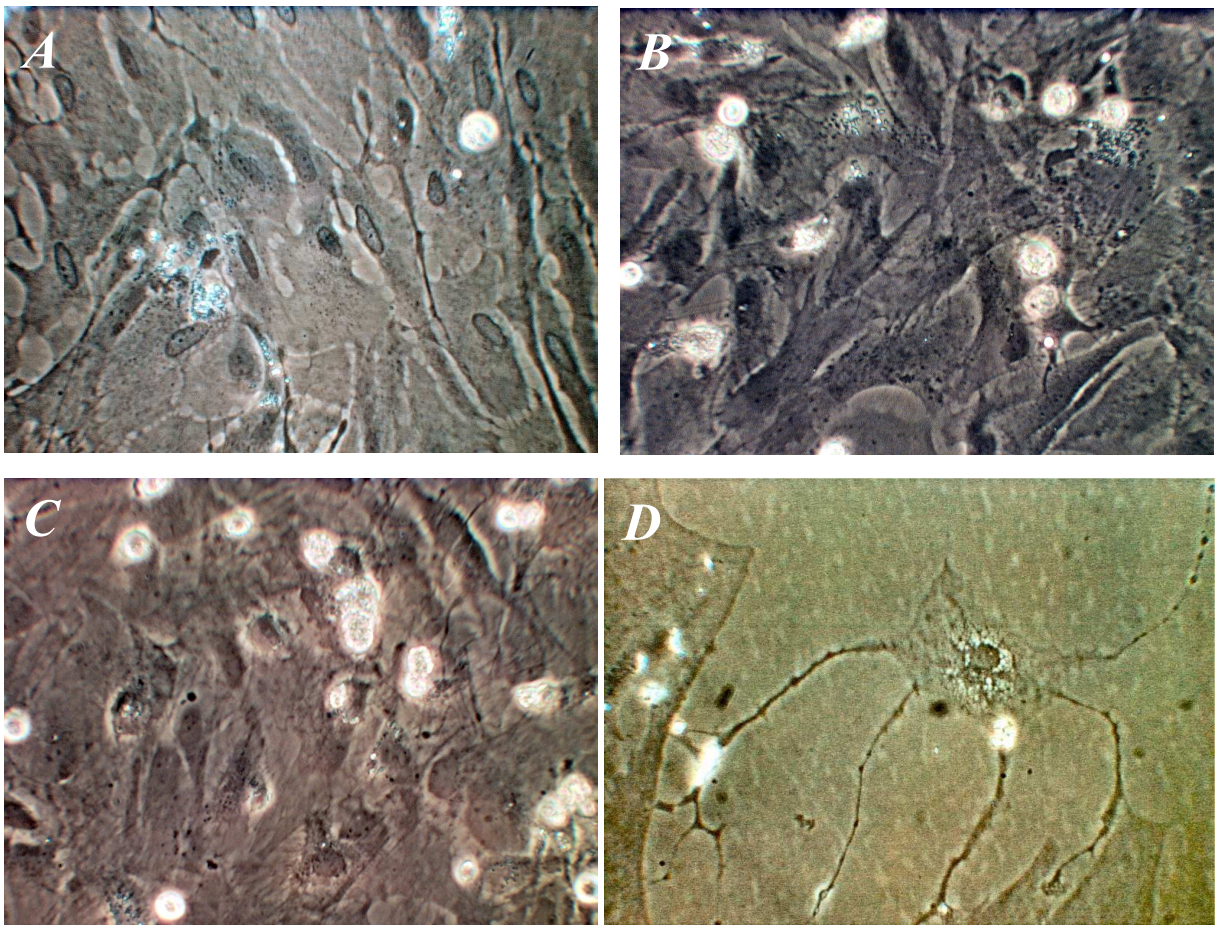


Abbildung 2.14:
Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Astrozyten (Vergrößerung 400-fach)

A-C Nach 24 Stunden Inkubation mit 20 µM Ciclosporin
D Nach 24 Stunden Inkubation mit 50 µM Ciclosporin

Zusammenfassung 2.5: Anhand der Fluoreszenzmethoden konnte die apoptotische Wirkung von hohen Ciclosporinkonzentrationen spezifiziert werden und die in Kapitel *2.4* beschriebenen Beobachtungen wurden bestätigt.

2.6 Laktatdehydrogenase – Primäre Astrozyten

In vorherigen Studien wurde anhand von Metabolismusuntersuchungen erkannt, dass Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus unterschiedliche Wirkungen auf den Glukosestoffwechsel und infolge dessen auf energiereiche Phosphate im Gehirn haben. So inhibierte Ciclosporin die mitochondriale Energiegewinnung, während es gleichzeitig den cytosolischen Energiestoffwechsel stimulierte und zu erhöhten Laktatkonzentrationen führte. Everolimus und Sirolimus hatten hingegen einen Laktat senkenden Einfluss (Serkova et al., 2001). Es konnte bisher nicht bestimmt werden, an welche Stelle im Metabolismus genau die Immunsuppressiva diese Wirkungen entfalten. Daher wurde die intrazelluläre Aktivität des

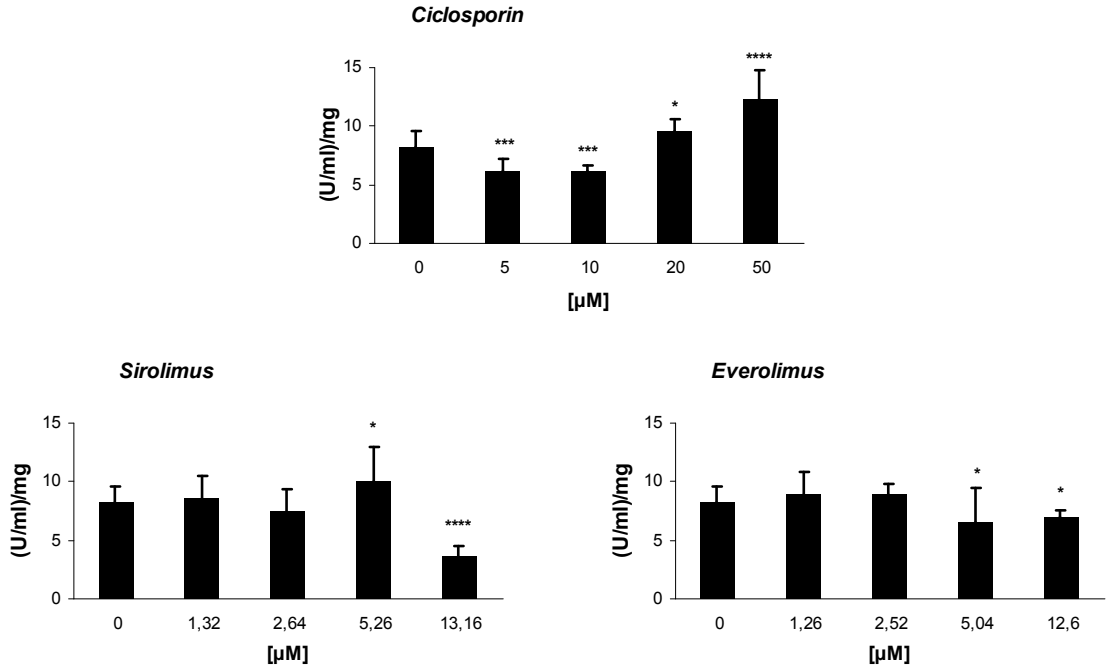


Abbildung 2.15: Intrazelluläre Laktatdehydrogenase in Astrozyten

Aktivitäten des Enzyms Laktatdehydrogenase nach 20 Stunden Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der Immunsuppressiva. Ergebnisse des TTest gegen die Kontrolle: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P<0,0001

Enzyms Laktatdehydrogenase bestimmt, um einen weiteren Einblick in die Wirkungen der Immunsuppressiva auf den Zellmetabolismus zu bekommen. Dafür wurden dieselben Konzentrationen verwendet wie für die MTT-Bestimmungen und die primären Astrozyten wurden für jeweils 20 Stunden mit den Immunsuppressiva inkubiert. Das Enzym Laktatdehydrogenase bietet der Zelle eine Möglichkeit cytosolisch Energie unabhängig vom

in den Mitochondrien lokalisierten Citratzyklus beziehungsweise der oxidativen Phosphorylierung zu gewinnen. Die Laktatdehydrogenase setzt dazu das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, zu Laktat um (Reaktionsgleichung siehe Abschnitt 4.6.3.1) und regeneriert dabei das zur Fortsetzung der Glykolyse benötigte NAD^+ aus NADH. Es zeigte sich, dass Ciclosporin bei steigender Konzentration zunächst die Aktivität der Laktatdehydrogenase konzentrationsabhängig absenkte und ab 20 µM die Aktivität wieder erhöhte bis zu einem Wert von 150±30 % der Kontrolle bei 50 µM, was einer Aktivität von 12,3±2,5 (U/ml)/mg entspricht (Abb. **2.15**). Sirolimus senkte bei der höchsten verwendeten Konzentration die Laktatdehydrogenaseaktivität auf 44±11 % der Kontrolle (entsprechend 3,6±0,9 (U/ml)/mg) und zeigte damit die stärkste Wirkung der drei Medikamente. Everolimus verringerte die Aktivität der Laktatdehydrogenase ebenfalls, jedoch nur auf 85±6 % der Kontrolle (entsprechend 7,0±0,5 (U/ml)/mg). Die Aktivitäten unbehandelter Zellen lagen bei 8,2±1,4 (U/ml)/mg.

Zusammenfassung 2.6: Die Analyse der Enzymaktivität bestätigte frühere Ergebnisse die mit NMR-Messungen gewonnen wurden. Ciclosporin stimulierte die Laktatbiosynthese und Sirolimus und Everolimus inhibierten die Laktatdehydrogenase, Sirolimus dabei stärker als Everolimus. Diese Effekte auf die Laktatdehydrogenase wurden jedoch erst bei sehr viel höheren Konzentrationen der Immunsuppressiva gesehen, als die metabolischen Auswirkungen.

2.7 Glukosemetabolismus – NMR-Messungen

2.7.1 Primäre Astrozyten

In vorangegangenen Studien wurde bereits an zwei Wochen alten Ratten und an Rattengehirnschnitten gezeigt, dass Sirolimus die negativen Effekte von Ciclosporin auf den Energiemetabolismus verstärkt. Everolimus zeigte diese Wirkung trotz großer struktureller Ähnlichkeit zu Sirolimus nicht (Serkova et al., 2001). Die gleichen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an primären Astrozyten vorgenommen. Die Versuche an C6-Zellen wurden in einer Forschungsarbeit von Jelena Miljus durchgeführt (Miljus, 2002). Auf diese wird in der Diskussion näher eingegangen. Die Inkubation mit [1-^{13}C]-markierter Glukose erlaubt es mittels NMR-Messungen den metabolischen Weg von Glukose zu verfolgen (Serkova et al., 1999, 2000, 2001; Gottschalk et al., 2003; Zwingmann et al., 2001). Die beiden Intermediate C3-Laktat und C4-Glutamat geben Auskunft darüber, ob die markierte Glukose vorzugsweise glykolytisch abgebaut wurde, mitochondrial metabolisiert wurde oder ob beide Abbauwege inhibiert sind.

Tabelle 2.2 : Effekte der Immunsuppressiva auf die Umsetzung von [1-^{13}C]-markierter Glukose in primären Astrozyten nach 4 Stunden Inkubation

	H_2O_2	CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD
C4-Glutamat (Citratzyklus)	73±12%**	88±8%*	105±9%	102±11%	72±6%***	97±11%
C3-Laktat (Glykolyse)	65±10%***	132±9%**	89±11%	89±7%*	77±13%*	101±11%

Die Werte sind als % der Kontrolle angegeben und entstammen mindestens vierfachen Bestimmungen. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva waren CsA 500 µg/L (0,415 µM), Sirolimus 100 µg/L (0,1095 µM) und Everolimus 100 µg/L (0,1045 mM). Die Konzentration von H_2O_2 betrug 100 µM. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrollwerte: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Die Zugabe von 500 µg/L Ciclosporin für 4 Stunden senkte die Konzentration des Citratzykluszwischenproduktes C4-Glutamat auf 88±8% der Kontrolle und erhöhte gleichzeitig die C3-Laktatmenge aus der cytosolischen Glukoseumsetzung auf 132±9% der Kontrolle. Von Sirolimus und Everolimus mit je 100µg/L für 4 Stunden hatte in der

Monotheraphie nur Everolimus eine signifikante Auswirkung auf die Glykolyse. Eine Beeinflussung des Citratzyklusses fand weder durch Sirolimus noch durch Everolimus statt. Ebenso wenig hatte die Kombination aus Ciclosporin und Everolimus Auswirkungen auf den Metabolismus der Glukose, weder auf cytosolischer noch auf mitochondrialer Seite. Sirolimus zusammen mit Ciclosporin inhibierte jedoch den Glukosestoffwechsel der Zellen zusätzlich im Vergleich zur Ciclosporinmonobehandlung dadurch, dass durch die Kombination neben der mitochondrialen auch der cytosolische Glukosemetabolismus inhibiert wurde (72±6% beziehungsweise 77±13% der Kontrolle).

Tabelle 2.3 : Energiereiche Phosphate in primären Astrozyten nach 4 Stunden Inkubation mit den Immunsuppressiva

	Kontrolle	H_2O_2	CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD
PCr	2,98±0,35	0,79±0,48***	2,18±0,45*	2,28±0,41*	3,01±0,19	1,99±0,15***	2,64±0,31
NTP	3,36±0,29	1,95±0,15***	2,88±0,19*	3,17±0,37	3,17±0,22	2,51±0,39**	3,06±0,28
NDP	0,97±0,12	1,77±0,19***	1,14±0,10*	1,01±0,21	0,83±0,15	1,39±0,13**	0,89±0,20
NAD^+	0,55±0,07	0,17±0,04***	0,45±0,03*	0,48±0,06	0,51±0,07	0,32±0,08**	0,48±0,07

Die Werte sind als µmol/g angegeben und entstammen mindestens vierfachen Bestimmungen. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva waren CsA 500 µg/L (0,415 µM), Sirolimus 100 µg/L (0,1095 µM) und Everolimus 100 µg/L (0,1045 mM). Die Konzentration von H_2O_2 betrug 100 µM. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrollwerte: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001
PCr: Phosphokreatin; NTP: Nucleosidtriphosphate; NDP: Nucleosiddiphosphate; NAD^+: Nicotinamidadenindinucleotid

Mit denselben, entsprechend aufgearbeiteten Extrakten wurden auch ^{31}P-NMR-Messungen vorgenommen, deren Ergebnisse in Tabelle ***2.3*** wiedergegeben sind. Mit ^{31}P-NMR lassen sich die Konzentrationen der energiereichen Phosphate Phosphokreatin (PCr), Nucleosidtriphosphat (NTP), Nucleodsiddiphosphat (NDP) und Nicotinamidadenin-dinucleotid (NAD^+) bestimmen. Auch hierbei zeigte sich wieder, dass die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus unvorteilhaft war. Wasserstoffperoxid, das bei den Untersuchungen der reaktiven Sauerstoffspezies als Positivkontrolle für oxidativen Stress benutzt wurde, hatte vergleichbare negative Auswirkungen wie Ciclosporin und die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus auf die Energiesituation der Zellen, wobei die Effekte stärker ausgeprägt waren.

Die Zugabe von Ciclosporin senkte die Konzentrationen von NTP, NAD^+ und PCr. Gleichzeitig erhöhte sich die Menge an NDP. Die Energiesituation der Zellen im Ganzen verschlechterte sich somit gegenüber unbehandelten Astrozyten. Durch die gemeinsame Inkubation von Ciclosporin und Sirolimus verschob sich die Energiebalance NTP/NDP, die normalerweise mehr auf der Seite von NTP liegt, erheblich zu NDP.
Nach vier Stunden Inkubation mit 500 µg/L Ciclosporin und 100 µg/L Sirolimus war das Verhältnis NTP/NDP auf 1,63±0,18** gefallen im Vergleich zu 3,47±0,31 in den Kontrollzellen. Wasserstoffperoxid senkte den Wert noch weiter ab auf 1,11±0,17*** und verschlimmerte die Energiesituation der Zellen noch zusätzlich durch eine Verringerung der Konzentration von NAD^+ auf 31% der Kontrolle.
Die Ergebnisse der Inkubationen an C6-Zellen wichen sehr stark von allen bisherigen Beobachtungen ab, womit diese Zellen als Modell für eine Neurotoxizität der Immunsuppressiva ungeeignet sind. Näheres dazu wird in der Diskussion aufgeführt.

Zusammenfassung 2.7.1: Ciclosporin inhibierte in primären Astrozyten den mitochondrialen Glukosestoffwechsel und dadurch verringerte sich das Verhältnis NTP/NDP. Sirolimus und Everolimus alleine senkten leicht die Laktatproduktion aus Glukose. Den stärksten negativen Effekt auf das Verhältnis NTP/NDP zeigte die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus, weil sowohl der Citratzyklus als auch die Glykolyse gehemmt wurden. Nur Wasserstoffperoxid verschlechterte die Energiesituation noch mehr. Für die negativen Auswirkungen lässt sich folgende Reihe aufstellen: H_2O_2 >> CsA+Srl > CsA > CsA+RAD = RAD = Srl.

2.7.2 Gehirnschnitte

Die metabonomischen NMR-Untersuchungen an Gehirnschnitten wurden unter Anleitung und mit Hilfe von Dr. Natalie Serkova vorgenommen. In den Gehirnschnitten veränderte Ciclosporin (500 µg/L) zeitabhängig die Konzentration der energiereichen Phosphate NTP, PCr und NAD^+ (Tab. ***2.5***). Nach vier Stunden Perfusionszeit waren diese wie auch schon bei den primären Astrozyten deutlich verringert (vergleiche dazu Tabelle ***2.3***). Die Gehirnschnitte waren jedoch in der Lage, dem inhibierenden Effekt von Ciclosporin auf den Energiemetabolismus entgegen zu wirken. Nach zehn Stunden war die Konzentration des C3-markierten Laktats deutlich erhöht (Tab. ***2.4***), was auf eine verstärkte cytosolische

Energiegewinnung hindeutet. Im Gegensatz zu NAD^+, welches einen Marker für die mitochondriale oxidative Phosphorylierung darstellt, hatten sich die Konzentrationen von PCr und NTP nach zehn Stunden wieder auf Kontrollniveau erhöht. Ähnliche Kompensationseffekte wurden bereits beim oxidativen Stress beobachtet (vergleiche Kapitel *2.3.1*).

Tabelle 2.4 : Effekte der Immunsuppressiva auf die Umsetzung von [1-^{13}C]-markierter Glukose in Gehirnschnitten nach 4 oder 10 Stunden Inkubation

		CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD
C4-Glu	4 Stunden	61±28%*	97±33%	102±36%	48±38%*	91±30%
	10 Stunden	58±38%*	98±19%	119±26%*	41±31%**	100±17%
C3-Lak	4 Stunden	86±24%	69±25%*	71±12%*	54±14%*	88±23%
	10 Stunden	136±12%*	63±31%*	62±30%*	38±26%**	93±24%

Die Werte sind als % der Kontrolle angegeben und entstammen mindestens vierfachen Bestimmungen. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva waren CsA 500 µg/L (0,415 µM), Sirolimus 100 µg/L (0,1095 µM) und Everolimus 100 µg/L (0,1045 mM). Ergebnisse des TTests gegen die Kontrollwerte: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$
C4-Glu: C4-Glutamat; C3-Lak: C3-Laktat

Sirolimus (100 µg/L) verringerte im Verlauf von zehn Stunden die Konzentrationen der energiereichen Phosphate PCr und NTP, ohne Einfluss auf NAD^+ zu haben. Zudem inhibierte Sirolimus bereits nach vier Stunden die Laktatentstehung im Cytosol. In der Kombination mit Ciclosporin verstärkte Sirolimus im Vergleich zur Ciclosporinmonobehandlung die negativen Effekte des Ciclosporins auf den Energiemetabolismus. Die Konzentration des Citratzykluszwischenproduktes C4-Glutamat, auf das Sirolimus alleine keine Auswirkungen hatte, war nach vier und nach zehn Stunden stärker verringert, als dies mit Ciclosporin alleine der Fall war. Eine Erhöhung des C3-Laktats wie nach zehn Stunden Inkubation mit Ciclosporin beobachtet wurde, trat bei der Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus nicht mehr auf. Die Konzentrationen der energiereichen Phosphatverbindungen sanken zeitabhängig, wobei insbesondere die NAD^+-Konzentration drastisch von 71±12% auf 38±7% der Kontrolle fiel. Für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde in der Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus ebenfalls eine synergistische Verstärkung durch Sirolimus beobachtet (vergleiche Abb. **2.4**).

Obwohl Everolimus strukturell eng verwandt ist mit Sirolimus hatt die Zugabe von 100 µg/L Everolimus keine signifikanten Auswirkungen auf die Energieträger PCr und NTP. Die Konzentration von Laktat war zwar verringert, aber gleichzeitig wurde eine erhöhte NAD^+-Konzentration gemessen, sowohl nach vier als auch nach zehn Stunden. Die Kombination von Ciclosporin mit Everolimus führte nach vier und nach zehn Stunden zu einer Verbesserung der durch Ciclosporin induzierten Energiedefizite. Alle Parameter zeigten nach zehn Stunden keine signifikanten Abweichungen mehr von der Kontrolle. Interessanterweise war die cytosolische Laktatmenge in der Kombinationsbehandlung Ciclosporin+Everolimus nicht erhöht, wie nach zehn Stunden Perfusion mit 500 µg/L Ciclosporin. Nach zehn Stunden war jedoch auch nicht mehr die NAD^+-Konzentration erhöht, wie dies bei der mit 100 µg/L Everolimus beobachtet wurde.

Tabelle 2.5 : Energiereiche Phosphate in Gehirnschnitten nach 4 oder 10 Stunden Inkubation mit den Immunsuppressiva

		CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD
PCr	4 Stunden	69±9%** [96±12%]	85±4%*	102±6%	60±7%* [89±5%]	102±12%
	10 Stunden	95±9%	81±9%*	99±3%	54±20%**	94±12%
NTP	4 Stunden	75±9%* [98±7%]	89±7%	112±9%	64±9%** [85±9%]	91±7%
	10 Stunden	89±4%	80±7%*	109±7%	58±8%***	104±10%
NAD^+	4 Stunden	62±25%* [94±10%]	98±7%	125±11%*	71±12%* [79±16%]	135±18%*
	10 Stunden	59±14%**	102±8%	127±9%*	38±7%***	94±7%

Die Werte sind als % der Kontrolle angegeben und entstammen mindestens vierfachen Bestimmungen. Die Ergebnisse in Klammern sind Werte, die unter Zusatz von 500 µmol/L α-Tocopherol (Vitamin E) für den gesamten Behandlungszeitraum gewonnen wurden. Die Werte sind als % der Kontrolle angegeben und entstammen vierfachen Bestimmungen. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva waren CsA 500 µg/L (0,415 µM), Sirolimus 100 µg/L (0,1095 µM) und Everolimus 100 µg/L (0,1045 mM).
Ergebnisse des TTests gegen die Kontrollwerte: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001
PCr: Phosphokreatin; NTP: Nucleosidtriphosphate; NAD^+: Nicotinamidadenindinucleotid

Die Zugabe von 500 µmol/L Vitamin E (α-Tocopherol) verhinderte, dass nach vier Stunden Perfusionszeit die toxischen Wirkungen des Ciclosporins auf den Energiemetabolismus zum Tragen kamen. Die Konzentrationen der energiereichen Phosphate blieben alle auf

Kontrolllevel. Ebenso schützte Vitamin E in der Kombinationsbehandlung Ciclosporin+Sirolimus die Zellen vor dem Verlust der Energieträger (Tab. ***2.5***).

Zusammenfassung 2.7.2: Die Immunsuppressiva zeigten die gleichen Auswirkungen auf den Energiemetabolismus der Gehirnschnitte, die auch an den primären Astrozyten beobachtet wurden. Die Gehirnschnitte reagierten jedoch empfindlicher. Parallelen zu Messungen des oxidativen Stresses zeigten sich sowohl in Kompensationsmechanismen der Zellen gegenüber dem Energieverlust, wie auch in der synergistischen Verstärkung der toxischen Effekte des Ciclosporins durch Sirolimus. Everolimus zeigte in Bezug auf die toxischen Wirkungen des Ciclosporins eine ähnliche protektive Wirkung wie das Antioxidationsmittel Vitamin E.

2.8 Diskussion – *in vitro*

Die Erkenntnisse die mit den drei in vitro Modellen für das Rattengehirn gewonnen wurden, zeigen deutliche Unterschiede, sowohl in Ergebnissen die aus den verschiedenen Medikamentenbehandlungen resultieren, als auch in den Ergebnissen zwischen den drei Modellen. Das der in vivo Situation am nächsten kommende Modell stellen die Gehirnschnitte von sieben Tage alten Ratten dar. Diese haben, wie Serkova et al. (1999; 2000) zeigen konnten, noch bis zu zehn Stunden nach ihrer Präparation einen nahezu intakten Hirnmetabolismus, wofür der Energiestoffwechsel als Parameter benutzt wurde. Die Untersuchung von oxidativem Stress in den Gehirnschnitten erbrachte, dass Ciclosporin diesen in der Kurzzeitbehandlung über drei Stunden signifikant erhöht. Nach insgesamt zehn Stunden Perfusionszeit hatte sich diese Stresssituation jedoch wieder normalisiert. Offenbar fand innerhalb der zehn Stunden eine Art Anpassung an die Ciclosporinpräsenz statt. Dies wurde auch anhand des Energiestoffwechsels beobachtet (Christians, Gottschalk et al., 2003). Mit Ciclosporin behandelte Gehirnschnitte zeigten dabei nach drei Stunden eine Inhibierung des mitochondrialen Glukosemetabolismus. Im Gehirn ist im Gegensatz zu den restlichen Organen des Körpers, die Glukose das Hauptsubstrat für die Energiegewinnung des Gehirns, die somit weitestgehend vom mitochondrialen Glukosemetabolismus abhängt. Eine Inhibition der mitochondrialen Glukosemetabolisierung, sei es im Citratzyklus oder während der oxidativen Phosphorylierung, zeigt sich dann auch deutlich im Verhältnis der Nucleosidphosphate NTP/NDP, welches durch eine Inhibition einen kleineren Wert annimmt. Nach zehn Stunden jedoch passten sich die Zellen dieser Situation dahingehend an, dass der mitochondriale Energieverlust durch eine erhöhte glykolytische Aktivität kompensiert wurde. Interessanterweise konnten sich die primären Astrozyten bereits nach vier Stunden Inkubationszeit dieser Energienotlage durch eine erhöhte Glykolyseaktivität anpassen. Dies wurde anhand der erhöhten Konzentration von ^{13}C-markiertem Laktat (Markierung an C3 des Laktats) gezeigt. Da sich dieser Anpassungsprozess zudem im oxidativen Stress wiederspiegelte scheint eine Verbindung zwischen dem Energiemetabolismus, beziehungsweise dessen Inhibition und der beobachteten Vermehrung reaktiver Sauerstoffspezies zu bestehen. Das Antioxidant Vitamin E (α-Tocopherol) war in der Lage den durch Ciclosporin induzierten oxidativen Stress in Gehirnschnitten komplett zu verhindern, sowohl nach drei Stunden, als auch nach zehn Stunden Inkubationszeit. Dies passt gut zu Beobachtungen, die von Serkova et al. (Christians, Gottschalk et al. 2003)

gemacht wurden. Vitamin E wirkte dabei ebenfalls dem durch Ciclosporin verschlechtertem Energiezustand der Zellen entgegen. So waren die Konzentrationen der energiereichen Phosphate PCr, NTP und NAD+ nach vier Stunden Inkubation mit 500 µg/L Ciclosporin und 500 µmol/L Vitamin E nahezu auf Kontrollniveau, während sie nach vier Stunden mit 500 µg/L Ciclosporin deutlich gesenkt waren. Vitamin E zeigte diesen Schutzeffekt auch in vivo bei Untersuchungen der Nierenfunktion von mit 50 mg/kg/Tag Ciclosporin behandelten Ratten (Parra et al., 1998). Umgerechnet entspricht diese Dosis etwa dem Fünffachen der hier verwendeten Ciclosporindosis. Untersuchungen an Nieren behandelter Ratten (Ciclosporindosis: 12,5 und 25 mg/kg/Tag) zeigten den gleichen Schutzeffekt durch Vitamin E (Wang et al., 1995). Perez de Lema et al. (1998) konnten in Zellkultur beobachten, dass Antioxidantien, unter anderem auch Vitamin E den durch Ciclosporin verursachten oxidativen Stress verringerten. Das reaktive Sauerstoffspezies mit Ciclosporintoxizität einher gehen, wurde zudem bereits mehrfach an Zellen nicht cerebralen Ursprungs beobachtet, mit klinisch relevanten und höheren Konzentrationen von Ciclosporin (Haberland et al., 1997; López-Ongil et al., 1998 ; Navarro-Antolín et al., 1998; Parra et al., 1998; Perez de Lema et al., 1997; 1998; Wang et al., 1995; Wolf et al., 1997). Über die genauen Mechanismen der Entstehung der überschüssigen reaktiven Sauerstoffspezies bestehen noch geteilte Meinungen und es konnte bisher noch keine schlüssige Erklärung gefunden werden (Andrés et al., 2000; Krauskopf et al, 2002; Nguyen et al., 1999).

Die Zusammenhänge zwischen den beiden Makroliden Sirolimus und Everolimus und oxidativem Stress sind bisher kaum untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Sirolimus, als auch Everolimus unter Verwendung klinisch relevanter Konzentrationen oxidativen Stress in Gehirnschnitten verursachten. Interessanterweise war Everolimus in der Lage den durch Ciclosporin verursachten Stress zu unterdrücken. Everolimus hatte somit dieselbe Wirkung wie das Antioxidationsmittel Vitamin E, wenn es mit Ciclosporin kombiniert wird. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Everolimus die Konzentration von Ciclosporin in den Mitochondrien verringert (Serkova et al., 2001), was wieder rum die Vermutung nahe legt, dass die Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien zu suchen ist. Unter Anbetracht des Einflusses von Ciclosporin auf die mitochondriale Energiegewinnung (Serkova et al., 1999) vielleicht sogar in der oxidativen Phosphorylierung selbst, an der reaktive Sauerstoffspezies beziehungsweise Sauerstoff direkt beteiligt sind. Während der oxidativen Phosphorylierung werden ständig auch ROS

freigesetzt. Die vorhandenen zellulären Antioxidationssysteme genügen jedoch, um diesen normalen Pegel an ROS zu entschärfen und in harmlose Verbindungen zu überführen. Sollten jedoch die Entgiftungssysteme inhibiert sein oder sich die Produktion von ROS erhöhen, was allgemein hin unter oxidativem Stress verstanden wird, kann es zu Zellschädigungen und dabei auch zur Inhibition der oxidativen Phosphorylierung kommen.

In der Kombination mit Ciclosporin zeigte Sirolimus nicht denselben schützenden Effekt wie Everolimus. Im Gegenteil führte die gemeinsame Verwendung von Sirolimus und Ciclosporin zu den höchsten gemessenen Werten an oxidativem Stress. Dies geht gut einher mit der Beobachtung synergistischer Toxizität bezüglich des Energiemetabolismus (vergleiche dazu auch das weiter unten geschriebene). Für die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus wurden die Auswirkungen für die Zellen schlimmer, je länger die Behandlung dauerte.

Die Messungen der intrazellulären Aktivität der Laktatdehydrogenase in primären Astrozyten nach Inkubation mit den Immunsuppressiva erbrachten keine schlüssigen Ergebnisse. Es wurden sehr viel höhere Konzentrationen der drei Medikamente benutzt, um cytotoxische Auswirkungen zu bestimmen. Ciclosporin senkte jedoch bei Konzentrationen von 5 µM und 10 µM die Aktivität der Laktatdehydrogenase. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die mit NMR-Messungen gemacht wurden (Serkova et al., 1999; 2000; 2001). Ciclosporin erhöhte dabei mit seiner klinisch relevanten Konzentration von ~0,5 µM die Laktatkonzentration, was eine höhere Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase bedeuten kann. Mit der biochemischen Bestimmungsmethode wurde eine Erhöhung der Aktivität erst ab 20 µM und verstärkt bei 50 µM gefunden. Da bei 20 µM jedoch bereits deutliche Anzeichen von Apoptose beobachtet wurden, könnte dies auch im erhöhten Energiebedarf der Zellen beziehungsweise dem Bedarf nach schnell verfügbarer Energie, angesichts der apoptotischen Prozesse begründet liegen. Die weitere Aktivitätssteigerung bei 50 µM Ciclosporin dürfte angesichts der bei dieser Konzentration gesehenen weitgehenden Zerstörung der Zellkultur bei zudem kürzeren Inkubationszeiten kaum mehr physiologisch relevant sein. Sirolimus und Everolimus zeigten erst beim vierzigfachen der klinisch relevanten Konzentrationen Auswirkungen auf die Laktatdehydrogenaseaktivität, was wohl ebenfalls nicht mehr physiologisch relevant sein dürfte. Bedenkt man die beobachteten geringeren Laktatkonzentrationen, bedeutet dies, dass alle drei Immunsuppressiva Enzyme

beeinflussen, die in der Glykolysekette vor der Laktatdehydrogenase wirken, die erst am Ende der Glykolyse steht. Für Ciclosporin wurde bereits nachgewiesen, dass durch Inkubation mit diesem die Proteinexpression des ersten Enzym der Glykolyse, der Hexokinase, erhöht ist (Novartis Pharma AG, persönliche Mitteilung). Von Sirolimus wurde berichtet, dass es die Aldolase inhibiert (Wang et al, 1996). Die Aldolase ist das vierte Enzym der Glykolyse, welches das zyklische Zuckermolekül in zwei Einheiten spaltet.

Die Induktion von Apoptose durch Ciclosporin wurde ebenso wie die Verursachung oxidativen Stresses bereits an zahleichen Zell- und Gewebearten nachgewiesen (Roman et al., 1998; Tariq et al., 1999; Esposito et al., 2000; Grub et al., 2000; Kochi et al., 2000). Wieder rum wurden eher nicht cerebrale Zellen benutzt, da das Hauptaugenmerk zumeist auf der Nierentoxizität als häufigste Nebenwirkung von Ciclosporin lag. Anhand der mikroskopischen Untersuchungen und der DNA-Leiter Methode konnte hier jedoch deutlich gezeigt werden, dass Ciclosporin auch in cerebralen Zellen Apoptose verursacht. Paradoxerweise schützt Ciclosporin in Tiermodellen das Gehirn vor den Auswirkungen einer Ischämie-Reperfusion. Dabei kommt vermutlich die Eigenschaft von Ciclosporin zum Tragen, die so genannte MPT-Pore (*mitochondrial permeability transition*) zu inhibieren (Petronilli et al., 2001; Di Lisa et al., 2003). Unter Ischämie versteht man eine Minderdurchblutung von Gewebe. Dies tritt im Gehirn z.B. bei einem Schlaganfall auf. Ischämie führt zu Sauerstoffmangel (Hypoxie) und in schwereren oder länger andauernden Fällen hin zu völlig ungenügender Sauerstoffversorgung (Anoxie). Je nach Dauer und Schwere der Ischämie entstehen reversible Schäden an den Zellen oder es kann zu unkontrolliertem Zelltod (Nekrose) kommen. Wird die Sauerstoffversorgung wieder hergestellt (Reperfusion) kommt es zu einem vergleichsweise drastischen Anstieg der Sauerstoffkonzentration was einen ebensolchen Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge hat. Die Veränderungen in Folge der plötzlichen Sauerstoffzunahme und des Anstiegs an ROS während der Reperfusion haben einen Schritt des gesteuerten Zelltods (Apoptose) zur Folge (Serkova, Gottschalk et al., 2002). Dabei entsteht eine Art Pore in der äußeren Mitochondrienmembran und aus dem Intermembranraum der Mitochondrien strömen zahlreiche Moleküle und Ionen aus, welche weitere Schritte der Apoptose vermitteln. Ciclosporin inhibiert die Bindung des für die Mitochondrien spezifischen Cyclophilin D an das Protein ANT (*adenine nucleotide translocator*) in der inneren Mitochondrienmembran, was einen wichtigen Schritt in der Porenbildung darstellt. Ciclosporin schützt somit vor

Ischämie-Reperfusionsschäden die normalerweise zu Apoptose führen, indem es die induzierte MPT-Öffnung inhibiert (Halestrap et al., 1997) und somit die energiereichen Phospate, den pH-Wert und die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration vor drastischen Veränderungen schützt (Serkova, Gottschalk et al., 2002).

Diese Eigenschaft von Ciclosporin ist jedoch vermutlich eng damit verbunden, dass es auch Apoptose induzieren kann. Wie Salducci et al. (1992) zeigen konnten, ist die Inhibition der ATP-Synthese durch Ciclosporin in isolierten Lebermitochondrien an die vorhandene Calciumionenkonzentration gebunden. Steigende Konzentrationen des Ca^{2+}-Ions bei gleicher Ciclosporinkonzentration verringerten die Energieproduktion der Mitochondrien zunehmend. Das komplette Entfernen der Calciumionen hingegen führte dazu, dass Ciclosporin keinerlei Auswirkungen mehr auf die ATP-Synthese hatte. Das hängt damit zusammen, dass Ciclosporin die Menge an speicherbarem Ca^{2+} in den Mitochondrien erhöhte (Fournier et al., 1987). Dieser Einfluss von Ciclosporin auf das mitochondriale Ca^{2+} hat wieder rum Auswirkungen auf den Gesamtgehalt der Zelle an Ca^{2+}. Normalerweise sind die Calciumkonzentrationen in allen Zellkompartimenten streng reguliert. Die cytosolische Ca^{2+}-Konzentration wird durch aktiven Transport der Calciumionen aus der Zelle oder in andere Kompartimente, darunter hauptsächlich das endoplasmatische Retikulum bei geringen Konzentrationen im nanomolaren Bereich gehalten. Zudem spielen die Ca^{2+}-Konzentrationen beziehungsweise deren Änderungen wichtige Rollen in der Signalvermittlung innerhalb der Zellen (Orrenius et al., 2003) und es wurde berichtet, dass sogar eine bestimmte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nicht unterschritten werden darf, damit Zellen überhaupt überleben (Johnson et al., 1993). Somit ist es nicht verwunderlich, dass ein durch Ciclosporin ursächlich in den Mitochondrien verursachtes Ungleichgewicht der Calciumionen, sozusagen eine Art „Calciumstress“, Auswirkungen auf die ganze Zelle hat. Bereits kleine Änderungen in den Ca^{2+}-Signalwegen können nachteilige Auswirkungen haben auf die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Apoptoseregulierung (Orrenius et al., 2003). Im Falle von Ciclosporin manifestieren sich diese Wirkungen in Unregelmäßigkeiten der mitochondrialen Energieproduktion und können bis zum gesteuerten Zelltod, der Apoptose führen. Das Ciclosporin auch in der Lage ist, Apoptose zu verhindern, wie im Falle der Ischämie-Reperfusion, mag zum einen an der jeweiligen Ciclosporinkonzentration und zum anderen an den Bedingungen liegen, denen die Zellen unterliegen (vergleiche dazu auch den Artikel Christians, Gottschalk et al., 2003). In den

primären Astrozyten waren zwar relativ hohe Konzentrationen nötig, um die Apoptose auch sichtbar zu machen, in der klinischen Anwendung werden die Medikamente jedoch sehr viel länger angewendet. Und auch wenn die Konzentrationen dann sehr viel geringer ausfallen, so könnten sich diese Effekte langsam aufaddieren. Durch die ständig vorhandene Ciclosporinmenge besteht ebenso eine ständige Beeinflussung der zuvor erwähnten Mechanismen, an denen Calciumionen beteiligt sind.

Das Immunsuppressivum FK506 (Tacrolimus) bindet ebenfalls wie Sirolimus und Everolimus an FKBP. Der molekulare Wirkmechanismus, aus dem die Immunsuppression resultiert, ist jedoch identisch mit dem des Ciclosporin. Der Komplex aus FK506 und FKBP inhibiert genauso wie der Komplex aus Ciclosporin und Cyclophilin D die Phosphataseaktivität von Calcineurin. Zudem wurde berichtet, dass FK506 ebenso in der Lage ist Apoptose zu induzieren (Kochi et al., 2000; Migita und Eguchi, 2001). Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch dieser molekulare Wirkmechanismus der Calcineurininhibition, den FK506 und Ciclosporin gemeinsam haben, verknüpft ist mit dem Auslösen eines apoptotischen Zelltods. Denn Sirolimus und Everolimus binden ebenfalls an FKBP, inhibieren in diesem Komplex jedoch das Protein mTOR und zeigen gänzlich andere Auswirkungen auf den apoptotischen Zelltod als Ciclosporin oder FK506.

Die Untersuchungen zur Apoptose durch Sirolimus sind weit weniger zahlreich als die Veröffentlichungen bezüglich Apoptose und Ciclosporin oder FK506. Zudem beschränken sich die meisten Artikel auf Zelltypen, die im weitesten Sinne mit dem Immunsystem beziehungsweise der immunsuppressiven Wirkung von Sirolimus zu tun haben. Ebenso wurde bisher hauptsächlich der Frage nachgegangen, wie genau die Immunsuppression durch Sirolimus funktioniert und was die Mechanismen in den einzelnen Immunzellarten sind. Für Everolimus existieren bisher diesbezüglich noch weniger Veröffentlichungen. Mit Sirolimus gibt es Beispiele, in denen es alleine Apoptose induzierte oder Zelltod verstärkte, der durch andere Einflüsse verursacht wurde. Im Falle einer Leukämiezelllinie, die normalerweise Resistenz gegen Cisplatinbehandlung besitzt, führte eine gemeinsame Behandlung mit Sirolimus zur Apoptoseinduktion (Shi et al., 1995). Diese Wirkung ist vermutlich in dem Zusammenhang zu sehen, dass Sirolimus in der Lage ist die Expression des Proteins BCL-2 zu inhibieren. Dieses wirkt antiapoptotisch (Lee et al., 2001; Zhong et al., 1993) und ist häufig in Tumorzellen überexprimiert. Sehgal (1998) konnte zeigen, dass

die Inhibition der BCL-2-Expression durch Sirolimus mit zunehmender Apoptose ein her ging. Dies stellt unter anderem einen Ansatz für Sirolimus als Antikrebsmittel dar. Zusätzlich wurde entdeckt, dass die Bindung von Sirolimus an sein zelluläres Ziel, das FKBP essentiell ist für die Apoptoseinduktion. Eine gemeinsame Inkubation mit FK506, das Sirolimus in dem Fall vom FKBP verdrängt, verhinderte die durch Sirolimus induzierte Apoptose (Muthukkumar et al., 1995).

Des Weiteren induzierte Sirolimus und auch Everolimus (Lutz et al., 2003) Apoptose bevorzugt in aktivierten Immunzellen. Unter aktivierten Immunzellen sind dabei Zellen des Immunsystems zu verstehen, die durch Antigenbindung oder Signalvermittlungen insofern als aktiviert gelten, dass sie selber direkt zur Immunabwehr beitragen z.B. durch erhöhte Expression von Membranrezeptoren oder Signalmolekülen (Lutz et al., 2003). Es sieht nun so aus, dass die beiden Makrolidimmunsuppressiva diese aktivierten Zellen aufgrund ihrer Eingriffe in die Wachstumsvermittlung und Zellproliferation empfindlicher gegenüber Apoptose machen beziehungsweise diese direkt verursachen (Hosoi et al., 1999; Strauss et al., 2002; Koenen et al., 2003; Thimmaiah et al., 2003; Lutz et al., 2003). Somit ist es nicht verwunderlich, dass in den verwendeten Zellen und dem Gewebe in dieser Arbeit keine Apoptose mit Sirolimus und Everolimus gefunden wurde. Die primären Astrozyten wurden nur als konfluente Zellen benutzt und eine Wachstumsinhibition nicht geprüft. Gleiches gilt für die C6-Zellen, die zwar empfindlicher auf die Makrolide reagierten, ansonsten diese aber gut tolerierten.

Die wichtigste Wirkung von Sirolimus und Everolimus scheint eher das Anhalten des Zellzyklus im Übergang von der G_1- zur S-Phase zu sein, bedingt durch das molekulare Ziel mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Dieses ist ein Regulator des Zellwachstums, da es unter anderem die Translation einiger für das Wachstum wichtiger Proteine steuert. Zudem wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition von mTOR durch Sirolimus dazu führt, dass normalerweise durch mTOR aktivierte Signalwege nicht mehr oder nur vermindert stattfinden (Huang et al., 2003). Die Wachstumsinhibition durch Sirolimus wurde sowohl für maligne als auch für nichtmaligne Zelllinien belegt (Hosoi et al., 1999; Lutz et al., 2003). Everolimus inhibiert ebenso die Zellproliferation. *In vitro* wurde dies anhand der Inhibition der Proliferation gezeigt, die durch Wachstumsfaktoren angeregt wird (Schuler et al., 1997). Eine Wachstumsinhibition konnte mit den hier verwendeten Methoden nicht beobachtet

werden beziehungsweise gehörte auch nicht zur Fragestellung. Zumal nur konfluente Zellkulturen, also nicht mehr proliferierende Zellen und ausdifferenziertes Gewebe benutzt wurde. Inwiefern die Proliferationshemmung Auswirkungen auf einen lebenden Organismus hat, ist bisher auch ungeklärt.

Während die wachstumsinhibitorischen Wirkungen bereits bei klinisch relevanten Konzentrationen beobachtet wurden (Hosoi et al., 1999), zeigten Sirolimus und Everolimus bis zu 13 µM keinerlei Apoptoseinduktion an primären Astrozyten. Diese Konzentration entspricht etwa dem 120-fachen der klinisch relevanten Mengen. Direkte toxische Wirkungen, die mittels des MTT-Cytotoxizitätstest bestimmt wurden, treten bei Sirolimus und auch Everolimus erst bei noch größeren Konzentrationen von ~39 µM auf. Bei diesen Konzentrationen waren auch fast alle Zellen abgestorben. Ganz anders der oxidative Stress, der auch bei den sehr viel geringeren klinisch relevanten Konzentrationen bereits nach drei Stunden Inkubationszeit beobachtet wurde. Im Falle der C6-Glioma-Zellen waren die Zellen diesbezüglich sogar besonders empfindlich, was in diesem Fall wohl auf die Antitumorwirkungen der beiden Makrolidimmunsuppressiva zurückzuführen ist und nicht auf spezifische Neurotoxizität.

In einer Forschungsarbeit die im Rahmen desselben Projektes durchgeführt wurde wie auch diese Doktorarbeit, wurden von Jelena Miljus (Miljus, 2002) metabonomische NMR-Untersuchungen an C6-Zellen, primären Astrozyten und Gehirnschnitten nach Inkubation mit den drei Immunsuppressiva vorgenommen. Diese Ergebnisse gehen auch in einen gemeinsamen Artikel ein (Gottschalk et al., 2004) und werden in der folgenden Diskussion mit berücksichtigt. Anhand der in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse und den bisherigen Veröffentlichungen, lässt sich zusammenfassend ein Bild zeichnen über die Metabolismustoxizitäten von Ciclosporin, Sirolimus, Everolimus und den beiden Kombinationen mit Ciclosporin. Serkova et al. (2001) konnten an zwei Wochen alten Ratten anhand von metabonomischen NMR-Studien die Effekte der Immunsuppressiva auf verschiedene Aspekte des Zellmetabolismus aufzeigen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf Untersuchungen des Glukosestoffwechsels. Für Ciclosporin wurde der bereits mit anderen Modellen beobachtete inhibierende Einfluss auf die mitochondriale Energiegewinnung belegt (Salducci et al., 1992; Massicot et al., 1997; Zini et al., 1998; Simon et al., 2003). In Studien mit längeren Inkubationszeiten zeigte sich, dass die Gehirnzellen in der Lage waren,

sich diesen durch Ciclosporin veränderten Gegebenheiten anzupassen. In Gehirnschnitten sieben Tage alter Ratten verstärkte sich die glykolytische Aktivität zur Energiegewinnung (Christians, Gottschalk et al., 2003) und diese Verbesserung des Energiegehaltes ging einher mit verringertem oxidativem Stress (vergleiche Kapitel *2.3.1.2*). Dass dieser Ausgleich nur ungenügend ist, belegt die trotz der erhöhten Glykolyseaktivität immer noch geringere Konzentration der Energieträger ATP, NAD^+ und PCr gegenüber der Kontrolle (vergleiche Kapitel *2.7.2*).

Die beiden strukturell fast identischen Makrolide Sirolimus und Everolimus zeigten zueinander ähnliche Wirkungen auf den Energiestoffwechsel im Gehirn zwei Wochen alter Wistar Ratten. Beide senkten die Konzentration an Laktat, was auf eine verringerte glykolytische Aktivität schließen lässt. Sirolimus verringerte jedoch zusätzlich auch den Gehalt an energiereichen Phosphaten. Eine Beobachtung, die sehr gut mit den Ergebnissen von Simon et al. (2003) übereinstimmt. Dieser berichtete über eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung in isolierten Mitochondrien aus Rattennieren durch Sirolimus. Da die oxidative Phosphorylierung den Antrieb für die ATP-Gewinnung im Mitochondrium liefert, ist es nicht verwunderlich, dass die Konzentration von ATP und anderen energiereichen Phosphaten nach Sirolimusbehandlung abnimmt.

Dasselbe Muster an Wirkungen aller drei Immunsuppressiva wurde in dieser Arbeit auch an primären Astrozyten beobachtet. Everolimus wirkte der durch Ciclosporin verschlechterten Energiesituation der Zellen entgegen. Die glykolytische und mitochondriale Energieversorgung und die Konzentration der energiereichen Phosphate waren nach kombinierter Behandlung mit Ciclosporin und Everolimus nicht signifikant verschieden zur Kontrolle. Serkova et al. (2001) haben vermutet, dass dies ein pharmakokinetischer Effekt ist. Everolimus war im Gegensatz zu Sirolimus in der Lage in Mitochondrien zu gelangen und in der Kombinationstherapie senkte es dadurch die Konzentration von Ciclosporin in den Mitochondrien aus Gehirnzellen zwei Wochen alter Ratten. Dieser Effekt kommt auch in den hier verwendeten primären Astrozyten, also in Zellkultur, und in den Gehirnschnitten zum Tragen. Die protektive Wirkung von Everolimus spiegelte sich in den Gehirnschnitten auch im oxidativen Stress wider. Everolimus schützte wie auch Vitamin E die Zellen vor dem durch Ciclosporin verursachten Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies (Kapitel *2.3.1.1*).

Die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus erwies sich auch in den primären Astrozyten als schlechteste. Die mitochondriale Inhibition durch Ciclosporin und die glykolytische Inhibition durch Sirolimus wirkten zusammen und senkten die Konzentrationen der Energieträger PCr, ATP und NAD^+ erheblich. Dies wurde an Gehirnschnitten zwei Tage alter Ratten (Serkova et al., 1999) und ebenso anhand von Extrakten aus Gehirnen zwei Wochen alter, behandelter Ratten beobachtet (Serkova et al., 2000). In allen Modellen waren die Auswirkungen der kombinierten Inkubation beziehungsweise Behandlung mit Ciclosporin und Sirolimus stärker, als die nur durch Ciclosporin oder nur durch Sirolimus verursachten Effekte. Dies lässt sich durch eine pharmakokinetische Wechselwirkung erklären. Sirolimus erhöhte bei der gemeinsamen Gabe mit Ciclosporin die Konzentration von Ciclosporin in Mitochondrien des Gehirnes zwei Wochen alter Ratten (Serkova et al., 2001). Somit konnte an den drei Modellen primäre Astrozyten, Gehirnschnitte und zwei Wochen alte Ratten jeweils eine synergistische Verstärkung der metabolischen Toxizität von Ciclosporin durch Sirolimus belegt werden. Dass sich diese synergistische Wirkung nicht nur auf die metabolische Toxizität begrenzt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Der oxidative Stress in Gehirnschnitte nach Perfusion mit der Kombination aus Ciclosporin + Sirolimus war deutlich erhöht gegenüber der Ciclosporinmonobehandlung (Kapitel *2.3.1*).

Anders hingegen die C6-Gliomazellen. Diese wichen nicht nur in Bezug auf oxidativen Stress von den anderen Modellen ab. Die Effekte der Immunsuppressiva auf den Energiestoffwechsel der C6-Zellen unterschieden sich ebenfalls von den zuvor gemachten Beobachtungen. Es zeigte sich zwar wieder der Schutzeffekt von Everolimus gegenüber der Metabolismustoxizität von Ciclosporin, die beiden Makrolide Sirolimus und Everolimus verringerten in der Monoinkubation neben der glykolytischen Aktivität jedoch auch die mitochondriale Energiegewinnung (Miljus, 2002). Dies geschah für beide Stoffe im selben Ausmaß. Ciclosporin senkte ebenfalls abweichend zu den bisherigen Beobachtungen beide Möglichkeiten der Energiegewinnung. Wobei jedoch zu bedenken ist, dass die Glykolyseaktivität von Tumorzellen auch unter Kontrollbedingungen sehr viel höher ist, als die von nichtmalignen Zellen. Dieses als Warburg-Effekt bekannte Phänomen führt zu einer für Tumorzellen charakteristischen, erhöhten Laktatbildung, da die schnell proliferierenden Krebszellen einen erhöhten Energiebedarf besitzen. Insofern kann vermutet werden, dass die

C6-Gliomazellen weniger anfällig auf die Inhibition der Energiegewinnungswege sind, als normale Zellen. Die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus zeigte dann auch keine zusätzliche Dramatisierung der Energiesituation. Somit hatten alle Inkubationen außer der Kombination Ciclosporin und Everolimus in etwa dieselben Auswirkungen auf den Energiemetabolismus der C6-Zellen. Diese geringe Empfindlichkeit spiegelte sich mit Ausnahme von Sirolimus und Everolimus auch im oxidativen Stress wider. Verglichen mit primären Astrozyten entstanden nach der Inkubation mit diesen beiden weniger ROS. Der bereits erwähnte starke Anstieg im oxidativen Stress durch Sirolimus oder Everolimus lässt sich durch die Antitumorwirkung der Makrolide erklären. Dass die C6-Glioma-Zellen entsprechend empfindlich auf die Inkubation mit Sirolimus oder Everolimus reagierten, stimmt gut mit der zuvor besprochenen, ungewöhnlichen Inhibition beider Energiegewinnungswege überein (Miljus, 2002). Eine Beobachtung, die weder bei primären Astrozyten, Gehirnschnitten noch in einer der *in vivo* Untersuchungen gemacht wurde.

Die Verwendung von C6-Glioma-Zellen, primären Astrozyten und Gehirnschnitten erbrachte Aufschluss über die Tauglichkeit dieser Modelle für ihre Verwendbarkeit, um die neurotoxischen Wirkungen der Immunsuppressiva zu untersuchen. Während die primären Astrozyten noch mit den Gehirnschnitten vergleichbare Veränderungen zeigten, können die C6-Zellen nur als unzureichend bezeichnet werden. Aufgrund ihres tumorösen Ursprungs wichen die gemachten Beobachtungen nach Inkubation mit den Immunsuppressiva teilweise erheblich von den *in vivo*-Ergebnissen ab. Für die Astrozyten und Gehirnschnitte waren die Vergleiche der Kurzzeit- mit den Langzeitinkubationen, sowohl in Bezug auf den oxidativen Stress, als auch die metabonomischen Untersuchungen sehr aufschlussreich. Die Korrelation der beiden Methoden offenbarte deutliche Parallelen bezüglich der Wirkungen der Immunsuppressiva. Hierbei zeigte sich dann auch, dass die Gehirnschnitte das deutlich bessere und empfindlichere Modell für die Neurotoxizität der Medikamente sind. Während die primären Astrozyten relativ gleichförmig blieben im oxidativen Stress, spiegelten sich bei der Untersuchung der Gehirnschnitte sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitinkubation deutlich die Effekte wider, die auch anhand der metabonomischen Studien beobachtet wurden. Somit lässt sich als Eignung für die Betrachtung der neurotoxischen Wirkungen der Immunsuppressiva und der jeweiligen Kombination mit Ciclosporin die folgende Reihe aufstellen:

Gehirnschnitte > primäre Astrozyten > C6-Glioma-Zellen

Die cytotoxischen und Apoptoseuntersuchungen der Medikamente belegten deutlich, dass außer bei sehr hohen, klinisch unrelevanten Konzentrationen keiner der drei Stoffe eine akute Toxizität besitzt. Für alle drei Immunsuppressiva konnten nekrotische und für Sirolimus und Everolimus auch apoptotische Wirkungen ausgeschlossen werden. Der Apoptose auslösende Einfluss von Ciclosporin hat verglichen mit seiner Metabolismustoxizität andere Zeit- und Konzentrationsverläufe. Sowohl die benötigte Dauer, als auch die Konzentration ab der Apoptose eintritt ist viel höher, als die Zeit und Menge die ausreicht, damit Ciclosporin oxidativen Stress verursacht oder eine Inhibition des Energiemetabolismus hervor ruft. Zum Modell der primären Astrozyten sei noch erwähnt, dass die *in vivo* sehr wichtigen pharmakokinetischen Effekte relativ unbeachtet bleiben. Nichtsdestotrotz können apoptotische Wirkungen von Ciclosporin auch in der *in vivo* Situation eine Rolle spielen. Vor allem in Anbetracht der sehr viel längeren Exposition des Organismus gegenüber Ciclosporin und somit den beschriebenen toxischen Wirkungen des Immunsuppressivums.

3. Ergebnisse und Diskussion – *in vivo*

3.1 Verwendete Immunsuppressivakonzentrationen

Für die meisten der *in vivo* Behandlungen wurden sechs Monate alte männliche Wistar Ratten mit anfänglichen Körpergewichten von 210±30 g verwendet. Die Ratten wurden in sechs Behandlungsgruppen gemäß Tabelle ***3.1*** eingeteilt (vergleiche auch Kapitel 5.4). Die verwendeten oralen Dosen basierten auf Studien an zwei Wochen alten Ratten und isolierten Gehirnschnitten (Serkova et al., 1999; 2001) und wurden den Konzentrationen der Immunsuppressiva angepasst, die in Gehirnschnitten zu signifikanten Effekten führten (Serkova et al., 1999). Für die Vergleichstudien, deren Ergebnisse in Kapitel *3.4*. wiedergegeben sind, wurden 10 Tage alte (durchschnittlich 25 g Körpergewicht; beide Geschlechter) und sechs Monate alte weibliche oder männliche Ratten (durchschnittlich 180 g Körpergewicht) benutzt.

Tabelle 3.1 : Behandlungsgruppen für die *in vivo* Versuche

(I)	Kontrollgruppe	13 ml (10% Ethanol in Milch) / je kg / Tag
(II)	Ciclosporin	10 mg/kg/Tag
(III)	Sirolimus	3 mg/kg/Tag
(IV)	Everolimus	3 mg/kg/Tag
(V)	Ciclosporin + Sirolimus	10 mg/kg/Tag + 3 mg/kg/Tag
(VI)	Ciclosporin + Everolimus	10 mg/kg/Tag + 3 mg/kg/Tag

3.2 Allgemeine Toxizität – Gewichtsabnahme

Während der gesamten Behandlungszeit und insbesondere nach dem Verabreichen der täglichen Dosis an Medikamenten wurden die Ratten auf Veränderungen in ihrem Verhalten, Appetit, Aktivität und Aussehen hin beobachtet. Die Tiere wurden jeden Tag nach dem Geben der täglichen Medikamentendosis gewogen. Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten sechs Monate alten, erwachsenen männlichen und weiblichen Ratten zeigten dabei keine Schwankungen im Körpergewicht. Im Gegensatz dazu variierte das Wachstum zwei Wochen alter behandelter, männlicher und weiblicher Ratten teilweise erheblich. In einer von Serkova et al. (2001) durchgeführten Studie zeigte sich in jeder Behandlungsgruppe ein verringert ansteigendes Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigten Ciclosporin und die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus die stärkste Wachstumsinhibition.

3.3 Behandlung erwachsener männlicher Ratten

3.3.1 Energiemetabolismus – Biochemische Untersuchungen

Wie bereits in den Erläuterungen zu den Ergebnissen der Zellkulturversuche dargelegt wurde, hatten die Immunsuppressiva deutliche Auswirkungen auf den Energiemetabolismus der Zellen. Es wurde daher versucht durch die Bestimmung der Aktivität für den Glukosemetabolismus wichtiger Enzyme die molekularen Wirkmechanismen der Medikamente diesbezüglich genauer einzugrenzen. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase stellt einen markanten Marker für das Maß der cytosolischen Energiegewinnung dar. Die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat durch die Laktatdehydrogenase findet verstärkt statt, wenn die mitochondriale Energiegewinnung nicht genügend Energie in Form von ATP liefert. In zwei Reaktionsschritten der Glykolyse werden Reduktionsäquivalente auf NAD^+ übertragen, die unter optimalen Bedingungen in das Mitochondrium weitergegeben werden, wo sie in die oxidative Phosphorylierung eingehen. Durch die Weitergabe wird das NAD^+ normalerweise regeneriert und steht wieder für die Glykolyse zur Verfügung. Ist aus irgendwelchen Gründen diese Regeneration gestört, wird das Glykolyseendprodukt Pyruvat weniger in das Mitochondrium transportiert und stattdessen verstärkt durch die Laktatdehydrogenase in Laktat umgesetzt, wodurch das NAD^+ für die Erhaltung der glykolytischen Aktivität wieder gewonnen wird. Der Energiezustand der Zelle wird somit auch gut durch das Verhältnis von NADH zu NAD^+ wiedergegeben. Dieses Verhältnis liegt stark auf der Seite von NAD^+. Leider war es nicht möglich aus den Gehirnextrakten das NADH mit einer biochemischen Methode zu bestimmen, so dass nur die Konzentrationen von NAD^+ gemessen wurden.

Das Enzym Malatdehydrogenase ist ein Bestandteil des Citratzyklus und katalysiert die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat. Wenn man den Eintrittspunkt von Pyruvat in den Zyklus als Anfang definiert, katalysiert die Malatdehydrogenase, somit den letzten Schritt. Die Bestimmung ihrer Aktivität soll Auskunft darüber geben, ob das Enzym beteiligt ist an der durch die Immunsuppressiva hervorgerufenen, verschlechterten Energiesituationen der Zellen.

Keine der Behandlungen führte jedoch zu signifikanten Änderungen der Gesamtaktivität der Laktatdehydrogenase im Gehirn der behandelten Ratten (Abb. **3.1A**). Auch die Konzentration von NAD^+ wurde durch die Immunsuppressiva nicht signifikant gegenüber

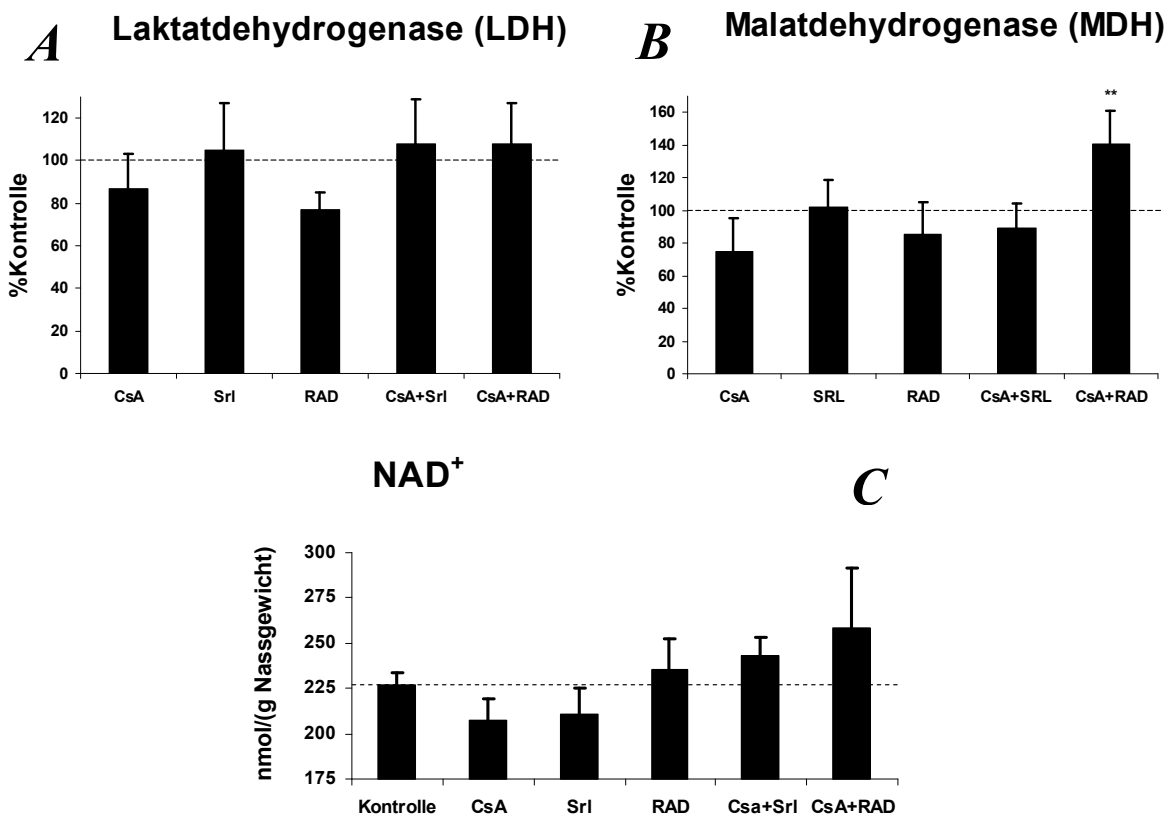


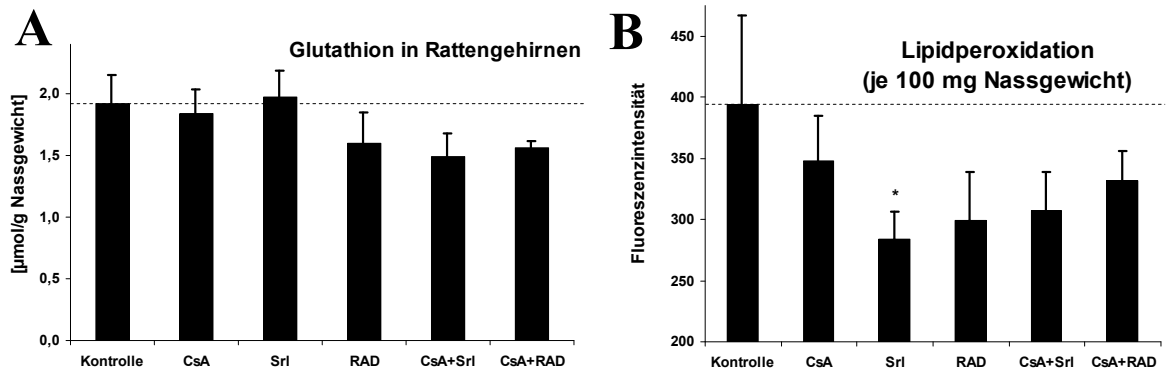
Abbildung 3.1: Einfluss der Immunsuppressiva auf die Aktivität von Laktatdehydrogenase und Malatdehydrogenase und auf die Konzentration von NAD^+ im männlichen Rattengehirn

Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt. Die Aktivitäten der Enzyme und die Konzentrationen von NAD^+ wurden in gefrorenem Hirngewebe nach Extraktion bestimmt. Als Kontrolle dienten Gehirne von Ratten die mit einer Mischung aus 10% Ethanol in Milch behandelt wurden. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrolle: ** P<0,01

dem Kontrollwert von 227±6 nmol/(g Nassgewicht) verändert (Abb. **3.1C**). Lediglich die Aktivität der Malatdehydrogenase war in den Gehirnen der Ratten erhöht, die mit Ciclosporin und Everolimus behandelt worden waren. Die Malatdehydrogenaseaktivität nach Behandlung mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin und 3 mg/kg/Tag Everolimus betrug 140±21% der Kontrolle (Abb. **3.1B**).

3.3.2 Oxidativer Stress

In der Zellkultur führte die Inkubation mit den Immunsuppressiva teilweise zu oxidativem Stress. Um herauszufinden, ob auch *in* vivo eine Störung im Gleichgewicht der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Abbau durch antioxidative Mechanismen vorlag, wurde in den Gehirnen behandelter Ratten der Glutathiongehalt und das Ausmaß an Lipidperoxidation bestimmt.



<u>Abbildung 3.2:</u> Einfluss der Immunsuppressiva auf die Konzentration von Glutathion und Ausmaß an Lipidperoxidation nach Behandlung im männlichen Rattengehirn

Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt. Die Konzentration von Glutathion und das Ausmaß an Lipidperoxidation wurden in gefrorenem Hirngewebe nach entsprechender Extraktion bestimmt. Als Kontrolle dienten Gehirne von Ratten die mit einer Mischung aus 10% Ethanol in Milch behandelt wurden. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrolle: * $P<0,05$

Die Glutathionkonzentration von durchschnittlich 1,9±0,2 µmol/g Nassgewicht veränderte sich durch die Behandlung mit den Immunsuppressiva nicht signifikant (Abb. **3.2A**). Erhöhte Werte an Lipidperoxidation wurden ebenfalls nach keiner der Behandlungen gefunden (Abb. **3.2B**). Mit Sirolimus behandelte Ratten hatten ein gegenüber der Kontrolle signifikant verringertes Ausmaß an Lipidperoxidation. Allerdings unterlagen alle Werte der Lipidperoxidationsbestimmungen recht großen Schwankungen und insbesondere der Kontrollwert zeigte große Abweichungen.

3.3.3 NMR-Korrelation

Entsprechend den NMR-Messungen der primären Astrozyten wurden auch die Gehirne der gemäß Tabelle ***3.1*** behandelten Ratten untersucht. Diese Messungen wurden unter Leitung von Frau Dr. Serkova vorgenommen. Wie sich herausstellte erlaubte die kompliziertere Aufarbeitung des Hirngewebes im Vergleich zur Aufarbeitung der Zellen, keine zuverlässige ^{31}P-NMR-Messungen. Die mit der ^{31}P-NMR bestimmbaren energiereichen Phosphate waren zu empfindlich gegenüber den hypoxischen Bedingungen, die während der Aufarbeitung des Gewebes unweigerlich auftreten. *In vivo* ^{13}C-Messungen mit markierter Glukose wurden keine vorgenommen. Dass diese Möglichkeit jedoch besteht, zeigten Serkova et al. (2003) vor kurzem.

Tabelle 3.2 : Veränderungen im Energiestoffwechsel des Gehirns erwachsener Ratten

	Kontrolle [µmol/g]	CsA	Srl	RAD	CsA+Srl	CsA+RAD
Laktat (Glykolyse)	13,1±2,6	121±17%	87±5%*	83±5%*	62±11%***	83±6%*
Glutamat (Citratzyklus)	17,6±3,3	85±9%	96±5%	110±4%*	71±8%***	118±9%*
PCr (Energiespeicher)	13,7±2,7	91±5%	92±6%	102±7%	55±6%****	94±4%

Außer den Kontrollwerten sind alle Werte als % der Kontrolle angegeben und entstammen fünffachen Bestimmungen. Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrollwerte: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; ****P < 0,0001

Die erwachsenen Ratten mit einer voll entwickelten Bluthirnschranke zeigten deutlich weniger Anfälligkeit gegen die durch Immunsuppressiva induzierte Metabolismustoxizität, wie sie bei den primären Astrozyten beobachtet wurde. Die drei Monotherapien hatten nur geringe Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel (Tab. ***3.2***). Die Konzentration des Laktats, das als Maß für die Glykolyseaktivität dient, wurde durch die Monobehandlung mit Sirolimus oder Everolimus geringfügig gegenüber der Kontrolle verringert. Everolimus steigerte gleichzeitig jedoch die mitochondriale Energiegewinnung, erkennbar an der

erhöhten Konzentration des Glutamats, das aus Zwischenprodukten des Citratzyklus synthetisiert wird. Die Kombination aus Ciclosporin und Everolimus zeigte dasselbe Muster wie die Monotherapie mit Everolimus. Als äußerst unvorteilhaft erwies sich wiederum die gemeinsame Behandlung mit Ciclosporin und Sirolimus. Sowohl die Laktat- als auch die Glutamatkonzentration waren erheblich verringert. Zusätzlich war auch die Menge des vorhandenen Energiespeichermoleküls Phosphokreatin (PCr) auf die Hälfte gefallen.

3.4 Junge Ratten verglichen mit erwachsenen männlichen und weiblichen Ratten

3.4.1 Metabolismus

Der Energiemetabolismus im Gehirn junger Ratten zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu alten Ratten. Die anaerobe, cytosolische Energiegewinnung war im Vergleich zur aeroben, mitochondrialen merklich erhöht. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Gehirn junger Ratten betrug 402±56 (µg/ml)/g Nassgewicht gegenüber 242±11 (µg/ml)/g Nassgewicht bei erwachsenen, männlichen Ratten, während die Aktivität der Malatdehydrogenase bei jungen Ratten mit 709±129 (µg/ml)/g Nassgewicht deutlich niedriger ausfiel als bei erwachsenen männlichen Ratten mit 1719±446 (µg/ml)/g Nassgewicht (Abb. **3.3A&B**). Dies ging einher mit einer geringeren Konzentration an NAD^+ im Gehirn der jungen Ratten (Abb. **3.3C**). Die jungen Ratten hatten somit eine höhere glykolytische Aktivität, während bei den erwachsenen, männlichen Ratten die mitochondriale Energiegewinnung im Vordergrund stand.

Erwachsene, weibliche Ratten hatten die höchste Konzentration an NAD^+ (Abb. **3.3C**) obwohl die Aktivität ihrer Malatdehydrogenase in etwa auf dem Niveau der jungen Ratten lag und somit auch deutlich unter der Aktivität der erwachsenen, männlichen Ratten (Abb. **3.3B**). Auch im Falle der Laktatdehydrogenaseaktivität zeigten die weiblichen Ratten Ähnlichkeiten zu den jungen Ratten (Abb. **3.3A**).

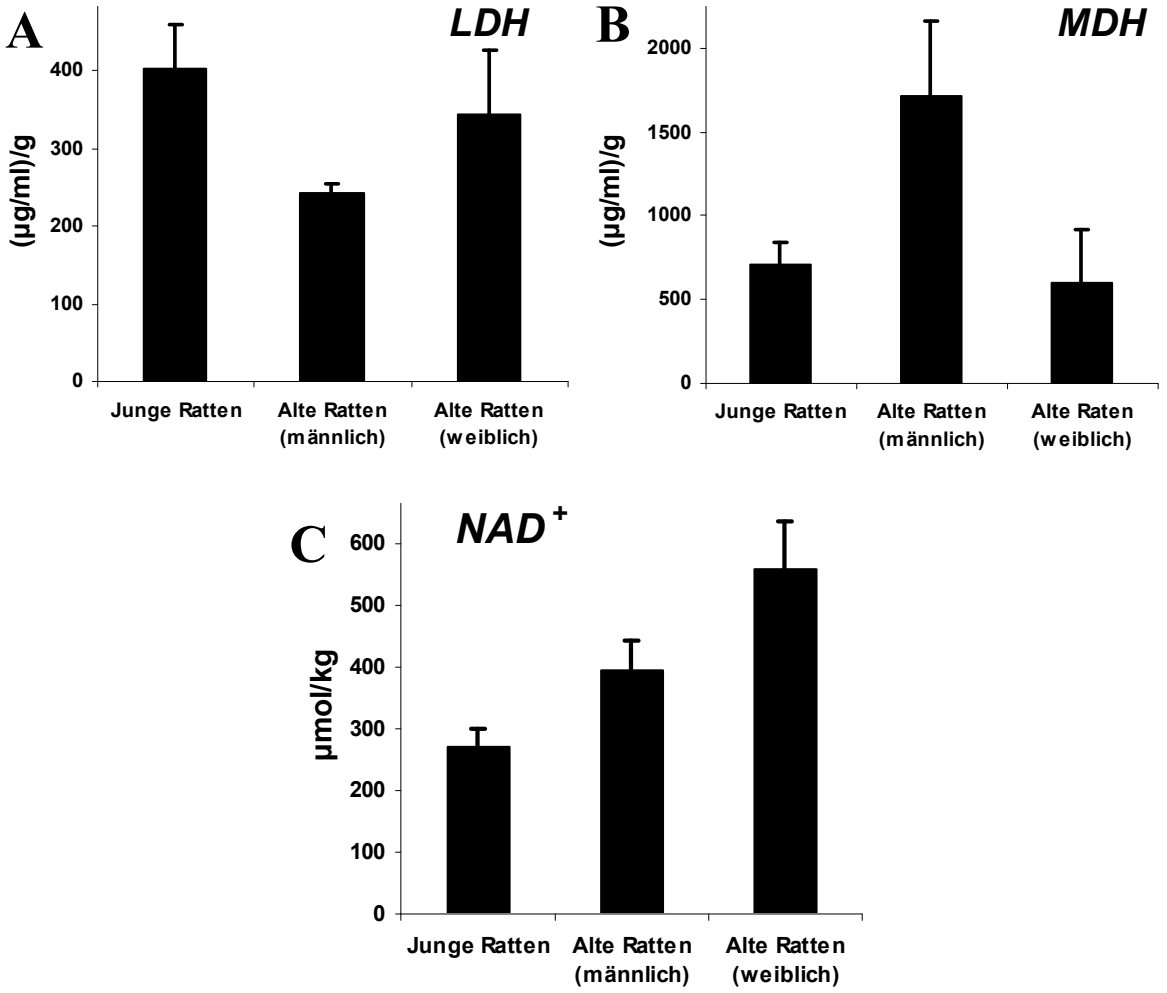


Abbildung 3.3: Aktivitäten von Laktatdehydrogenase und Malatdehydrogenase und Konzentration von NAD^+ im Rattengehirn junger Ratten und alter männlicher oder weiblicher Ratten

Die Aktivitäten der Enzyme und die Konzentrationen von NAD^+ wurden in gefrorenem Hirngewebe nach Extraktion bestimmt.

Tabelle 3.3 : Signifikanz der Messungen untereinander

	Junge Ratten	Alte Ratten (männlich)	Alte Ratten (weiblich)
Junge Ratten	-	** / **** / **	- / - / ***
Alte Ratten (männlich)	** / **** / **	-	- / ** / **
Alte Ratten (weiblich)	- / - / ****	- / ** / **	-

Angegeben sind die Ergebnisse des TTests der Werte gegeneinander, in der Reihenfolge LDH / MDH / NAD+ : * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P<0,0001

3.4.2 P-Glykoprotein

Die P-gp Studien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Carolyn Cummins (University of California at San Francisco (UCSF), Department of Biopharmaceutical Sciences) vorgenommen.

Um die Aspekte und Wirkung der Bluthirnschranke und die Unterschiede zwischen Alter und Geschlecht der Ratten bezüglich der Immunsuppressivatoxizitäten näher zu beleuchten, wurde das P-Glykoprotein (P-gp) im Gehirn der Ratten mittels Western Blot bestimmt. Das P-gp transportiert als Teil der Bluthirnschranke unter anderem die drei Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus aktiv aus der Zelle heraus und zurück in die Blutbahn (Miller et al., 1997). Cummins et al. (2002) hatten zudem beschrieben, dass sich die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke zwischen Alter und Geschlecht unterscheidet.

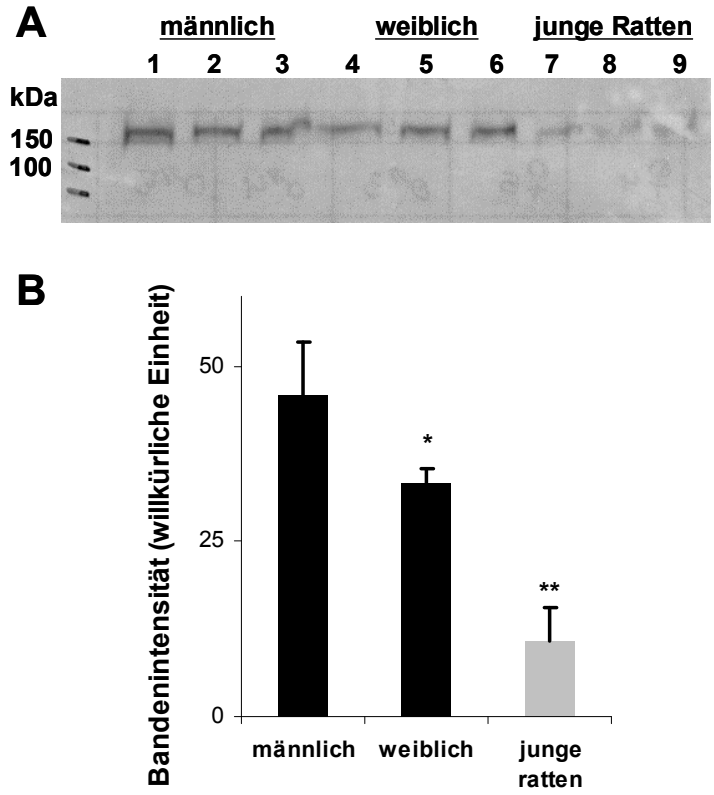


Abbildung 3.4: P-Glykoprotein (P-gp) im Gehirn von Ratten

A: Western Blot zur Bestimmung von P-gp (170 kDa) im Gehirn von jungen (10 Tage) und erwachsenen Ratten (6 Monate, männliche und weibliche). Jede Probe stammte von einem anderen Tier.

B: Quantifizierung der Banden des Blots. Ergebnisse der TTests:
Junge gegen erwachsene Ratten (weibliche oder männliche)
** P < 0,0001
Weibliche gegen männliche erwachsene Ratten
* P < 0,05

Die Menge an P-gp im Gehirn der Ratten unterschied sich deutlich zwischen den beiden Altersgruppen. Das gemessene P-gp war in den erwachsenen Ratten 3 – 4 mal mehr, als in den jungen Ratten (Abb. **3.4**). Ebenfalls wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den erwachsenen Tieren verschiedenen Geschlechts gefunden. Die weiblichen Ratten hatten nur etwa drei Viertel der P-gp Menge der männlichen Ratten (Abb. **3.4**).

3.4.3 Gewebeverteilung der Immunsuppressiva

Die Studien zur Gewebeverteilung wurden in Kooperation mit Dr. Uwe Christians (University of Colorado Health Sciences Center (UCHSC), Department of Anesthesiology) vorgenommen, der freundlicherweise die dortigen Geräte zur Verfügung stellte. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist nachzulesen in Christians et al. (2000).

Die Konzentrationen der Immunsuppressiva wurden in Extrakten aus dem Gehirn von Ratten bestimmt, die gemäß Tabelle ***3.1*** behandelt waren. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Altersgruppen und den Geschlechtern (Tab. ***3.4***). Die Konzentrationen von Ciclosporin, Sirolimus oder Everolimus in den Gehirnen der jungen Ratten waren teilweise erheblich größer, als bei den erwachsenen Ratten mit voll ausgebildeter Bluthirnschranke. Ciclosporin und Everolimus gelangten zudem mehr in das Gehirn männlicher, als in das Gehirn weiblicher Ratten. Die gemessenen Werte stimmen gut mit den in Kapitel *3.4.2* beschriebenen, unterschiedlichen P-gp-Mengen der beiden Altersstufen überein. Anhand der Menge an Immunsuppressiva, die in der Abstufung weibliche Ratten < männliche Ratten << junge Ratten in das Gehirn gelangen, lassen sich mittels NMR beobachtete metabolische Veränderungen erklären. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

Tabelle 3.4 : Konzentrationen der Immunsuppressiva im Gehirn junger und alter Ratten nach sechs Tagen Behandlung

	Jung [ng/g]	Alt [ng/g]	
		männlich	weiblich
CsA	222,1±34,8	119,5±7,1	44,3±4,6
Srl	178,4±21,8	27,1±3,3	25,3±1,9
RAD	81,2±6,0	56,4±21,7	22,4±4,7

Die Werte sind als ng/g angegeben und entstammen mindestens vierfachen Bestimmungen. Wistar Ratten der jeweiligen Altersgruppe wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt.

3.5 Untersuchungen der Rattenniere

3.5.1 Pharmakokinetik – Gewebeverteilung der Immunsuppressiva

Die Konzentrationen der Immunsuppressiva in der Niere erwachsener, männlicher Ratten nach 6-tägiger Behandlung mit den in Tabelle ***3.1*** angegebenen Dosen wurden mit der in Kapitel *3.4.3* erwähnten HPLC/HPLC-MS Methode bestimmt (Tab. ***3.5***). Die Konzentrationen der Medikamente waren in der Niere bis zum 10-fachen höher als im Gehirn der Ratten (bisher unveröffentlichte Daten). Durch die Kombination von Ciclosporin mit Sirolimus oder Everolimus erhöhten sich die Konzentrationen aller verabreichten Immunsuppressiva. Dies deutet auf eine pharmakokinetische Wechselwirkung der Medikamente hin.

Tabelle 3.5 : Nierenkonzentrationen von Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus in männlichen Wistar Ratten nach Mono- und Kombinationstherapie

	Ciclosporin	**Sirolimus**	**Everolimus**
Mono	691,6±265,2	273,5±81,1	239,8±91,1
CsA+Srl	831,5±258,4	435,3±127,6	-
CsA+RAD	935,5±123,2	-	576,6±142,6

Die Werte sind als ng/g angegeben und entstammen siebenfachen Bestimmungen. Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt.

3.5.2 Energiemetabolismus in der Niere – Biochemische Untersuchungen

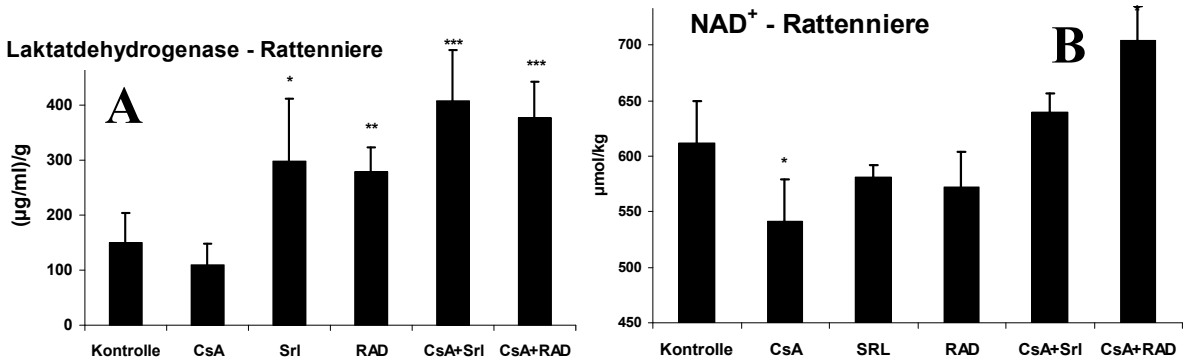


Abbildung 3.5: Einfluss der Immunsuppressiva auf die Aktivität von Laktatdehydrogenase und auf die Konzentration von NAD^+ in männlichen Rattennieren

Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt. Die Aktivität des Enzyms und die Konzentration von NAD^+ wurden in gefrorenem Nierengewebe nach Extraktion bestimmt. Als Kontrolle dienten Nieren von Ratten die mit einer Mischung aus 10% Ethanol in Milch behandelt wurden. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrolle: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

In der Niere behandelter Ratten hatten die Immunsuppressivabehandlungen im Gegensatz zum Gehirn sichtbare Auswirkungen auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase und die NAD^+-Konzentration. Der Kontrollwert der Laktatdehydrogenaseaktivität lag mit 150±53 (µg/ml)/g Nassgewicht unter dem Wert für das Gehirn der Ratten von 300±129 (µg/ml)/g Nassgewicht (Wert des TTests der beiden Ergebnisse gegeneinander: $P < 0,01$). Die Behandlung der Ratten mit Ciclosporin hatte keine Auswirkungen, wohingegen Sirolimus und Everolimus beide die Aktivität der Laktatdehydrogenase erhöhten. Durch die Kombination mit Ciclosporin wurde die Aktivität beide Male noch gesteigert (Abb. **3.5A**). Die NAD^+-Konzentration wurde nur durch Ciclosporin und die Kombination aus Ciclosporin und Everolimus signifikant verändert. Ciclosporin senkte die Konzentration von NAD^+ leicht ab und die Kombinationsbehandlung aus Ciclosporin und Everolimus führte zu einer leicht erhöhten NAD^+-Konzentration (Abb. **3.5B**).

3.5.3 Oxidativer Stress in der Niere – Lipidperoxidation

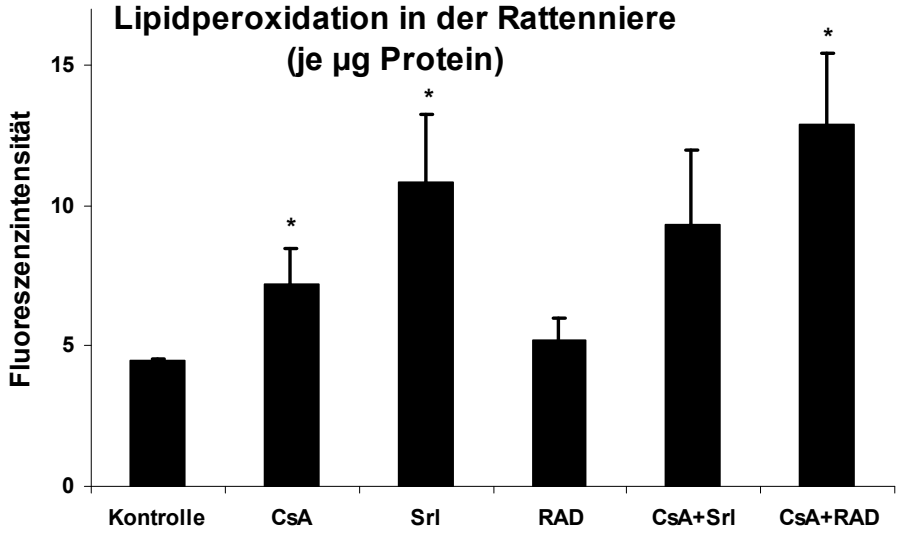


Abbildung 3.6: Ausmaß an Lipidperoxidation nach Immunsuppressivabehandlung

Sechs Monate alte, männliche Wistar Ratten wurden 6 Tage mit 10 mg/kg/Tag Ciclosporin (CsA) und/oder 3 mg/kg/Tag Sirolimus (Srl) bzw. Everolimus (RAD) behandelt. Das Ausmaß an Lipidperoxidation wurde in gefrorenem Nierengewebe nach Extraktion bestimmt. Als Kontrolle dienten Nieren von Ratten die mit einer Mischung aus 10% Ethanol in Milch behandelt wurden. Ergebnisse des TTests gegen die Kontrolle: * P<0,05

Auch auf das Ausmaß an Lipidperoxidation in der Niere hatten die Immunsuppressiva deutlichere Auswirkungen als im Gehirn der Ratten (Abb. **3.6**). Durch die Monotherapien mit Ciclosporin und Sirolimus erhöhte sich der oxidative Stress im Nierengewebe, wobei Sirolimus zu höheren Werten führte als Ciclosporin. Lediglich die Kombination aus Ciclosporin und Everolimus verursachte noch mehr Lipidperoxidation.

3.6 Diskussion – *in vivo*

Die in vivo Untersuchungen der Gehirne erwachsener Ratten zeigten deutlich geringere neurotoxische Wirkungen durch die Immunsuppressiva als dies in den Gehirnen zwei Wochen alter Ratten und in den Gehirnschnitten der Fall war. Das Muster der Wirkungen war vergleichbar mit den Ergebnissen aus Behandlungen der jungen Ratten (Serkova et al., 2001). Sirolimus und Everolimus verringerten auch in den Gehirnen erwachsener Ratten die cytosolische Energiegewinnung. Die Kombination aus Ciclosporin und Sirolimus erwies sich als ebenso ungeeignet, wie bereits anhand der Gehirne junger Ratten und der Gehirnschnitte gezeigt wurde (Serkova et al., 1999; 2000; 2001). Auch in den Gehirnen der erwachsenen Ratten verschlechterte sich die Energiesituation nach sechs Tagen Behandlung mit Ciclosporin+Sirolimus dramatisch. Verglichen mit den jungen Ratten, Gehirnschnitten und primären Astrozyten zeigten die erwachsenen Ratten die geringsten Auswirkungen bezüglich metabonomischer Toxizität durch die Immunsuppressiva. Durch diesen Vergleich mit Behandlungen an jungen und alten Ratten, sieht man deutlich, dass die Neurotoxizität in den jungen Gehirnen ohne Bluthirnschranke sehr viel ausgeprägter auftritt. Die Konzentration von Phosphokreatin sank bei den jungen Ratten im Falle der Behandlung mit Ciclosporin und Sirolimus auf bis zu einem Fünftel des Gehalts unbehandelter Tiere und auch nach Ciclosporinbehandlung fiel der Wert signifikant ab. Bei den erwachsenen Ratten hingegen war der Phosphokreatingehalt nur nach der Kombinationsbehandlung Ciclosporin+Sirolimus signifikant verändert, die Konzentration von Phosphokreatin bei allen anderen Behandlungen blieb auf Kontrollniveau. Dies zeigt deutlich, wie wichtig die Verteilung eines Medikaments im Körper beziehungsweise im jeweiligen Organ für seine toxischen Wirkung ist. In diesem Fall spielt die so genannte Blut-Hirn-Schranke die entscheidende Rolle bezüglich der neurotoxischen Wirkungen. Die Blut-Hirn-Schranke kommt durch eine Auskleidung der Blutgefäße im Gehirn durch Endothelzellen zustande, die zudem untereinander eng verbunden sind. Zusätzlich trägt das P-Glykoprotein (P-gp) zusätzlich zum Schutz bei. Dieses ist ein die Zellmembran durchdringendes Transportprotein und kommt auch in Endothelzellen von anderen Geweben vor, z.B. der Niere (Demeule et al., 2001). In Tumorzellen ist es mit verantwortlich für die Resistenz gegen zahlreiche Krebsmedikamente, da es in diesen häufig überexprimiert ist. Im Gehirn ist es Teil der Blut-Hirnschranke und es transportiert im Allgemeinen unerwünschte Stoffe zurück in den Blutstrom. Durch erhöhte cytotoxische Stimuli kann über die P-gp-Proteinexpression dieser

Schutzmechanismus gesteuert werden (Sukhai et al., 2000). Die drei Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus werden aktiv vom P-Glykoprotein aus der Zelle heraustransportiert (Miller et al., 1997). Laplante et al. (2002) konnten zudem zeigen, dass diese drei Immunsuppressiva konzentrationsabhängig zu unterschiedlichen Anregungen der P-gp-Expression führen. Zudem war die Gewebeverteilung gegenteilig korreliert zur P-gp-Expression, je mehr P-Glykoprotein vorhanden, desto weniger des Immunsuppressivums gelangte in die Zelle. Was wieder rum beachtet werden muss, um die nötige Konzentration zur Erzielung einer therapeutischen Wirkung aufrecht zu erhalten.

Für die drei untersuchten Immunsuppressiva wurden an Ratten Aufnahme- und Verteilungsstudien in verschiedenen Organen vorgenommen. Am interessantesten sind die Ergebnisse von Serkova et al. (2001). Die Konzentration der Immunsuppressiva in Mitochondrien der Gehirne von jungen Ratten wurde nach sechs Tagen Behandlung mit der auch hier verwendeten Methode von Christians et al. (2000) bestimmt. Sirolimus wurde bei Verwendung der therapeutisch wirksamen Dosis weder *in vivo* noch *in vitro* in Mitochondrien nachgewiesen. Erst bei Verwendung einer fünffach größeren Konzentration war Sirolimus in Mitochondrien messbar (Serkova et al., 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass es in der Mitochondrienmembran einen aktiven Transporter für den Export von Sirolimus gibt. Erst bei hohen Sirolimuskonzentrationen wäre dieser Transporter gesättigt und Sirolimus könnte durch die Mitochondrienmembran diffundieren. In der aktuellen Literatur wird jedoch über einen derartigen Transport nichts berichtet. Zwischen Ciclosporin und Everolimus wurde eine direkte pharmakokinetische Wechselwirkung nachgewiesen. In der Kombinationstherapie verringerte Everolimus die Menge an Ciclosporin, die in den Mitochondrien gemessen wurde und die Konzentration von Everolimus war höher als in der Monotherapie mit Everolimus. Da derselbe Effekt bei Messungen des Gesamtgehirngehaltes gesehen wurde, ist eher zu vermuten, dass die gegenseitige Beeinflussung von Ciclosporin und Everolimus bereits bei der Aufnahme in das Gehirn eine Rolle spielt. Wie bereits erwähnt, sind Ciclosporin und Everolimus beide Substrate für das P-Glykoprotein, dass die Aufnahme in das Gehirn regelt (Miller et al., 1997). Sirolimus erhöhte in der Kombinationstherapie mit Ciclosporin sowohl die Blut- als auch die Gehirnkonzentration von Ciclosporin gegenüber der Monobehandlung mit Ciclosporin. Auch hier zeichnen sich wieder organspezifische Effekte ab. In den Nierenmessungen wurden auch erhöhte Konzentrationen an Everolimus nach der Kombitherapie gefunden (vergleiche dazu Kapitel

3.5.1). Jedoch war im Gegensatz zum Gehirn auch die Ciclosporinmenge deutlich erhöht. Mit dieser höheren Ciclosporinkonzentration in der Niere fiel auch der protektive Effekt von Everolimus, wie im Gehirn beobachtet, geringer aus. Ciclosporin in der Monotherapie wurde an verschiedenen Organen zu teilweise stark unterschiedlichen Konzentrationen gefunden. So war die in der Leber gemessene Konzentration mehr als zehnmal so hoch wie im Gehirn und etwa fünf beziehungsweise dreimal so groß wie im Herz oder der Niere (Serkova et al., 2003).

Der Vergleich der *in vivo* mit den *in vitro* Ergebnissen ist nur bedingt möglich, da zum einen die Expositionsdauer in der *in vivo* Situation viel länger war und zum anderen die vielfältigen gegenseitigen Beeinflussungen des kompletten Organismus selbst mit den Gehirnschnitten nur unzureichend nachgebildet werden. Die Wirkungen auf die Energiesituation in den Gehirnschnitten waren in etwa gleich wie die auf die primären Astrozyten. Dass zumindest Ciclosporin verschiedene Wirkungen auf die jeweiligen Zellarten des zentralen Nervensystems hatte, konnte von McDonald et al. (1996) gezeigt werden. Die Behandlung von primären Astrozyten, Oligodendrozyten und gemischten Zellkulturen aus Neuronen und Astrozyten mit Ciclosporin erbrachte konzentrationsabhängige, verschiedene cytotoxische Wirkungen und Reaktionen der drei Zellarten. Am empfindlichsten reagierten Oligodendrozyten, die bereits mit 5 µM Ciclosporin zu 70% abstarben. Neuronen überlebten mit steigenden Ciclosporinkonzentrationen bis 20 µM immer weniger. Die Astrozyten hingegen tolerierten Ciclosporin bis 20 µM problemlos, was sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Im Gehirn und in den Gehirnschnitten liegen jedoch nicht nur die drei Zelltypen vor, sondern noch zahlreiche andere, die ebenso unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Eine genaue Charakterisierung aller Zelltypen und der Wirkung der Medikamente auf diese wäre wünschenswert. Doch auch die Untersuchungen an den primären Astrozyten tragen ihren Teil zum Verständnis bei. Denn wie sich zeigte, hatten die Immunsuppressiva *in vivo* und *in vitro* durchaus vergleichbare Wirkungen in Bezug auf die Energiesituation der Zellen. Die Extrakte der Gehirne und Gehirnschnitte stellen quasi einen Querschnitt durch alle vorkommenden Zelltypen dar. Die primären Astrozyten hingegen bieten ein gutes Modell zur genaueren Charakterisierung.

Die gemessenen Konzentrationen von Zwischenprodukten des Citratzyklus nach Immunsuppressivabehandlung legten die Vermutung nahe, dass eines oder mehrere Enzyme der Energiegewinnungskette veränderte Aktivitäten unter Immunsuppressivaeinfluss besitzen. Da zumeist verringerte Konzentrationen der Zwischenprodukte gemessen wurden, besteht die Möglichkeit, dass die jeweiligen Enzyme direkt inhibiert sind. Die Konzentrationsbestimmung von Zellmetaboliten, die aus Citratzyklusintermediaten entstehen, untermauerten die vermutete Hemmung zusätzlich (Serkova et al., 1999; 2001; 2002; Christians, Gottschalk et al., 2003). Insbesondere die Bestimmungen nach Zugabe von ^{13}C-markierter Glukose sind sehr aufschlussreich, da man daraus direkt ableiten kann, welche Enzyme betroffen sind (Zwingmann et al., 2001; Gottschalk et al., 2003). An behandelten und mit markierter Glucose perfundierten Gehirnschnitten von sieben Tage alten Ratten, wurde nach Ciclosporinbehandlung eine verringerte Konzentration an C4-Glutamat gemessen (Christians, Gottschalk et al., 2003). Gemäß Zwingmann et al. (2001) entsteht das an C4 markierte Glutamat nur durch die enzymatische Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA mittels der Pyruvatdehydrogenase. Nach längerer Inkubationszeit erhöhte sich die Konzentration an C3-Laktat, welches nur mittels cytosolischer Umsetzung von Pyruvat zu Laktat durch die Laktatdehydrogenase entstehen kann. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Aktivitäten der beiden genannten Enzyme verändert sind. Allerdings ist zu beachten, dass nachfolgende Reaktionen der Verbindungen C4-Glutamat und C3-Laktat ebenso beeinflusst sein könnten. Somit muss eine veränderte Konzentration nicht unbedingt bedeuten, dass die Aktivität des betreffenden Enzyms per se inhibiert oder erhöht ist. Mit Sicherheit lässt sich nur sagen, dass unter Ciclosporineinfluss im Gehirn sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die mitochondriale Energiegewinnung abnimmt und sich daraufhin die cytosolische Energiegewinnung erhöht. Genauen Aufschluss darüber, ob die Pyruvatdehydrogenase direkt durch Ciclosporin beeinflusst wird, oder ob dies nur indirekte Auswirkungen sind, könnten nur Messungen der Pyruvatdehydrogenaseaktivität erbringen. In dieser Arbeit wurden keine *in vivo* Behandlungen unter Zusatz von markierter Glukose vorgenommen. Serkova et al. (2003) haben dies jedoch erfolgreich an sechs Monate alten, männlichen Ratten angewendet, und auch *in vivo* die Metabolisierung von 1-^{13}C markierter Glukose verfolgt. Die zuvor gemachten Beobachtungen an primären Astrozyten und perfundierten Gehirnschnitten wurden dadurch auch *in vivo* bestätigt. Die C3-Laktatbildung war erhöht und die Konzentration von C4-Glutamat war gleichzeitig verringert, was auch für andere Organe der Ratte belegt wurde. Zudem wurde gezeigt, dass Sirolimus die toxischen

Effekte von Ciclosporin verstärkt, während Everolimus im Gegensatz dazu das Gehirn vor den Ciclosporinauswirkungen schützt.

Nierentoxizität ist nicht nur die hauptsächliche Nebenwirkung in der therapeutischen Anwendung von Ciclosporin, die hier durchgeführten Untersuchungen an Nieren behandelter Ratten belegen zudem organspezifische Wirkungen. Dies konnte anhand der biochemischen Untersuchungen an extrahierten Gehirnen und Nieren nach der Behandlung mit allen drei Immunsuppressiva deutlich gemacht werden. Dabei waren die Wirkungen in den Nieren deutlicher ausgeprägt, als in den Gehirnen. Dies verwundert insofern nicht, da die Konzentrationen der Medikamente in den Nieren bis zum zehnfachen der Gehirnkonzentrationen nach sechs Tagen Behandlung betrugen. Serkova et al. (2003) haben derartige organspezifische Untersuchungen auf Leber und Herz der Ratten ausgedehnt und anhand von metabonomischen Studien erweitert und charakterisiert, sich dabei jedoch auf die Behandlung mit Ciclosporin beschränkt. Dabei wurden deutliche Unterschiede im Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Organe festgestellt. Dies ist zum einen bedingt durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Ciclosporin im jeweiligen Organ und zum anderen spielt auch die verschiedene Art und Weise der Energiegewinnung in den jeweiligen Zelltypen eine Rolle. Leberzellen kompensierten die durch Ciclosporin verursachten Energieverluste bevorzugt durch vermehrten Abbau ihrer spezifischen Energiereserven in Form des Glykogens. Die Nierenzellen hingegen nutzten zur Kompensation verstärkt die Oxidation gesättigter Fettsäuren, was sich zudem in einer erhöhten Lipidperoxidation niederschlug. Die am stärksten gesunkene NAD^+-Konzentration in der Niere wurde auch in dieser Doktorarbeit mit der biochemischen Methode beobachtet. Nach Behandlung mit Sirolimus und Everolimus wurden in der Niere mit den biochemischen Untersuchungen ebenfalls zum Gehirn verschiedene Auswirkungen beobachtet. Auch hier wieder im Gehirn mit geringerem Ausmaß, als in der Niere, was erneut die pharmakokinetische Wechselwirkung zwischen Ciclosporin und Everolimus aufzeigt. Darüber hinausgehende organspezifische Wirkungen sind genauso denkbar wie sie bereits mit Ciclosporin gezeigt wurden. Genauere Untersuchungen diesbezüglich, z.B. mit metabonomischen Studien könnten darüber Aufschluss bringen.

Wie schon in der Diskussion zur *in vivo* Neurotoxizität erwähnt wurde sind Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus Substrate für das P-Glykoprotein (P-gp) (Hebert, 1997; Miller et

al., 1997; LaPlante et al., 2002; Cummins et al., 2003). Dieses spielt nicht nur eine Rolle bei der Aufnahme der Medikamente ins Gehirn, sondern bereits bei der Absorption im Magen-Darm Trakt nach oraler Gabe. In den Zellen, welche die Darmwand auskleiden (hauptsächlich Enterozyten) liegen sowohl P-gp als auch das Ciclosporin metabolisierende Enzym Cytochrom P450 3A4 zusammen vor. Diese Kombination aus aktivem Export zurück in das Darminnere und sofortiger Metabolisierung führt dazu, dass bis zu 51% von oral verabreichtem Ciclosporin gar nicht erst in das Blut gelangen. Bedenkt man noch die Menge, die unabsorbiert den Magen-Darm Trakt passiert und den Anteil, der nach der Aufnahme in das Blut in der Leber metabolisiert wird, verbleiben nur 27% Ciclosporin, die eine therapeutische Wirkung entfalten können.

Es wurde vermutet, dass die Expression des P-gp sowohl alters- als auch geschlechtsabhängig ist (Cummins et al., 2002). Die deutlich unterschiedlichen Ergebnisse metabonomischer Studien an jungen und erwachsenen Ratten ließen dies bereits vermuten. Zudem wurden in den Gehirnen weiblicher, erwachsener Ratten andere Enzymaktivitäten der beiden Enzyme Laktatdehydrogenase und Malatdehydrogenase gemessen, als bei männlichen Ratten. Dies wurde deutlicher durch die Betrachtung der im Rattengehirn vorhandenen P-gp-Mengen und der daraus resultierenden Medikamentenverteilung im Gehirn der Ratten. Bedenkt man dazu die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen bezüglich metabolischer Toxizität der Immunsuppressiva in den verschiedenen Altersstufen, wird deutlich dass das P-gp dafür eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Die jungen Ratten (10 Tage) hatten sehr viel weniger P-gp im Gehirn, als die sechs Monate alten Ratten. Das führte zu einer höheren Konzentration der Medikamente im Gehirn der jungen Ratten und die Auswirkungen der Immunsuppressiva auf den Energiemetabolismus waren entsprechend stärker ausgeprägt, als bei den erwachsenen Ratten (Serkova et al., 2001; Kapitel *3.3.3*).

3.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben sowohl neue Fragen aufgeworfen, als auch mögliche Schritte zur Beantwortung ebendieser aufgezeigt. Zur weiteren Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen und daraus resultierender Toxizitäten der Immunsuppressiva bieten sich mehre Vorgehensweisen an.

- Bestimmungen der Enzymaktivitäten der Pyruvatdehydrogenase und der Pyruvatcarboxylase, um die Inhibition des Energiemetabolismus näher zu spezifizieren.

- Bestimmungen der Proteinexpression betroffener Enzyme des Energiemetabolismus, um Wirkungen auf Genebene aufzuklären.

- Benutzung ^{13}C-markierter Glukose bei *in vivo*-Untersuchungen von Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus. Serkova et al. (2003) konnten bereits zeigen, dass eine derartige Behandlung möglich ist und verwertbare Ergebnisse liefert.

- Konsequente Anwendung metabonomischer Studien mittels NMR in anderen Organen nach Behandlung mit den Immunsuppressiva um die gewebespezifischen Wirkungen zu erkennen.

- Verwendung von Derivaten der Immunsuppressiva. Als Beispiel sei das Derivat „Me-Ile-4-CsA“ (CsD) von Ciclosporin genannt, welches zwar wie Ciclosporin an Cyclophilin D bindet, aber in diesem Komplex keine Calcineurininhibition zeigt. Benutzt man verschiedene Derivate mit unterschiedlichen Eigenschaften und untersucht die vom Ciclosporin bekannten Toxizitäten, könnten sich so Hinweise auf die genaueren Mechanismen ergeben.

Abschließend bleibt noch anzumerken, dass auch durch die Untersuchungen des Leukämiemedikamentes Imatinib (vergleiche dazu Kapitel *4*) gezeigt werden konnte, wie wertvoll die Kombination aus „klassischen“ biochemischen Methoden und metabonomischen Studien mittels NMR ist. Somit erscheint die Anwendung dieser Kombination auch für andere Medikamente und Fragestellungen als sinnvoll.

4. Imatinib (Glivec™)

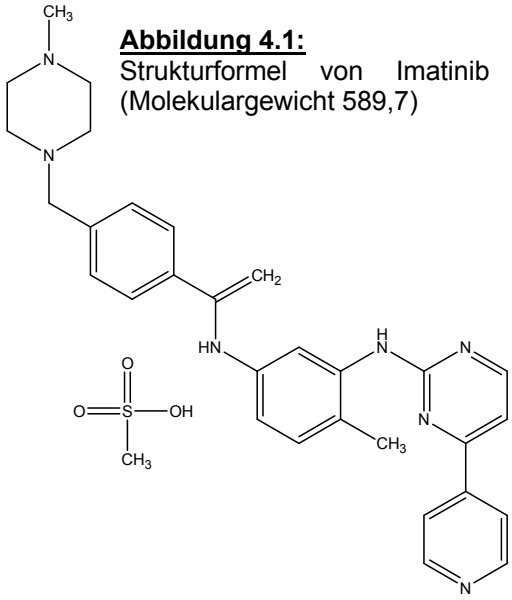


Abbildung 4.1:
Strukturformel von Imatinib (Molekulargewicht 589,7)

Imatinib (Glivec™, Gleevec™, STI571) gehört zu einer neuen Klasse von antiproliferativ wirksamen Krebsmedikamenten, den Signalübertragungs-inhibitoren (STI: *signal transduction inhibitors*; Deininger et al., 1997). Diese Wirkstoffklasse interferiert mit intrazellulären Signalübertragungs-wegen, die eng mit der Entstehung und dem Wachstum von Krebszellen verbunden sind. Das molekulare Ziel von Imatinib ist das bei chronischer myeloischer Leukämie (CML: *chronic myelogenous leukemia*) spezifische Enzym BCR-ABL Tyrosinkinase. Dieses ist das Produkt des Onkogens bcr/abl, dass durch eine Translokation von Chromosom 22 auf Chromosom 9 in tumorösen Leukozyten entsteht. Das daraus resultierende Chromosom ist auch als Philadelphia-Chromosom bekannt (Hehlmann et al., 2000). Die Tyrosinkinase spielt eine Schlüsselrolle beim Tumorwachstum, indem sie die Zellproliferation fördert durch ständige Phosphorylierung von Wachstumssignalen. Imatinib wurde als selektiver Inhibitor für diese in CML-Zellen stark exprimierte BCR-ABL Tyrosinkinase entwickelt. In einem von uns eingereichten Artikel (Gottschalk et al., 2003) wurden die Ergebnisse klassischer biochemischer und molekularbiologischer Methoden, kombiniert mit den Ergebnissen metabonomischer Studien mittels NMR zusammengefasst. Es hat sich gezeigt, dass diese Methodenkombination eine perfekte Möglichkeit zur Untersuchung von Krebsmedikamenten darstellt.

4.1 Wachstumsinhibition

Zwei menschliche bcr/abl +/+ Zelllinien CML-T1 und K562 und die bcr/abl -/- Zelllinie HC-1 wurden in Suspensionskultur mit dem Medium RPMI 1640 (10% FCS für CML-T1 und K562; 20% FCS für HC-1) kultiviert. Die Zellzahl wurde bei etwa $1{,}0*10^6$ je ml Medium gehalten. Die Zellen wurden bei 37°C mit 95%Luft/5% CO_2 inkubiert und alle 96 Stunden mit einer 1:4-Verdünnung subkultiviert. Imatinibkonzentrationen von 0,05 bis 10 µM

wurden zugesetzt und die Zellen damit bis zu 96 Stunden behandelt. Zellproliferation und Zellvitalität wurden mittels Zellzählung alle 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop mit Trypan Blau geprüft. Nach 96 Stunden Inkubationszeit inhibierte Imatinib die Zellproliferation der beiden bcr/abl-positiven Zelllinien K562 und CML-T1, hatte jedoch keine Auswirkung auf die Proliferation der bcr/abl-negativen Zelllinie HC-1. Die ermittelten IC_{50}-Werte (Konzentration bei der die Proliferation zu 50% inhibiert ist) für 96 Stunden betragen für die K562-Zellen 0,26±0,04 µM und für die CML-T1-Zellen 0,38±0,06 µM (Abb. **4.2**). Bei der Zellzählung unter dem Mikroskop wurde außer bei den höchsten Imatinibkonzentrationen von 5 und 10 µM bei keiner der Zelllinien eine Erhöhung der Anzahl abgestorbener Zellen beobachtet.

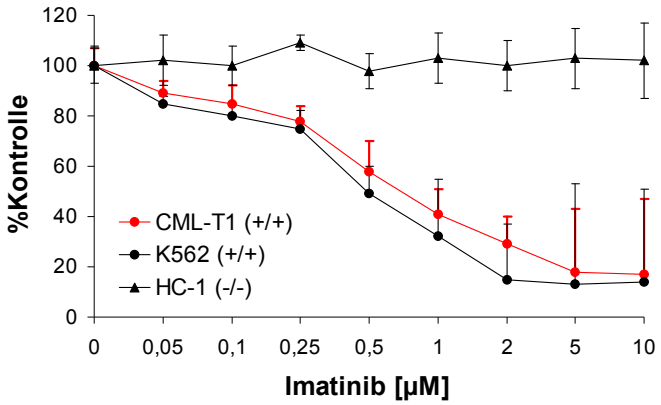


Abbildung 4.2: Wachstumskurven

Die Zellen wurden für 96 Stunden mit Imatinib inkubiert. Die Zellzahl wurde mit Trypan Blau unter dem Lichtmikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer (Haematocytometer) ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

4.2 Apoptose

Die Induktion von Apoptose wurde mittels der „DNA-Leiter“ Methode überprüft. In keiner

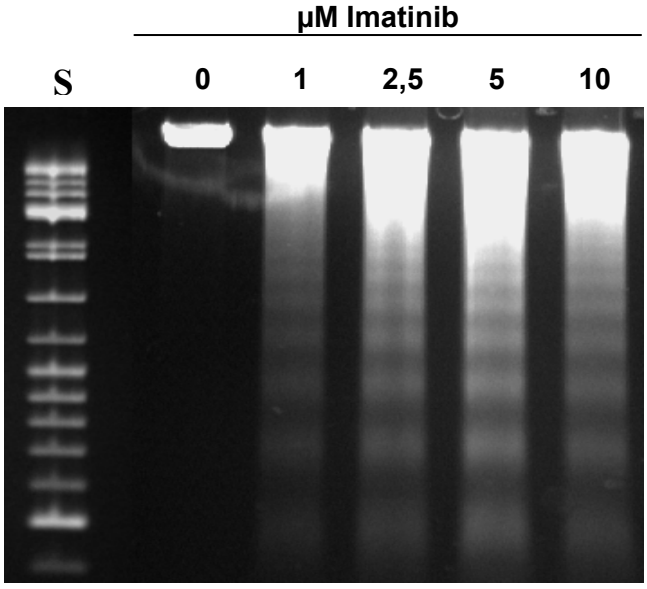


Abbildung 4.3.: Imatinib-induzierte Apoptose in bcr/abl +/+ K562-Zellen

K562-Zellen wurden 24 Stunden mit Imatinib inkubiert. Das leiterförmige DNA-Fragmentmuster zeigte sich bereits ab 1 µM Imatinib. Als Standard (S) wurde ein Mix aus DNA-Fragmenten in der Größe von 100 bis 10000 Basenpaaren benutzt.

der beiden bcr/abl-positiven Zelllinien wurde Apoptose für Imatinibkonzentrationen unterhalb des jeweiligen IC_{50}-Wertes gefunden. Nach 24 Stunden Inkubation wurde mit CML-T1-Zellen auch keine Apoptoseinduktion für Konzentrationen bis zu 5 µM festgestellt, was etwa dem 13-fachen des IC_{50}-Wertes entspricht. Die zweite bcr/abl-positive Zelllinie K562 reagierte deutlich empfindlicher in Bezug auf apoptotische Prozesse. Das leiterähnliche DNA-Fragmentmuster wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit mit verschiedenen Imatinibkonzentrationen, beginnend ab 1 µM beobachtet (Abb. **4.3**). HC-1-Zellen zeigten nach 24 Stunden Inkubation mit Imatinib bis zu 10 µM keinerlei Anzeichen von Apoptose.

4.3 Veränderungen im Metabolismus

Anhand der NMR-Messungen von mit Imatinib inkubierten Leukämiezellen wurden drastische Veränderungen des Glukosemetabolismus in bcr/abl-positiven Zellen festgestellt. Nach 96 Stunden Inkubation mit 0,25 µM Imatinib verringerte sich die Glykolyseaktivität auf 65% der Kontrolle in K562-Zellen und auf 77% der Kontrolle in CML-T1-Zellen. Gleichzeitig erhöhte sch die mitochondriale Energiegewinnung auf 147% (K562) und 170% (CML-T1) der Kontrolle. Dies entspricht einem umgekehrten Warburg-Effekt, der normalerweise eine erhöhte Glykolyseaktivität in den meisten Tumorzellen beschreibt. Die aber wohl überraschendste und für Antikrebsmedikamente ungewöhnliche Entdeckung war, dass K562- und CML-T1-Zellen nach Inkubation mit Imatinib erhöhte Werte an energiereichen Phosphaten hatten. Der Energiezustand der Zellen hatte sich also im Ganzen verbessert (Gottschalk et al., 2003).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass metabolische Veränderungen, die auftreten bevor morphologische oder histologische Veränderungen sichtbar werden, leicht mittels der NMR erkannt werden können. Dies gilt vor allem für Tumorzellen, deren Biochemie, und dabei insbesondere die Glukoseaufnahme und der Glukosemetabolismus, gegenüber normalen Zellen stark verändert ist. Veränderungen die durch Behandlungen mit Antitumormitteln hervorgerufen werden, können mittels der NMR schnell erfasst werden, da sowohl Glykolyse, mitochondrialer Glukosestoffwechsel, als auch Energiezustand gleichzeitig erfasst werden können. Die NMR wird damit zur wertvollsten Methode, um den Krebszellmetabolismus und Therapieauswirkungen beziehungsweise deren Effizienz zu verfolgen.

5. Material und Methoden

5.1 Klonale C6-Glioma Zelllinie

C6-Zellen entstammen einem durch N-Nitrosomethylharnstoff in Ratten induzierten Gehirntumor (Benda et al. 1968). Der Tumor entstand aus Gliazellen, ein Zelltyp, der vielfältige Aufgaben zur Versorgung von Neuronen erfüllt. Die Zelllinie entspricht undifferenzierten Vorläufern astroglialer und oligoglialer Zellen. C6 Glioma Zellen besitzen einen hohen Gehalt an verschiedenen glialen Markern (unter anderem das S100-Protein und Inosit) und neigen dazu, in höheren Passagen (etwa ab Passage 80) zu Astrozyten zu differenzieren (Mangoura et al. 1989). Die C6-Zellen wurden von ICN Biomedicals (Meckenheim) bezogen, in DMEM mit 4500 mg/L Glukose (DMEM high Glu), 3700 mg/L $NaHCO_3$ und mit 5% fötalem Kälberserum (FCS: *fetal calf serum*) im Brutschrank bei 37°C in 10% CO_2/90% Luft und 100% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Dem Medium waren die Antibiotika 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zu 1% des Gesamtvolumens zugesetzt. Die Zellen wuchsen jeweils bis fast zur Konfluenz, bevor sie subkultiviert wurden. Konfluent gewachsene C6-Zellen nehmen eine rundliche Form an und haften schwächer an der Kulturschale als sich noch teilende Zellen. Die Zellen wurden mit einer Verdünnung von 1:20 ausgesät.

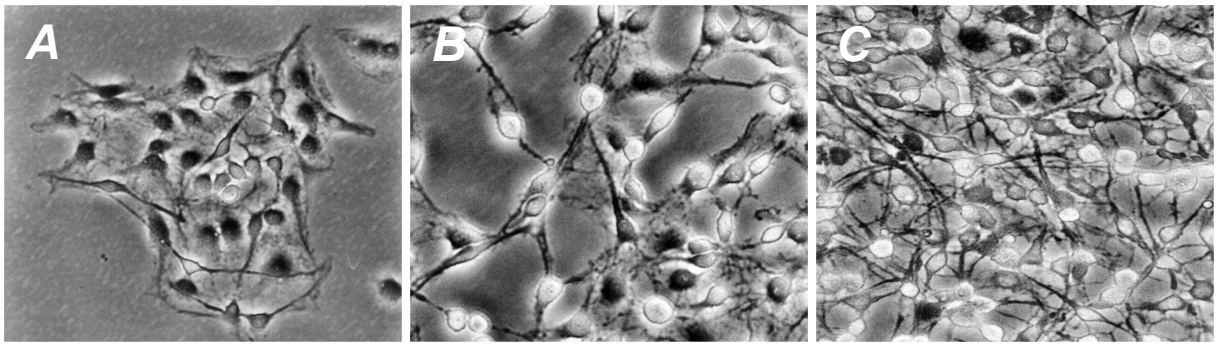


Abbildung 5.1:
Lichtmikroskopische Aufnahmen von C6-Glioma-Zellen (Vergrößerung 1:200)

A **24 Stunden nach Ansetzen**
B **48 Stunden nach Ansetzen**
C **Konfluent gewachsene Zellen**

5.2 Präparation primärer Astrozyten

Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Tierexperimente wurden von den zuständigen Ausschüssen der Universität Bremen genehmigt.

5.2.1 Verwendung von Vorkulturen

Vorkulturen von astroglialen Zellen wurden aus der Kortexregion zwei Tage alter Ratten präpariert (Booher und Sensenbrenner, 1972). Die Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Ratten wurden mit einer großen anatomischen Schere dekapitiert und die Kopfhaut mit einer Sezierschere entfernt. Nach vorsichtigem Öffnen der Schädeldecke durch Einstechen der Schere in das Hintermarkloch, wurde das Cerebellum mit einer Präparierpinzette entfernt. Die Hemisphären des Kortex wurden mit der Pinzette aus dem Kopf gehoben und in eine 92mm Kulturschale mit eisgekühltem PBS überführt. Unter einem Mikroskop trennte man die Hemisphären des Gehirns und entfernte die Hirnhaut und assoziierte Blutgefäße. Die so aufgearbeiteten Gehirnteile wurden in einem eisgekühlten 10ml-Zentrifugenröhrchen mit DMEM (10% FCS) gesammelt. Die weitere Präparation erfolgte unter der Sterilbank. Die Gehirne wurden nun mit einer Pasteurpipette möglichst gut homogenisiert und danach bei 800g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach resuspendieren mit frischem DMEM (10% FCS) wurden die Zellen in 260ml-Kulturflaschen in 20 ml DMEM (10% FCS) angesetzt. Die Zellen wurden unter denselben Umgebungsbedingungen wie die C6-Zellen gehalten und für drei Tage stehen gelassen. Nach dieser Zeit waren alle Neuronen abgestorben und es lag noch eine Mischung von Astrozyten und Oligodendrozyten vor. Das Umsetzen der Vorkulturen in Poly-L-Lysin beschichtete 92mm Schalen war je nach verwendeter Gewebemenge etwa eine Woche nach der Präparation möglich. Um die Oligodendrozyten abzutrennen, wurden die Kulturflaschen kräftig geschüttelt und abgeklopft. Nachdem nochmals mit PBS gespült wurde, wurden die an der Kulturflasche haftenden Astrozyten mit Trypsin/EDTA abgelöst und in den beschichteten 92mm Schalen ausgesät. Nach 2-3 Stunden wurde das Medium komplett gewechselt, womit auch letzte frei schwimmende Oligodendrozyten entfernt wurden. Danach wurden die Astrozyten unter Standardbedingungen für 21 Tage kultiviert und das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

5.2.2 Verwendung von Nylonmembranen

Bei dieser Methode nach Hertz et al. (1989) vereinfachte die Verwendung von Nylonmembranen zum Filtrieren des Gewebehomogenates die Astrozytenpräparation erheblich. Im Gegensatz zur Vorkulturmethode wurden die Astrozyten direkt erhalten und mussten nicht noch mit Trypsin/EDTA abgelöst werden, was streng genommen bedeutete, dass die Astrozyten, die mittels der Vorkulturmethode gewonnen wurden, nicht als primär zu bezeichnen waren. Des weiteren war die Gefahr der Bakterien- und Pilzverseuchung sehr viel geringer. Die Nylonmembranen (10 µm und 80 µm Porengröße) wurden in die Filter eingesetzt und vor Benutzung für 20 Minuten bei 122°C autoklaviert. Die Entnahme der Gehirne erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Im Gegensatz zur Verwendung von Vorkulturen genügten aber kortikale Schnitte der Gehirne. Diese wurden in auf Eis gestellte und mit DMEM (10% FCS) gefüllte 92mm Schalen gegeben. Je Membran konnten Schnitte von 10 neugeborenen Ratten verwendet werden. Die gesammelten Gehirnteile wurden zunächst grob von Adern gesäubert und dann mit einer Feinschere zwei Minuten lang zerkleinert. Dieses grobe Homogenat wurde mit einer sterilen Spritze unter Verwendung einer Einmalinjektionskanüle (0,80x40mm) mehrmals aufgenommen und dann in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zu beachten war, das jeder Schritt auf Eiskühlung durchgeführt wurde. Das Zellgemisch wurde zur Zerstörung der Neuronen bei 1500g fünf Minuten lang zentrifugiert und direkt im Anschluss zwei Minuten lang kräftig auf einem Vortexschüttler gerüttelt. Danach wurde als Erstes durch den 80µm Filter direkt in ein eisgekühltes 10ml-Röhrchen filtriert. Nach weiterem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1500g und Absaugen des Überstands wurde das Pellet in kaltem Medium gelöst und durch den 10µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde mit 37°C warmen Medium aufgenommen und in eine 260ml-Kulturflasche überführt, die auf 200 ml mit warmen Medium aufgefüllt wurde. Die Zelllösung wurde in 92mm Kulturschalen zu je 10 ml aufgeteilt. Nach einem Tag im Brutschrank unter Standardbedingungen wurde das Medium komplett gewechselt. Die Astrozyten erreichten nach 14 Tagen Konfluenz, wobei das Medium alle drei Tage gewechselt wurde.

5.3 Kortikale Gehirnschnitte

Zur Herstellung von Kortikalen Gehirnschnitten mit einer Dicke von 350 µm wurden 6-8 Tage alte Wistar Ratten verwendet. Die Gehirne wurden wie unter 4.2.1 entnommen, das Kleinhirn ebenfalls entfernt und die Schnitte unter Eiskühlung vorgenommen. Die Gehirnschnitte wurden während der Experimente mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid versorgt. Perfundiert wurde mit EBSS (*Earle's Balanced Salts*) und je nach Versuch wurde 10mM Glukose oder 5mM markierte Glukose zugesetzt. Zur metabolischen Erholung wurden die perfundierten Schnitte zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur einer protektiven Hypothermie unterzogen und dann für 90 Minuten bei 37°C stehen gelassen und auch für den Rest des Experiments wurde diese Temperatur gehalten. Nach dieser Erholungsphase von insgesamt zwei Stunden wurde der Perfusionspuffer komplett gewechselt und die gewünschte Inkubation vorgenommen. Die Gehirnschnitte waren bis zu zehn Stunden überlebensfähig (Serkova et al., 1999; 2000).

5.4 Behandlungsgruppen

5.4.1 *Ex vivo* und *In vitro*

Die Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus wurden in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (80:20) als Stammlösungen zu 10 mg/ml für Ciclosporin und zu 1 mg/ml für Sirolimus und Everolimus angesetzt. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Als Kontrolle diente jeweils dieselbe Menge an Acetonitril/Wasser wie bei der höchsten verwendeten Volumenmenge der jeweiligen Inkubationen.

5.4.2 *In vivo*

Für die *in vivo* Behandlungen wurden die Immunsuppressiva als Stammlösungen in Milch zu 1 g/L angesetzt und bei 4°C aufbewahrt. Zur täglichen oralen Gabe mittels Magensonde wurden die Lösungen unter Zusetzen von Ethanol 1:10 verdünnt, so dass eine Ethanolkonzentration von 10% resultierte. Angepasst an das Körpergewicht der Ratten wurden dann die jeweiligen Volumina gemäß den in Kapitel 3.1 beschriebenen Behandlungsgruppen verabreicht. In der Kontrollgruppe wurden 13 ml/kg Körpergewicht

der Mischung 10% Ethanol in Milch gegeben, entsprechend der jeweils höchsten verwendeten Menge in den Kombinationsgruppen Ciclosporin + Sirolimus und Ciclosporin + Everolimus. Sechs Tage nach der ersten und 12 Stunden nach der letzten Gabe wurden die Tiere geköpft und das Blut aufgenommen. Gehirn und Niere wurden ebenfalls entnommen. Gewebe und Blut wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben wurde innerhalb von 20 Tagen vorgenommen.

5.5 Probenaufbereitung

5.5.1 Saccharosepuffer-Extrakte von Geweben

Gewebeproben wurden im Verhältnis 1:10 (Gewicht/Volumen) mit Saccharosepuffer im Potterhomogenisator 30 mal bei 800 rpm homogenisiert. Aliquote des Homogenats wurden für die biochemischen Analysen und zur Proteinbestimmung benutzt. Außer zur Proteinbestimmung waren die homogenisierten Proben sofort weiter zu verarbeiten. Die Saccharosepuffer-Extrakte wurden zur Bestimmung von Glutathion (GSH), Laktatdehydrogenase (LDH) und Malatdehydrogenase (MDH) verwendet.

5.5.2 Perchlorsäure Extraktion von Geweben

Gefrorenes Gehirn- oder Nierengewebe wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser mit einem Pistill zermahlen. Je Extrakt wurde etwa 1 g Gewebe benutzt. In einem 10ml-Zentrifugenröhrchen wurde das gepulverte Gewebe kräftig mit 4 ml 12% Perchlorsäure (PCA) geschüttelt und nach dem Schütteln die Gefäßwand nochmals mit 1 ml PCA abgespült. Nach 5 Minuten im Ultraschallbad unter Eiskühlung wurde 10 Minuten bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Überstand wurde aufgehoben, während das Pellet in 2 ml eiskalter 0,9% NaCl resuspendiert und wieder wie zuvor mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert wurde. Die beiden Überstände wurden vereinigt und mit eiskalter 8 M KOH neutralisiert, wobei Kaliumperchlorat ausfällt. Nach Zentrifugieren (10 Minuten, 4°C, 1500 g) wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Das Pellet wurde für die Extraktion der wasserunlöslichen Bestandteile verwendet. Das Lyophilisat konnte bei -20°C gelagert werden. Das Pellet mit den wasserunlöslichen Substanzen wurde in 5 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert und im Wechsel eisgekühlt

ins Ultraschallbad gegeben und mit KOH der pH-Wert neutralisiert. Die Mischung wurde dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert.

5.5.3 Perchlorsäure Extraktion von Zellen

Für die NMR-Untersuchungen von Zellextrakten wurden die Zellen von je 6 konfluent gewachsene 92mm Kulturschalen verwendet. Das Inkubationsmedium der Zellen wurde gesammelt und lyophilisiert. Die Zellen wurden in der Schale zweimal mit eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zweimal mit je 2 ml eiskalter 12%iger Perchlorsäure extrahiert. Die Zellextrakte wurden anschließend mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 1500 g). Die gesammelten Überstände mit den wasserlöslichen Bestandteilen wurden verschieden konzentrierten KOH-Lösungen neutralisiert und das ausfallende $KClO_4$ anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 1500 g). Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die während der Extraktion verbleibenden wasserunlöslichen Rückstände wurden in 3 ml destilliertem Wasser resuspendiert und mit KOH neutralisiert. Diese Suspension wurde entweder lyophilisiert, um damit NMR-Untersuchungen der Lipidkomponenten vorzunehmen, oder zur späteren Proteinbestimmung eingefroren.

5.6 Biochemische Analysen

5.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinmengen wurden photometrisch nach Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde eine für 96er-Multiwellplatten angepasste Methode verwendet. Zellpellets oder Gewebe wurde mit einer SDS-Lösung aufgelöst, so dass eine Endkonzentration von maximal 0,125% SDS vorlag. Zur Messung wurden 200 µl einer (1:5) mit bidestilliertem Wasser verdünnten Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung (Fluka Biochemica) mit 5 µl der Probe versetzt. Nach einer Minute wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Als Standard diente eine entsprechend verdünnte und einmal pro Monat frisch angesetzte 5 mg/ml BSA-Lösung.

5.6.2 Cytotoxizitätstest mit MTT

In diesem Viabilitätstest wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen bestimmt. Es wurde eine für 24er-Multiwellplatten angepasste Variante von Berridge et al. (1996) angewendet. Unter NADH-Verbrauch wird das lösliche, gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) intrazellulär zu einem blauen, unlöslichen Formazan reduziert (Abb. **5.2**). Nach der Inkubation mit der zu testenden Substanz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 0,02% MTT in Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums wurde das gebildete Formazan über Nacht in Isopropanol/5% Essigsäure aus den Zellen gelöst. Um ein Verdunsten des leicht flüchtigen Isopropanols zu verhindern wurden die Multiwellplatten mit Deckel fest in Folie eingewickelt. Am folgenden Tag wurde die Absorption bei 570 nm gemessen.

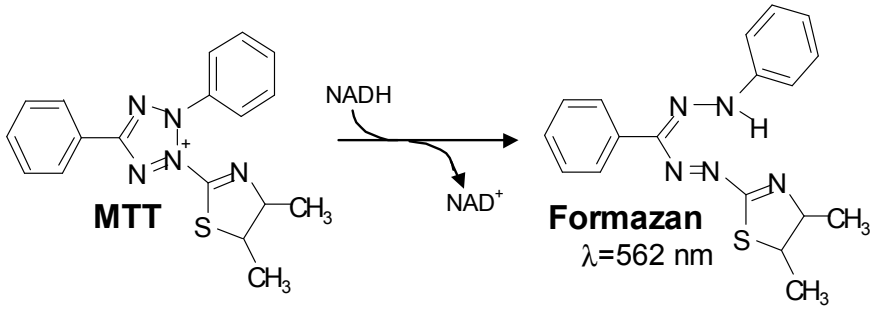


Abbildung 5.2: Reduktion von MTT zu Formazan

MTT wird intrazellulär durch Dehydrogenasen zu unslöslichem Formazan umgesetzt.

5.6.3 Enzymatische Analysen

Zur Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Malatdehydrogenase (MDH) wurden an 96er-Multiwellplatten angepasste Assays nach Bergmeyer und Bergmeyer (1983) verwendet.

5.6.3.1 Laktatdehydrogenase (LDH)

Behandelte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml 0,5% Triton-X-100 Lösung je 92mm-Schale für 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die abgelösten

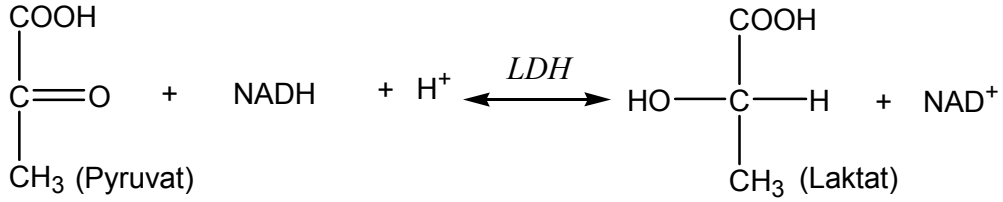


Abbildung 5.3: LDH-katalysierte Reaktion

Pyruvat wird unter NADH-Verbrauch zur Laktat reduziert. Die Abnahme an NADH lässt sich photometrisch bei 340 nm verfolgen.

Zellen wurden in 1,5ml-Eppendorfcups überführt, kräftig geschüttelt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei 10000g konnte der Überstand direkt im Assay verwendet werden. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,133 mM NADH und 0,666 nM Natriumpyruvat in 300 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4. Davon waren 20 µl Probe und die Reaktion wurde durch Zugabe des Natriumpyruvats gestartet. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm durch NADH war ein Maß für die Aktivität der Laktatdehydrogenase (Abb. **5.3**). Zur Bestimmung von LDH in homogenisierten Gewebe wurden 20 µl Saccharosepufferextrakt verwendet.

5.6.3.2 Malatdehydrogenase (MDH)

Die Aktivität von MDH wurde gemäß der Reaktion in Abbildung **5.4** bestimmt. Saccharosepufferextrakt von Gewebe wurde direkt benutzt. Im well wurden als Reaktionslösung 200µl 3,6 mM NAD^+-Lösung und 25µl Probe vorgelegt. Als Puffer wurde eine 0,1 M Diethanolamin-Lösung mit 5 mM $MgCl_2$ verwendet, deren pH-Wert auf 9,2 eingestellt war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25µl 250mM L-Malat-Lösung gestartet und die Zunahme an NADH wurde photometrisch bei 340 nm aufgezeichnet.

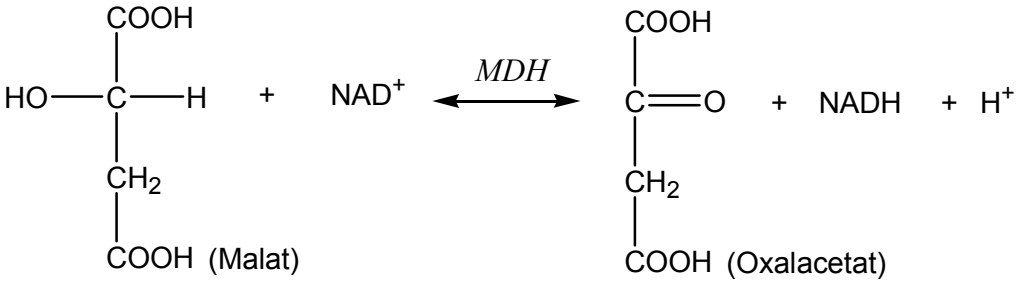


Abbildung 5.4: MDH-katalysierte Reaktion

Malat wird oxidiert, wobei NAD^+ zur NADH reduziert wird.

5.6.4 Zellmetabolismus

5.6.4.1 Enzymatische Methode zur Bestimmung der Glutathionkonzentration

Zur Bestimmung des Glutathiongehaltes von Zellen und Geweben wurde ein auf der Methode von Tietze (Tietze 1969) basierendes, modifiziertes Verfahren benutzt. Dieses verwendet Ellmans Reagenz DTNB (5,5´-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)), welches durch Glutathion zu einem Produkt umgesetzt wird, das photometrisch bei 412 nm nachgewiesen werden kann. Unter Verwendung des Enzyms Glutathionreduktase, welches das Disulfid GSSG wieder zu zwei Glutathion-Molekülen reduziert erhält man einen zyklischen Reaktionsablauf (Abb. **5.5**) und der Anstieg in der Absorption ist ein Maß für die Glutathionkonzentration. Um GSSG alleine messen zu können muss zuvor Glutathion durch Umsetzung mit 2-Vinyl-Pyridin (2VP) entfernt werden. Saccharosepuffer-Extrakte oder Zellen wurden im Verhältnis 1:3 (vol/vol) mit 6% Sulfosalicylsäure versetzt und für fünf Minuten unter Eiskühlung Ultraschall ausgesetzt. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Die Cycling-Reaktion wurde in 96er-Multiwellplatten durchgeführt. Dazu wurden fünf Mikroliter des Überstandes zusammen mit 20 µl 6 mM DTNB, 35 µl H_2O und 130 µl 6,3 mM EDTA in 0,2 M Phosphatpuffer in ein well gegeben. Die Menge des Puffers war so gewählt, dass der pH-Wert konstant etwa bei 7,5 lag, da die Absorption des TNB abhängig vom pH-Wert war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Glutathionreduktase zu einer Endkonzentration von 2 U/ml gestartet. Der Absorptionsverlauf wurde über fünf Minuten aufgezeichnet.

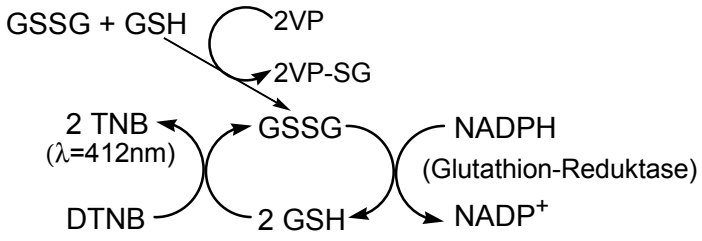


Abbildung 5.5: Reaktionsschema Glutathionmessung

Glutathion reagiert mit DTNB zu TNB und wird durch das Enzym Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch recycelt. Zur GSSG-Messung wird Glutathion mit 2-Vinyl-Pyridin umgesetzt.

5.6.4.2 NADH/NAD^+

Bei dieser fluorimetrischen Methode zur Bestimmung der NADH- beziehungsweise NAD^+-Konzentration wird ebenso wie bei der Methode zur Glutathionmessung ein enzymatisch katalysiertes „cycling-System“ benutzt, um eine größere Menge der zu analysierenden Substanz zu bekommen (Bergmeyer und Bergmeyer 1983). Gemäß Abbildung **5.6** wird zunächst mittels der angegebenen Reaktionen in einem sich wiederholenden Zyklus Pyruvat angesammelt. Die zu untersuchende Probe kann NAD^+ oder NADH enthalten und die Probenaufbereitung erfolgte unterschiedlich je nachdem welches Molekül von beiden bestimmt werden sollte. In beiden Fällen wurden 50 mg Gewebe unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser mit einem Pistill fein verrieben. Zur NAD^+-Bestimmung wurden die Proben sauer aufgearbeitet, da unter diesen Bedingungen die oxidierte Form NADH zerfällt. Das gepulverte Gewebe wurde bei 0°C mit 5 ml 20 mM H_2SO_4/0,1 M Na_2SO_4 homogenisiert und für 45 Minuten in ein 60°C heißes Wasserbad gestellt. Proben für

Cycling-System:

(1) NAD^+ + Laktat $\xleftrightarrow{\text{(LDH)}}$ Pyruvat + NADH + H^+

$\uparrow$ $\downarrow$

(2) NAD^+ + Glutamat $\xleftrightarrow{\text{(GIDH)}}$ α-Ketoglutarat + NADH + H^+ + NH_3

Produktbestimmung:

(3) Pyruvat + NADH + H^+ $\xleftrightarrow{\text{(LDH)}}$ Laktat + NAD^+

Abbildung 5.6: NAD^+/NADH – Reaktionsschema

die Messung von NADH wurden mit denselben Mengenverhältnissen mit 40 mM NaOH/0,5 mM Cystein homogenisiert und für 10 Minuten bei 60°C behandelt. Beide Arten von Proben wurden vor Zugabe zur Reaktionslösung stark verdünnt (NADH 1:10000; NAD^+ 1:30000). Die Konzentrationen in der Reaktionslösung (verwendete Lösungen siehe Anhang *7.2*) waren wie folgt: 167 mM Tris; 83 mM Laktat; 4 mM α-Ketoglutarat; 0,25 mM Adenosin-5´-diphosphat; 42 mM NH_4^+; 42 µg/ml LDH = 15 U/ml; 165 µg Glutamatdehydrogenase/ml = 15 U/ml. Die Nicotinamiddinulceotid-Konzentration in der Probe sollte 1 – 30 nM betragen. Die Reaktion erfolgte über 60 Minuten bei 25°C. Daran schlossen sich 2 Minuten bei 100°C an. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Pyruvat-Reagenz zu 36 mM Imidazol, 0,023-0,23 mM NADH und 0,07 µg/ml LDH = 25 mU/ml hinzu gegeben. Nach weiteren 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Salzsäurelösung zu 0,5 N gestoppt. Nach Zugabe von NaOH zu 4,8 N und weiteren 10 Minuten bei 60°C konnte die Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen.

5.6.5 Oxidativer Stress

5.6.5.1 DCF-Messungen in Zellkultur

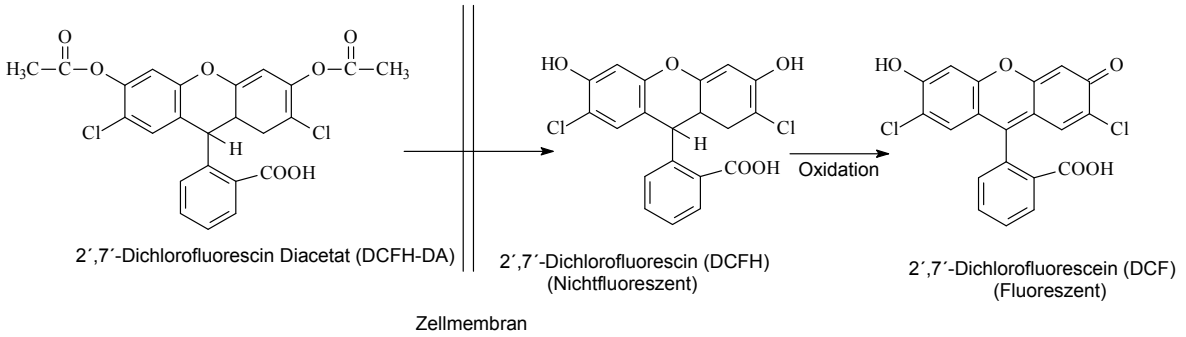


Abbildung 5.7: Aufnahme und Umwandlung von DCFH-DA in Zellen

Oxidativer Stress, der in Zellen oder Gewebe herrscht, kann mit der Fluoreszenzsonde Dichlorofluorescein (DCF) gemessen werden. Dieses ist in seiner reduzierten Form DCFH nicht fluoreszent (Abb. **5.7**). Um die Verbindung in die Zellen zu schleusen wird die acetylierte Form (2´,7´-Dichlorofluorescin-Diacetat, DCFH-DA) verwendet. Im Zellinneren wird DCFH-DA durch Esterasen in die nicht mehr membrangängige Form DCFH umgewandelt, welche durch Oxidation in die fluoreszierende Verbindung DCF umgeformt

wird. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für den oxidativen Stress, der in einer Zelle herrscht (Bass et al. 1983). In 92mm – Schalen konfluent gewachsene Zellen wurden nach der jeweiligen Inkubation einmal mit PBS gespült und dann trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden mit 5 ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Messpuffer resuspendiert und 5 µl einer 20 mM DCFH-DA-Lösung in Ethanol wurden hinzu gegeben. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 1 ml frischem Messpuffer suspendiert. Jeweils ein Aliquot dieser Zelllösung wurde zur Proteinbestimmung benutzt oder zum Aufzeichnen des Fluoreszenzverlaufs (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 525 nm) für drei Minuten.

5.6.5.2 DCF-Messungen in Gehirnschnitten

Die Gehirnschnitte wurden gemäß 4.3 präpariert. Um oxidativen Stress mit DCFH in Gehirnschnitten zu messen, wurden diese in der letzten Stunde der jeweiligen Inkubation mit DCFH-DA beladen. Die Gehirnschnitte wurden dazu in 20 ml frischen EBSS-Puffer überführt und zusätzlich zur Inkubation wurde DCFH-DA zu 50 µM hinzu gegeben. Das Gefäß in dem inkubiert wurde, wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und weiterhin unter Sauerstoffzufuhr bei 37°C gehalten. Eine Perfusion fand während dieser Zeit nicht mehr statt. Nach Ablauf von einer Stunde wurden je drei Schnitte in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Messpuffer überführt und dabei gewogen. Die Schnitte wurden dann mit Pasteurpipetten homogenisiert und 5 Minuten lang bei 800g zentrifugiert. Das Gewebepellet wurde in 1 ml Messpuffer resuspendiert und in einer 1:10 Verdünnung direkt zur Fluoreszenzmessung benutzt. Der Anstieg in der Fluoreszenzentwicklung (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 525 nm) bezogen auf das Nassgewicht ergibt einen Maßstab für den oxidativen Stress im Gewebe.

5.6.5.3 Lipidperoxidation

Lipidperoxide als Maßstab für oxidativen Stress in Gewebe wurden mit einer modifizierten Methode nach Ohkawa et al. (1979) bestimmt. Abbildung **5.8** zeigt die relevanten Strukturen. Gewebe wurde im Verhältnis 1:10 (Gewicht/Volumen) mit eisgekühlter 150 mM KCl im Potterhomogenisator bei 800 rpm 30 mal homogenisiert. Je 1000 µl Volumen

wurden 12,5 µl zweiprozentiger BHT-Lösung zur Verhinderung weiterer Oxidationen während der Aufarbeitung hinzu gegeben. Folgende Lösungen wurden in 10ml-Zentrifugenröhrchen vermischt : 100 µl 8,1% SDS; 10 µl 200 mM EGTA; 50 µl 2% BHT; 750 µl 20% Essigsäure; 750 µl 55,5 mM Thiobarbitursäure und 340 µl der homogenisierten Probe. Der optimale pH-Wert für die Reaktion der Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd beträgt 3,5. Die Reaktionsbedingungen von 95°C wurden für 60 Minuten aufrecht erhalten. Nach anschließender Eiskühlung wurden zur Extraktion des Reaktionsproduktes zwei ml einer (15:1) Butanol/Pyridin-Mischung hinzu gegeben und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Die überstehende organische Phase wurde zu Fluoreszenzmessung verwendet. Gemessen wurde mit einer Anregungswellenlänge von 515 nm bei einer Emissionswellenlänge von 550 nm. Als Standard wurde mit Wasser verdünntes 1,1,3,3-Tetraethoxypropan verwendet.

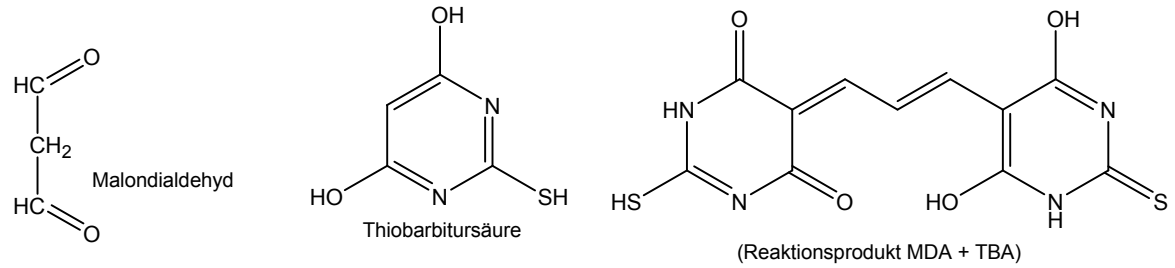


Abbildung 5.8: MDA, TBA, Reaktionsprodukt MDA+TBA

5.6.6 Western Blot

Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich bei Cummins et al. (2002), im Folgenden ist die Vorgehensweise kurz zusammengefasst.

Das Gewebe wurde zuerst zerkleinert, homogenisiert (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 20% Glycerin) und nach Ultraschallbehandlung bei -80°C aufbewahrt. Insgesamt 50 µg Protein wurde 1:3 mit Laemmli-Puffer verdünnt und in einem 4-20% Gradientengel (Bio-Rad) elektrophoresiert. Nach Transferieren auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran über Nacht bei 4°C wurde der Blot mit 5% fettfreier Milch geblockt. Im Anschluss wurde mit dem ersten Antikörper (C219; Signet, Dedham,

MA, USA) 1:100 in 1% Milch für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit T-TBS (0,05% Tween-20 in *Tris Buffered Saline*) wurde mit dem zweiten Antikörper („*HRP-conjugated goat anti-mouse*“) 1:10000 in 0,5% Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen für je 20 Minuten mit T-TBS wurden die Signale mittels ECL-Detektion (Amersham, Piscataway, NJ, USA) aufgezeichnet. Die Quantifizierung wurde mit der Software „Scion Image“ (www.scioncorp.com) vorgenommen.

5.7 DNA-Leiter als Apoptosenachweis

5.7.1 Isolierung von DNA aus Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert, mit PBS gewaschen, einem Zellschaber abgelöst und in 1 ml PBS aufgenommen. Diese Zelllösung wurde 5 Minuten bei 500g zentrifugiert und das Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Zellpellet war auf längere Zeit bei -20°C lagerfähig. Alle weiterführenden Schritte der Isolierung wurden in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit jeweils autoklavierten Lösungen durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit DNasen zu vermeiden. Die Proben wurden zunächst mit 500 µl Lysepuffer und zur Hydrolyse der RNA mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) für 40 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Proteinfällung wurden 125 µl 5 M NaCl zugeben, es wurde leicht geschüttelt und die Proben wurden 60 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Nun wurde 15 Minuten bei 13500 g zentrifugiert (4°C), die wässrige Phase abgenommen und zur weiteren Abtrennung von Proteinen mit 250 µl Chloroform und 500 µl äquilibriertem Phenol (Rotiphenol® für DNA/RNA-Isolierung) 2 Minuten lang ausgeschüttelt. Nach erneutem Zentrifugieren (15 Minuten, 4°C, 13500 g) wurden zum Überstand 650 µl Chloroform gegeben und es wurde erneut 2 Minuten lang kräftig geschüttelt. Wiederum wurde zentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 13500 g). Der Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen und 1 ml auf -20°C vorgekühltes Isopropanol wurde hinzu gegeben um die DNA auszufällen. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde zentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 13500 g) und die komplette überstehende Lösung vorsichtig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet

und dann in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurden die Proben erneut über Nacht stehen gelassen. Der DNA-Gehalt konnte photometrisch bei 260 nm bestimmt werden (Doppelbestimmungen: je 1,5 µl der gelösten DNA in 300 µl TE-Puffer). Die Reinheit der isolierten DNA wurde durch Messung bei 280 nm bestimmt (Verhältnis E_{260}: E_{280}).

5.7.2 Agarose Gelelektrophorese

Im Verlauf der Apoptose schneiden Ca^{2+}/Mg^{2+}-abhängige Endonukleasen die DNA in der Linkerregion, was zu einem charakteristischen Bandenmuster im Agarosegel führt. Das Vorhandensein dieser so genannten DNA-Leiter ist ein Nachweis für einen apoptotischen Zelltod. Die extrahierte und in TE-Puffer gelöste DNA wurde in einer Gelelektrophorese in 1,75%igem Agarosegel aufgetrennt. Jeweils 4 µg DNA wurden mit 1×Ladebuffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Nach anschließendem abkühlen im Eisbad trug man die Proben auf, füllte die Kammer mit TBE-Puffer auf und ließ die Elektrophorese ca. 4 Stunden bei 60 V laufen, bis der Farbstoff Bromphenolblau zu mindestens ¾ des Gels gewandert war. Das Gel wurde 30 Minuten mit Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und zweimal 10 Minuten mit H_2O gewaschen. Im Auswertegerät (Herolab Gelscanapparatur) wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Im Fall eines apoptotischen Zelltodes trat ein charakteristisches Bandenmuster auf, die so genannte DNA-Leiter. Diese besteht aus oligonucleosomalen DNA-Fragmenten, deren Größe jeweils ein Vielfaches von ca. 180 Basenpaaren beträgt. Als Referenz diente der DNA-Mix *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* von MBI Fermentas, bestehend aus 21 diskreten DNA-Fragmenten in der Größe von 100 bis 10000 Basenpaaren.

5.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer Polaroid DMC1 Digitalkamera aufgenommen, die an ein Zeiss Axiovert S100 inverses Fluoreszenzmikroskop angeschlossen war und als Lichtquelle diente eine Quecksilberhochdrucklampe.

5.8.1 Apoptotische Kernfragmentation (Hoechst 33258)

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimid; Abb. **5.9**) ist membranpermeabel und emittiert sobald das Molekül an Doppelstrang-DNA bindet nach Anregung blaues Licht. Der Farbstoff wurde als 10 mM Lösung in bidestilliertem Wasser angesetzt und bei –20°C gelagert. Zur Messung wurden die Zellen nach der durchgeführten Inkubation einmal mit PBS gewaschen und dann für 3 Minuten bei 37°C mit 100 µM Hoechst 33258 in Messpuffer inkubiert. Zur Messung wurde die Lösung vorsichtig entfernt und durch 2 ml Messpuffer ersetzt. Die Analyse im Fluoreszenzmikroskop erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Zellen deren DNA durch apoptotische Mechanismen in Fragmente zerfallen war, wurden deutlich erkannt.

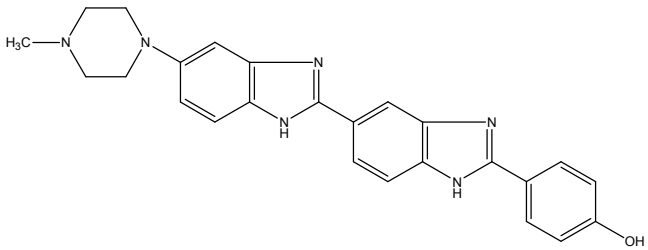


Abbildung 5.9: Struktur von Hoechst 33258 (Bisbenzimid)

5.8.2 Mitochondriales Membranpotential (Rhodamin 123)

Die Verbindung Rhodamin 123 (Abb. **5.10**) trägt eine delokalisierte positive Ladung, ist membranpermeabel und wird aktiv von Mitochondrien aufgenommen und ohne cytotoxische Nebenwirkungen gespeichert. Bricht im Laufe der Apoptose das mitochondriale Membranpotential zusammen, findet keine Farbstoffanreicherung statt, was im Fluoreszenzmikroskop gut beobachtet werden kann. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit PBS gewaschen und dann für 15 Minuten mit 3 µM Rhodamin 123 inkubiert. Als Stammlösung wurde eine 10 mM Lösung von Rhodamin 123 in DMSO angesetzt, die bei

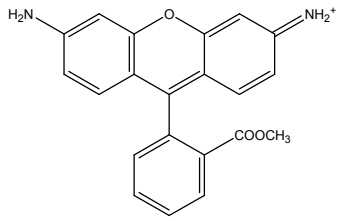


Abbildung 5.10: Struktur von Rhodamin 123

4°C gelagert wurde. Zur Messung wurde diese Lösung 1:10 verdünnt und 6 µl wurden auf 2000 µl Messpuffer gegeben um die Zellen bei 37°C mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu beladen. Danach wurde die Lösung vorsichtig entfernt und durch 2 ml Messpuffer ersetzt. Die Anregungswellenlänge liegt bei etwa 450-490 nm.

5.9 NMR-Spektroskopie

Die lyophilisierten PCA-Extrakte wurden in 450 µl D_2O gelöst und abzentrifugiert (10 Minuten, 20°C, 1500g). Der Überstand wurde in ein 5mm-NMR-Röhrchen überführt und für die NMR-Messung neutralisiert (pH 7,10 – 7,30 mit DCl beziehungsweise NaOD). Nach den ^{1}H- und ^{13}C-Messungen wurden die aufbereiteten Extrakte mit 100 mM EDTA für die ^{31}P-Messung versetzt und der pH wurde auf 7,0 eingestellt.

Die lyophilisierten Lipidextrakte wurden in ein 10ml-Glaszentrifugenröhrchen überführt und in 1,5 ml $CDCl_3/CD_3OD$ (2:1) resuspendiert und abzentrifugiert (10 Minuten, 20°C, 3000 g). Alle eindimensionalen NMR-Spektren von PCA- und Lipidextrakten wurden an einem AMX 360 Spektrometer aufgenommen und mit der Software WINNMR (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) bearbeitet und ausgewertet.

Zur Quantifizierung von Metaboliten im ^{1}H-NMR Spektrum von PCA-Extrakten wurde (Trimethylsilyl)-2,2,3,3,-d_4-propionat (TMSP) als Referenz- und Konzentrationsstandard benutzt. Für alle Experimente wurde ein 5 mm-^{1}HX-QNP-Tripleprobenkopf ($^{13}C/^{31}P/^{19}F$) verwendet.

^{1}H-NMR:

Die ^{1}H-NMR Messungen wurden bei einer Frequenz von 360 MHz vorgenommen. Die chemische Verschiebungsskala wurde auf das Signal für TMSP bei 0 ppm für PCA-Extrakte und auf TMS bei 0 ppm für Lipidextrakte bezogen. Folgende Aufnahme- und Prozessierungsparameter wurden verwendet:

	PCA	Lipide	Medien
Pulszahl	64	64	128
Pulswinkel	90°	90°	90°
Repititionszeit	12 sec	12 sec	12 sec
Spektrale Breite	12 ppm	12 ppm	12 ppm
Zahl der Stützstellen (zero filling auf 32 K)	16 K	16 K	16 K

^{13}C-NMR:

^{13}C-NMR Messungen wurden bei 90,5 MHz durchgeführt. Wasserstoffentkopplung wurde über eine *composite pulse decoupling* (CPD) Sequenz (Waltz 16) vorgenommen. Die chemische Verschiebungsskala wurde für PCA-Extrakte auf das Signal von β-Glukose-C1 bei 96,8 ppm geeicht. Aufnahme- und Prozessierungsparameter:

	PCA	Medien
Pulszahl	20000	600
Pulswinkel	27°	27°
Repititionszeit	2,0 sec	2,0 sec
Spektrale Breite	200 ppm	200 ppm
Zahl der Stützstellen (zero filling auf 32 K)	16 K	16 K

^{31}P-NMR:

Die Messfrequenz für ^{31}P-NMR betrug 145,7 MHz. Die Wasserstoffentkopplung wurde hierbei auch über eine *composite pulse decoupling* (CPD) Sequenz (Waltz 16) vorgenommen. Der Bezug für die chemische Verschiebungsskala erfolgte für die PCA-Extrakte auf das Signal von Phosphokreatin bei -2,33 ppm und/oder α-NTP bei –9,9 ppm. Folgende Parameter fanden Anwendung:

	PCA
Pulszahl	5000
Pulswinkel	80°
Repititionszeit	3,5 sec
Spektrale Breite	35 ppm
Zahl der Stützstellen	8 K

(zero filling auf 16 K für PCA und 8 K für Lipide)

5.10 HPLC/HPLC-MS

Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist nachzulesen in Christians et al. (2000), im Folgenden sei die Vorgehensweise kurz zusammengefasst.

Es wurde eine HPLC-MS (HPLC: *high performance liquid chromatography*; MS: *mass spectrometry*) mit automatischer Probenextraktion benutzt (HPLC/HPLC-MS, Serie 1100 HPLC mit selektivem Massendetektor, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Das Gewebe (etwa 1,2 g Nassgewicht) wurde mit zwei ml 1 M KH_2PO_4 (pH 7,4) homogenisiert und zur Proteinfällung wurden zu je 100 µL Probe 200 µL Methanol/ 1 M $ZnSO_4$ (80/20) dazu gegeben. Ciclosporin D (250 µg/L) und 28,40-O-diacetyl-Rapamycin (100 µg/L) wurden als interne Standards hinzugefügt und 100 µL des Überstandes wurden dann in die Extraktionssäule injiziert. Die Proben wurden mit einer mobilen Phase aus Methanol/ 0,1% Ameisensäure (60/40) und Zusatz von 1 µmol/L Natriumformiat ausgewaschen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 5 ml/min und die Temperatur der Extraktionssäule war auf 65°C eingestellt. Nach 45 Sekunden wurde die Säule umgeschaltet und die zu analysierenden Substanzen wurden auf die Analysesäule gespült (Flussgeschwindigkeit 0,5 ml/min). Dabei bestand die mobile Phase aus Methanol/ 0,1% Ameisensäure (90/10) und Zusatz von 1 µmol/L Natriumformiat. Das Massenspektrometer lief im „selected ion mode“ und positive Ionen $[M+Na]^+$ wurden aufgezeichnet. Die analytische Rückgewinnung betrug jedesmal mehr als 90%. Die Methode war linear von 1 µg/L (unteres Detektionslimit) bis 500 µg/L Ciclosporin und von 0,25 µg/L bis 100 µg/L für die Makrolide.

5.11 Material

5.11.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertreiber
1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Coomassie Proteintest Reagenz	Fluka Biochemica
DCFH-DA (2´,7´-Dichlorofluorescin-Diacetat)	Molecular Probes (Leiden)
Deuterierte Lösungsmittel	Merck (Darmstadt)
Dibutylhydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DTNB (5,5´-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure))	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM high Glu)	Gibco (Eggenstein)
Earle's Balanced Salts (EBSS)	Gibco (Eggenstein)
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethylenglycol-bis-(β-aminoehtylether) (EGTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin)
GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
Glutamatdehydrogenase (GIDH)	Boehringer (Mannheim)
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glutathiondisulfid (GSSG)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HEPES (N-2-hydroyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Laktatdehydrogenase (LDH)	Boehringer (Mannheim)
Malatdehydrogenase (MDH)	Boehringer (Mannheim)
Markierte Glukose	Cambridge Isotope Laboratories (Wesel)
MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Nicotinamidadenindinucleotid, oxidiert (NAD^+)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert (NADH)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin	Gibco (Eggenstein)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rotiphenol® (äquilibriert, pH 7,5-8,0)	Carl Roth (Karlsruhe)
Streptomycin	Gibco (Eggenstein)
Thiobarbitursäure (TBA)	Merck (Darmstadt)
Thomaepor - Siebgewebe aus Nylon 11/80 µM	Reichelt Chemietechnik (Wiesbaden)
Trimethylsilyl-2,2,3,3-d_4-propionat (TSP)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien besaßen analysenreine Qualität und wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Alle für die Zellkultur und zur Aufarbeitung von Zellen oder Gewebe benötigten Materialien stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden) und Braun (Melsungen).

5.11.2 Verwendete Lösungen

Lösungen zur Verwendung in der Zellkultur wurden sofern nicht anders angegeben zum Sterilisieren 20 Minuten bei 122°C autoklaviert. Das Ansetzen von wässrigen Lösungen erfolgte mit bidestilliertem Wasser.

0,1 M Carbonatpuffer: In 100 ml Wasser lösen

0,85 g Na_2CO_3
0,17 g $NaHCO_3$

DNA-Isolierung und Gelelektrophorese – Verwendete Puffer:

Lysepuffer: Folgende Lösungen mit Wasser auf 50 ml auffüllen
0,5 ml: 121,11 g Tris-HCl (1 M) in 1 l H_2O lösen und pH auf 8,0 einstellen
1,5 ml: 20 g SDS (20% w/v) in 80 ml H_2O unter Erwärmen lösen
1 ml: 37,224 mg EDTA (0,5 M) in 100 ml H_2O lösen

TE-Puffer: In 100 ml Wasser lösen und pH auf 8,0 einstellen
121,1 mg Tris-HCl (10 mM)
37,224 mg EDTA (1 mM)

TBE-Puffer: Folgende Lösungen mit Wasser auf 500 ml auffüllen, pH auf 8,0 einstellen
70 g Tris-HCl (0,9 M)
27,5 g Borsäure (0,9 M)
20 ml: 37,224 mg EDTA (0,5 M) in 100 ml H_2O lösen

Ladepuffer: Folgende Lösungen/Stoffe vermischen und mit Wasser auf 5 ml auffüllen
0,15 ml: 37,224 mg EDTA (0,5 M) in 100 ml bidest. H_2O lösen
0,5 ml: 20%ige SDS-Lösung in bidest. H_2O
2,5 ml: Glycerin
0,0625 ml: 20%ige Bromphenolblau-Lösung

HEPES-Puffer: In 1000 ml Wasser lösen

29,788 g HEPES (0,125 M)
1,864 g KCl (0,025 M)
35,069 g NaCl (0,6 M)

Medium DMEM

Zwei Ansätze DMEM High Glukose von Gibco in 1,5 l H_2O für 30 Minuten rühren. 7,4 g $NaHCO_3$ (entsprechend 3,7 g/L) hinzugeben, pH-Wert auf 7,0 einstellen, auf 2,0 l mit Wasser auffüllen und steril filtrieren (0,2 µ Sterilfilter) in autoklavierte 500 ml Flaschen. Bei 4°C lagern. Unmittelbar vor Gebrauch Penicillin (Endkonzentration 100 units/ml), Streptomycin (Endkonzentration 100 µg/ml) und fötales Kälberserum nach Bedarf dazugeben.

Messpuffer: In 50 ml Endvolumen Wasser lösen, pH-Wert auf 7,35 einstellen

10 mg $MgCl_2*6H_2O$
7 mg $NaH_2PO_4*H_2O$

50 mg Glukose
10 ml HEPES-Puffer
650 µl $CaCl_2$-Lösung (100 mM)

NADH/NAD^+ – Assay: Reaktionslösungen

„cycling-Reagenz“: Die folgenden Volumina der angegebenen Lösungen vermischen und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Die Mischung ist bei -20°C ca. 2 Wochen und bei -80°C ca. 2 Monate haltbar.
20 ml: 12,1 g Tris-HCl (1 M, pH 8,4) + 5,8 ml 12 N HCl ad 100 ml H_2O
0,5 ml: 1,46 g α-Ketoglutarat (1 M) in 10 ml H_2O
10 ml: 1,25 g Laktat (~1 M) in 7,5 ml H_2O suspendieren. 2,75 ml 2 M Na_2CO_3-Lösung (21,2 g Na_2CO_3 in 100 ml H_2O) zufügen und kräftig schütteln, danach filtrieren. Filtrat mit ca. 0,25 ml 5 N HCl auf pH=7,0 einstellen.
0,3 ml: 54 mg Adenosin-5´-diphosphat (0,1 M) in 1 ml H_2O
1 ml: 38,5 g Ammoniumacetat (5 M) in 100 ml H_2O
Unmittelbar vor Gebrauch das Folgende bei 0°C zusammengeben:
5 ml: Obige Reaktionslösung
0,012 ml: Laktatdehydrogenase (20 mg Protein/ml)
0,1 ml: Glutamatdehydrogenase (10 mg Protein/ml)
0,1 ml: Bidestilliertes Wasser

Pyruvatreagenz: Die folgenden Lösungen vermischen
8 ml: 6,8 mg Imidazol (1 M) mit H_2O und 6,7 ml 12 N HCl ad 100 ml lösen
1 ml: Laktatdehydrogenase (20 mg Protein/ml)
1 ml: 3,5 mg NADH (5 mM) in 1 ml 0,1 M Carbonatpuffer lösen. Vor Gebrauch zur Zerstörung von NAD^+ 15 Minuten auf 60°C erhitzen.

PBS-Puffer: In 1000 ml Endvolumen Wasser lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen

9 g NaCl
0,726 g $Na_2HPO_4*7H_2O$
0,21 g KH_2PO_4

Phosphatpuffer (0,2 M): 54 ml Lösung A mit 947 ml Lösung B vermischen (pH 8,0)

A : 2,76 g $NaH_2PO_4*H_2O$ in 100 ml H_2O lösen.
B : 35,61 g $Na_2HPO_4*2H_2O$ in 1000 ml H_2O lösen.

Saccharosepuffer: In 50 ml Endvolumen Wasser lösen, pH-Wert auf 7,4 einstellen

4,28 g Saccharose
60,55 mg Tris-HCl (10 mmol)
9,31 mg EDTA

1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP)

TEP-Dichte : 0,92 g/ml
Eine Verdünnung von 1:10 mit Wasser ergibt eine 417,6 µM Lösung.

5.11.3 Geräte

Gerät	Typ/Hersteller/Vertreiber
Brutschrank	Heraeus BB 6220
Fluoreszenzmikroskop + Digitalkamera + Fluoreszenzlichtquelle	Zeiss Axiovert S100 Polaroid DMC 1 HBO 100
Fluoreszenzspektrophotometer	Perkin Elmer LS50B mit Plattenlesegerät
Gelscanapparatur	Herolab
Gewebehomogenisator	POTTER S (B.Braun)
Haemocytometer nach Neubauer	Brand
Mikroskope	Olympus CK2 Olympus IX50
Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories TC72
Thermomixer	Eppendorf 5436
UV/VIS-Plattenleser	Labsystems Multiskan RS
UV/VIS-Spektrometer	CECIL CE1021
Zentrifugen	Hettich Universal 16A & 16R Sigma 3K20

Alle für die Zellkultur und zur Aufarbeitung von Zellen oder Gewebe benötigten Materialien stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden) und Braun (Melsungen).

6. Literatur

Andrés, D., Sanz, S., Zaragoza, A., Alvarez, A.M., Cascales, M (2000) Changes in Antioxidant Defence Systems induced by Cyclosporine A in Cultures of Hepatocytes from 2- and 12-Month-Old Rats. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 1091-1100

Ashe, P.C., Berry, M.D. (2003) Apoptotic signalling cascades. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **27**, 199-214

Bass, D. A., Parce, W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., Thomas, M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : A graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology* **130-4**, 1910-1917

Beal, M. F. (1996) Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 661-666

Beal, M. F. (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 211-223

Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. (1968) Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science* **161**, 370-371

Berden, J.H.M., Hotisma, A.J., Merx, J.L., Keyser, A. (1985) Severe central-nervous-system toxicity associated with cyclosporin. *Lancet* **312**, 219-220

Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. (1983) Methods of Enzymatic Analysis. VCH, Weinheim

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* **4**, 14-19

Booher, J., Sensenbrenner, M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology.* **2**, 97

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utlizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248

Brattström, C., Wilczek, H., Tyden, G., Bottinger, Y., Säwe, J., Groth, C.G. (1998) Hyperlipidemia in renal transplant recipients treated with sirolimus (rapamycin). *Transplantation* **65**, 1272-1274

Brazelton, T.R., Morris, R.E. (1996) Molecular mechanism of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate motetil and leftunomide. *Curr. Opinion. Immunol.* **8**, 710-720

Christians, U., Jacobsen, W., Serkova, N., Benet, L.Z., Vidal, C., Sewing, K.F., Manns, M.P., Kirchner, G.I. (2000) Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J. Chromatogr.* **748**, 41-53

Christians, U., Gottschalk, S., Miljus, J., Hainz, C., Benet, L.Z., Leibfritz, D., Serkova, N. (2003) Time-dependent metabolic effects and free radical formation by cyclosporine in rat brain slices: combination with m-TOR inhibitors. (im Druck: *Br. J. Pharmacol*)

Cummins, C.L., Wu, C.Y., Benet, L.Z. (2002) Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72(5)**, 474-489

Cummins, C.L., Jacobsen. W., Christians, U., Benet, L.Z. (2003) CYP3A4-Transfected Caco-2 Cells as a Tool for Understanding Biochemical Absorption Barriers: Studies with Sirolimus and Midazolam. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Oct 20 [Epub ahead of print]

Curtis, J., Nashan, B., Kovarik, J.M., Ponticelli, C., Mourad, G., Figueiredo, J., Attinger, M., Boger, R., Rordort, C. (2001) RAD (everolimus) pharmacokinetics are unaltered with full-dose versus reduced-dose cyclosporine. *Am. J. Transplant.* **1**, 651

Deininger, M.W.N., Goldman, J.M., Lydon, N., Melo, J.V. (1997) The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. *Blood* **90**, 3691-3698

Demeule, M., Labelle, M., Regina, A., Berthelet, F., Beliveau, R. (2001) Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281(3)**, 827-834

DiJoseph, J.F., Sharma, R.N., Chang, J.Y. (1992) The effect of rapamycin on kidney funtion in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* **53**, 507-513

Di Lisa, F., Canton, M., Menabo, R., Dodoni, G., Bernardi, P. (2003) Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res. Cardiol.* **98(4)**, 235-241

Dumont, F.J. (2001) Everolimus. Novartis. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2(9)**, 1220-1234

Ellmann, G. L. (1959) Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77

Esposito, C., Fornoni, A., Cornacchia, F., Bellotti, N., Fasoli, G., Foschi, A., Mazzucchelli, I., Mazzullo, T., Semeraro, L., Dal Canton, A. (2000) Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int.* **58(1)**, 123

Fournier, N., Ducet, G., Crevat, A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19(3)**, 297-303

Gitjenbeek, J.M., van den Bent, M.J., Vecht, C.J. (1999) Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J. Neurol.* **246(5)**, 339-346

Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Serkova, N. (2003) Metabolic signature of tyrosine kinase inhibitor imatinib treatment in human leukemia cells. (eingereicht: *Clin. Cancer Res.*)

Gottschalk, S., Miljus, J., Hainz, C., Leibfritz, D., Serkova, N. (2004) Oxidative stress and cell metabolism alterations by immunosuppressants in rat brain models. (in Bearbeitung: *Free Radic. Biol. med.*)

Grub, S., Persohn, E., Trommer, W.E., Wolf, A. (2000) Mechanisms of Cyclosporine A-Induced Apoptosis in RAT Hepatocytes Primary Cultures

Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., Kerr, P.M. (1997) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol. Cell Biochem.* **174(1-2)**, 167-172

Haberland, A., Henke, W., Grune, T., Siems, W., Jung, K., Schimke, I. (1997) Differential response of oxygen radical metabolism in rat heart, liver and kidney to cyclosporine A treatment. *Inflamm. res.* **46**, 452-454

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119(2)**, 203-210

Hauben, M. (1996) Cyclosporine neurotoxicity. *Pharmacotherapy* **16(4)**, 576-583

Hebert, M.F. (1997) Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **27(2-3)**, 201-214

Hehlmann, R., Hochhaus, A., Berger, U., Reiter, A. (2000) Current trends in the management of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Hematol.* **79**, 345-354

Henke, W., Nickel, E., Jung, K. (1992) Cyclosporine A inhibits ATP net uptake of rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1021-1024

Hertz, L., Juurlink, B.H.J., Hertz, E., Fosmark, H., Schousboe, A. (1989) Preaparation of primary Cultures of Mouse (Rat) Astrocytes. In: *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System* herausgegeben von Alan R. Liss, Inc., News York, 105-108

Hosoi, H., Dilling, M.B., Shikata, T., Liu, L.N., Shu, L., Ashmun, R.A., Germain, G.S., Abraham, R.T., Houghton, P.J. (1999) Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* **59**, 886-894

Huang, S., Bjornsti, M.A., Houghton, P.J. (2003) Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol. Ther.* **2(3)**, 222-232

IUPAC (1993) IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry. A guide to IUPAC nomenclature of organic components (recommendations 1993). Boston: Blackwell Scientific Publications.

Johnson, E.M. Jr., Deckwerth, T.L.. (1993) Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 31-46

Kahan, B.D. (1989) Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* **321(25)**, 1725-1738

Kahan, B.D. (1997) The synergistic effect of cyclosporine and sirolimus. *Transplantation* **63**, 170

Kahan, B.D. (2000) Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. *Lancet* **356**, 194-202

Kahan, B.D. (2002) The Limitations of Calcineurin and mTOR Inhibitors: New Directions for Immunosuppressive Strategies. *Transplant. Proc.* **34**, 130-133

Kochi, S., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y. (2000) Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus. *Life Sci.* **66(23)**, 2255-2260

Koenen, H.J., Michielsen, E.C., Verstappen, J., Fasse, E., Joosten, I. (2003) Superior T-cell suppression by rapamycin and FK506 over rapamycin and cyclosporine A because of abrogated cytotoxic T-lymphocyte induction, impaired memory responses, and persistent apoptosis. *Transplantation* **75(9)**, 1581-1590

Krauskopf, A., Buetler, T.M., Nguyen, N.S., Mace, K., Ruegg, U.T. (2002) Cyclosporin A-induced free radical generation is not mediated by cytochrome P-450. *Br. J. Pharmacol.* **135(4)**, 977-986

Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. (1998) The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 619-642

Laplante, A., Demeule, M., Murphy, G.F., Beliveau, R. (2002) Interaction of Immunosuppressive Agents Rapamycin and Ist Analogue SDZ-RAD With Endothelial P-GP. *Transplant. Proc.* **34**, 3393-3395

Lee, M., Hyun, D.H., Marshall, K.A., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Jenner, P., Halliwell, B. (2001) Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* **31(12)**, 1550

López-Ongil, S., Hernández, O., Navarro-Antolín, J., Pérez de Lema, G., Rodríguez-Puyol, M., Lamas, S., Rodrígez-Puyol, D. (1998) Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Brit. J. Pharmacol.* **124**, 447-454

Lutz, J., Zou. H., Liu, S., Antus, B., Heemann, U. (2003) Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. *Transplantation* **76(3)**, 508-515

Madsen, K.L., Yanchar, N.L., Sigalet, D.L., Reigel, T., Fedorak, R.N. (1995) FK506 increases permeability in rat intestine by inhibiting mitochondrial function. *Gastroenterology* **109**, 107-114

Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J., Vernadakis, A. (1989) Early and Late Passage C6 Glial Cell Growth : Similarities With Primary Glial Cells in Culture. *Neurochem. Res.* **14-10**, 941-947

Massicot, F., Martin, C.H., Dutertre-Catella, H., Ellouk-Achard, S., Pham-Huy, C., Thevenin, M., Rucay, P., Warnet, J.-M., Claude, J.-R. (1997) Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporin A in a renal epithelial cell line. *Arch. Toxicol.* **71**, 529-531

McDonald, J.W., Goldberg, M.P., Gwag, B.J., Chi, S.I., Choi, D.W. (1996) Cyclosporine induces neuronal apoptosis and selective oligodendrocyte death in cortical cultures. *Ann. Neurol.* **40(5)**, 750-758

Migita, K., Eguchi, K. (2001) FK 506-Meditaed T-Cell Apoptosis Induction. *Transplant. Proc.* **33**, 2292-2293

Miller, D.S., Fricker, G., Drewe, J. (1997) p-Glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282(1)**, 440-444

Miljus, J. (2002) Immunsuppressiva-assoziierter oxidativer Stress und Stoffwechsel-veränderungen in C6-Glioma-Zellen und Gehirnschnitten der Ratte. Forschungsbericht.

Muthukkumar, S., Ramesh, T.M., Bondada, S. (1995) Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation* **60(3)**, 264-270

Napoli, K.L., Wang, M.E., Stepkowski, S.M., Kahan, B.D. (1998) Relative tissue distributions of cyclosporine and sirolimus after concomitant peroral administration to the rat: evidence for pharmacokinetic interactions. *Ther. Drug. Monit.* **20**, 123-133

Nashan, B. (2002) Review of the proliferation inhibitor everolimus. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11(12)**, 1845-1857

Nauta, W.J.H., Feirtag, M. (1990) Neuroanatomie: Eine Einführung. Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg

Navarro-Antolín, J., Hernández-Perera, O., López-Ongil, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., Lamas, S. (1998) CsA and FK506 up-regulate eNOS expression: Role of reactive oxygen species and AP-1. *Kidney Int.* **54(Suppl. 68)**, 20-24

Nepomuceno, R.R., Balatoni, C.E., Natkunam, Y., Snow, A.L., Krams, S.M., Martinez, O.M. (2003) Rapamycin Inhibits the Interleukon 10 Signal Transduction Pathway and the Growth of Epstein Barr Virus B-cell Lymphomas. *Cancer Res.* **63**, 4472-4480

Neuhaus, P., Klupp, J., Langrehr, J.M. (2001) mTOR Inhibitors: An Overview. *Liver* Transpl. 7(6), 473-484

Nguyen, N.S.D., Cottet-Maire, F., Buetler, T.M., Russo, A.L., Krauskopf, A.S., Armstrong, J.M., Vickers, A.E.M., Macé, K., Ruegg, U.T. (1999) Metabolism-Dependent Stimulation of Reactive Oxygen Species and DNA Synthesis by Cyclosporine A in Rat Smooth Muscle *Cells. Free Rad. Biol. Med.* **27**, 1267-1275

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4(7)**, 552-565

Parra, T., de Arriba, G., Conejo, J.R., Cantero, M., Arribas, I., Rodriguez-Puyol, D., Rodriguez-Puyol, M., Carballo, F. (1998) Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: effects of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **66**, 1325-1329

Petersén, A, Castilho, R.F., Hansson, O., Wieloch, T., Brundin, P. (2000) Oxidative stress, mitochondrial permeability trasnition and activation of caspases in caclium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res.* **857**, 20-29

Petronilli, V., Penzo, D., Scorrano, L., Bernardi, P., Di Lisa, F. (2001) The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J. Biol. Chem.* **276(15)**, 12030-12034

Perez de Lema, G., Arrbias-Gómez, I., Ruiz-Ginés, J.A., de Arriba, G., Prieto, A., Rodríguez-Puyol, D., Rodríguez-Puyol, M. (1997) Reactive Oxygen Species Mediate the Effects of Cyclosporine A on Human Cultured Mesangial Cells. *Transplant. Proc.* **29**, 1241

Perez de Lema, G., Arribas, I., Prieto, A., Parra, T., de Arriba, G., Rodriguez-Puyol, D., Rodriguez-Puyol, M. (1998) Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life. Sci.* **62**, 1745

Reed, J.C. (2000) Mechanisms of Apoptosis. *Am. J. Pathol.* **157(5)**, 1415-1430

Robertson, J.D., Orrenius, S. (2002) Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology* **181-182**, 491-496

Roman, I.D., Rodriguez-Henche, N., Fueyo, J.A., Zueco, J.A., Menor, C., Prieto, J.C., Guijarro, L.G. (1998) Cyclosporin A induces apoptosis in rat hepatocytes in culture. *Arch. Toxicol.* **72(9)**, 559-565

Rubin, A.M., Kang, H. (1987) Cerebral blindness and encephalopathy with cyclosporin A toxicity. *Neurology* **37**, 1072-1076

Salducci, M.D., Chauvet-Monges, A.M., Berland, Y., Dussol, B., Elsen, R., Crevat, A. (1992). The restoration of ATP synthesis may explain the protective effect of calcium antagonists against cyclosporine A nephrotoxicity. *Life Sci.* **50(26)**, 2053-2058

Salducci, M.D., Chauvet-Monges, A.M., Tillement, J.P., Albengres, E., Testa, B., Carrupt, P., Crevat, A. (1996) Trimetazidine reverses calcium accumulation and impairment of phosphorylation induced by cyclosporine A in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 417-422

Schreiber, S.L., Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142

Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Haberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H.J., Zenke, G., Zerwes, H.G., Schreier, M.H. (1997) SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* **64(1)**, 36-42

Schuurman, H.-J., Cottens, S., Fuchs, S., Joergensen, J., Meerloo, T., Sedrani, R., Tanner, M., Zenke, G., Schuler, W. (1997) SDZ RAD, a new rapamycin derivative: Synergism with cyclosporine. *Transplantation* **64**, 32-35

Sehgal, S.N. (1998) Rapamune® (RAPA, rapamycin, Sirolimus): Mechanism of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. Cl*in. Biochem.* **31(5)**, 335-340

Sehgal, S.N. (2003) Sirolimus: Its Discovery, Biological Properties, and Mechanism of Action. *Transplant. Proc.* **35(Suppl 3A)**, 7S-14S

Serkova, N., Litt, L., James, T.L., Sadée, W., Leibfritz, D., Benet, L.Z., Christians, U. (1999) Evaluation of individual and combined neurotoxicity of the immunosuppressants cyclosporine and sirolimus by *in vitro* multinuclear NMR spectroscopy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 800-806

Serkova, N., Litt, L., Leibfritz, D., Hausen, B., Morris, R.E., James, T.L., Benet, L.Z., Christians, U. (2000) The novel immunosuppressant SDZ-RAD protects rat brain slices from cyclosporine-induced reduction of high-energy phosphates. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 485-492

Serkova, N., Jacobsen, W., Niemann, C.U., Litt, L., Benet, L.Z., Leibfritz, D., Christians, U. (2001) Sirolimus, but not the structurally related RAD (everolimus), enhances the negative effects of cyclosporine on mitochondrial metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **133(6)**, 875-885

Serkova, N., Donohoe, P., Gottschalk, S., Hainz, C., Niemann, C.U., Bickler, P.E., Litt, L., Benet, L.Z., Leibfritz, D., Christians, U. (2002) Comparison of the Effects of Cyclosporin A on the Metabolism of Perfused Rat Brain Slices During Normoxia and Hypoxia. *J. Cereb. Bloood Flow Metab.* **22**, 342-352

Serkova, N., Klawitter, J., Niemann, C.U. (2003) Organ-specific response to inhibition of mitochondrial metabolism by cyclosporine in the rat. *Transpl. Int.* Jun 24 [Epub]

Shi, Y., Frankel, A., Radvanyi, L.G., Penn, L.Z., Miller, R.G., Mills, G.B. (1995) Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res.* **55(9)**, 1982-1988

Simon, N., Morin, C., Urien, S., Tillement, J.P., Bruguerolle, B. (2003) Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria. *Br. J. Pharmacol.* **138(2)**, 369-376

Solomon, H.S., Lai, M.M., Burnett, P.E. (1998) Immunophilins in the nervous system. *Neuron* **21**, 283-294

Staines, N., Brostoff, J., James, K. (1999) Immunologisches Grundwissen. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Strauss, G., Osen, W., Debatin, K.M. (2002) Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. **128(2)**, 255-266

Sukhai, M., Piquette-Miller, M. (2000) Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **3(2)**, 268-280

Tariq, M., Morais, C., Sobki, S., Al Sulaiman, M., Al Khader, A. (1999) N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14(4)**, 923

Thimmaiah, K.N., Easton, J., Huang, S., Veverka, K.A., Germain, G.S., Harwood, F.C., Houghton, P.J. (2003) Insulin-like growth factor I-mediated protection from rapamycin-induced apoptosis is independent of Ras-Erk1-Erk2 and phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signaling pathways. *Cacner Res.* **63(2)**, 364-374

Tietze, F. (1969) Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total an Oxidized Glutathione : Apllications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522

Trepanier, D.J., Gallant, H., Legatt, D.F., Yatscoff, R.W. (1998) Rapamycin: Distribution, Pharmacokinetics and Therapeutic Range Investigations: An Update. *Clin. Biochem.* **31(5)**, 345-351

Wang, C., Salahudeen, A.K. (1995) Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney Int.* **47**, 927-934

Wang, X., Luo, H., Perks, A., Wu, J. (1996) Rapamycin inhibits aldolase A expression during human lymphocyte activation. *J. Cell. Biochem.* **63**, 239-251

Warburg, O. (1930) In *Metabolism of Tumors*. Arnold Costable (London)

Wolf, A., Trendelenburg, C.F., Diez-Fernandez, C., Prieto, P., Houy, S., Trommer, W.E., Cordier, A. (1997) Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280(3)**, 1328-1334

Zhong, L.T., Sarafian, T., Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H., Bredesen, D.E. (1993) bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(10)**, 4533-4537

Zini, R., Simon, N., Morin, C., Thiault, L., Tillement, J.P. (1998) Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain. *Life Sci.* **63(5)**, 357-368

Zwingmann, C., Richter-Landsberg, C., Leibfritz, D. (2001) ^{13}C isotopomer analysis of glucose and alanine metabolism in glial cells: Involvement of glial substrate selection and intracellular pyruvate compartmentation for lactate release. *Glia* **34**, 200-212

Anhang

Publikationsliste

Serkova, N.; Donohoe, P; Gottschalk, S.; Hainz, C.; Niemann, C.U.; Bickler, P.E.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Christians, U.
Comparison of the effects of cyclosporine A on the metabolism of perfused rat brain slices during normoxia and hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22:** 342-352, 2002

Gottschalk, S.; Hainz, C.; Cummins, C.L.; Christians, U.; Leibfritz, D.; Benet, L.Z.; Serkova, N.
Comparison of metabolic neurotoxicity by immunosuppressants in adult vs. Newborn rats: role of the blood-brain-barrier. (in Bearbeitung: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*)

Miljus, J.; Gottschalk, S.; Hainz, C.; Leibfritz, D.; Serkova, N.
Oxidative stress and cell metabolism alterations by immunosuppressants in rat brain models. (in Bearbeitung: *Free Radic. Biol. Med.*) 2004

Serkova, N.; Gottschalk, S.; Jacobsen, W.; Hainz, C.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Christians, U.
Enhancement of cyclosporine induced metabolic nephrotoxicity by sirolimus. (eingereicht bei: *Kidney Int.*) 2003

Christians, U.; Gottschalk, S.; Hainz, C.; Miljus, J.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Serkova, N.
Time-dependent metabolic effects and free radical formation by cyclosporine in rat brain slices: combination with m-TOR inhibitors. (im Druck: *Br. J. Pharmacol.*) 2003

Gottschalk, S., Anderson, N., Miljus, J., Eckhardt, S.G., Serkova, N.
Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL Positive Cells. (eingereicht bei: *Clin. Cancer Res.*) 2003

Gottschalk, S.; Hainz, S.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Christians, U.; Serkova, N.
Metabolic neurotoxicity of immunosuppressants in the rat : Correlation between MRS and biochemical findings.*40th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, San Francisco,CA,USA, 25.-29.März, 2001

Hainz, C.; Gottschalk, S.; Jacobsen, W.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Christians, U.; Serkova, N.
MRS evaluations of metabolic changes by cyclosporine in rat brain : Role of the blood-brain-barrier. *40th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, San Francisco, CA, USA, 25.-29. März, 2001

Serkova, N.; Donohoe, P.; Gottschalk, S.; Hainz, S.; Christians, U.; Leibfritz, D.
From metabolic neurotoxicity to hypoxic neuroprotection: an MRS study of cyclosporine role in rat brain. 9th *Scientific Meeting of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)*, Glasgow, Scotland, UK, 21.-27. April, 2001

Serkova, N.; Gottschalk, S.; Hainz, S.; Benet, L.Z.; Leibfritz, D.; Christians, U.
Metabolic nephrotoxicity by cyclosporine in combination with macrolides: Comparison of SDZ-RAD vs. Sirolimus. *Transplant2001, 2nd Joint Transplant Meeting of the American Society of Transplantation (AST)*, Chicago, IL, 11.-16. Mai, 2001

Gottschalk, S.; Hainz, C.; Leibfritz, D.; Serkova, N.
MRS evaluations of the metabolic response of human leukemia cells to a new tyrosine kinase inhibitor gleevec. *10th Scientific Meeting of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)*, Honolulu, Hawaii, 18.-24. Mai, 2002

Gottschalk, S.; Hainz, C.; Miljus, J.; Benet, L.Z.; Christians, U.; Leibfritz, D.; Serkova, N.
Metabolic Effects and Free Radical Formation by Cyclosporine and Macrolide Immunosuppressants in Rat Brain Slices. *International Union of Pharmacology – XIVth World Congress of Pharmacology*, San Francisco, CA, USA, 7.-12. Juli, 2002

Gottschalk, S.; Dansauer T.; Miljus J.; Leibfritz D.; Serkova N.
Metabolic Effects by Imatinib on Human Leukemia Cells. *GDCH – Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie – 24thDiscussion Meeting: Magnetic Resonance and Molecular Interactions*, Bremen, Germany, 24.-27. September 2002

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Frau Dr. Natalie Serkova** für die freundliche Betreuung dieser Arbeit, die ebenso zahlreichen wie hilfreichen Diskussion und die sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dieter Leibfritz möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit und die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Labore seiner Arbeitsgruppe herzlich danken.

Bei **Herrn Prof. Dr. Detmar Beyersmann** bedanke ich mich für die Nutzungsmöglichkeiten seiner Labore. Den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe möchte ich für alle Hilfestellungen und Anregungen danken. Mein besonderer Dank gehört dabei **Frau Monika Cox** und **Herrn Dr. Wim Wätjen** für die zahlreichen praktischen Tipps.

Herrn Prof. Dr. Detlef Gabel danke ich für die freundliche Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Frau Dr. Claudia Zwingmann danke ich für die vielen Hilfen und Tipps zu Zellkulturarbeiten. **Frau Ingrid Killer** und **Herrn Carsten Hainz** möchte ich danken für die Unterstützung im Labor und für die Besorgung der zahlreichen Dinge, ohne die ein Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen wäre. Ebenso gehört mein Dank allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Leibfritz für die gute Zusammenarbeit, das nette Arbeitsklima und alle entstandenen Freundschaften.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Freundin Tina über deren Unterstützung und Zuspruch ich immer sehr glücklich war.

CURRICULUM VITAE

Promotion

Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Leibfritz (Universität Bremen) unter Anleitung von Dr. Natalie Serkova:	Dezember 1999 bis Dezember 2003
„Die molekularen Mechanismen der Neurotoxizität der Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Everolimus“	
(Im Rahmen eines durch das Emmy Noether-Programm geförderten Projektes der DFG)	

Diplom

Diplomarbeit im Fach Biochemie:	Juli 1999
„Cobalt und oxidativer Streß in C6-Glioma-Zellen: Einflüsse auf den Glutathiongehalt“	
Abschluss: *Diplom-Chemiker*	

Studium

Chemie an der Universität Bremen	1993-1999

Zivildienst

Zentralkrankenhaus Bremerhaven	August 1992- Oktober 1993

Schule

Grundschule und Gymnasium in Bremerhaven	1979-1992