

Yannick Büchtemann

Dr. med.

In vitro modelling of retinal ganglion cell susceptibility to glutamate excitotoxicity

Fach/Einrichtung: Neurologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Haas

Glutamat spielt eine wichtige Rolle im gesunden zentralen Nervensystem von Säugetieren, wo es einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter ist. Trotz seiner physiologischen Rolle kann eine Überstimulation von Neuronen durch Glutamat bei hohen Konzentrationen zu Toxizität führen (Exzitotoxizität). Dieser Mechanismus wurde erstmalig 1957 in der Retina beschrieben, wo eine Erhöhung der Glutamatkonzentration zu einer Degeneration der retinalen Ganglienzellen (RGC) führte. Später wurde diese Art des neuronalen Zelltodes auch mit verschiedenen anderen neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, einschließlich akuter Gehirnschämie, traumatischen Verletzungen und neurodegenerativen Erkrankungen.

Eine Krankheit, die mit der Degeneration von RGCs einhergeht, ist die Optikusneuritis, eine häufige Manifestation der Multiplen Sklerose, bei der ebenfalls eine Glutamat-Exzitotoxizität nachgewiesen wurde. In den letzten Jahren hat unsere Forschungsgruppe gezeigt, dass die Blockade von NMDA-Rezeptoren mit Memantin oder MK-801 den Verlust von RGCs in einem Tiermodell der Optikusneuritis verhindern kann. Auch für die Steigerung des Glutamatabbaus durch Überexpression von Glutamattransportern in der Retina wurde ein neuroprotektiver Effekt auf RGCs nachgewiesen. Ebenso konnte umgekehrt eine übermäßige Aktivierung der retinalen NMDA-Rezeptoren mehrere Aspekte der Optikusneuritis imitieren. Unter anderem wurde eine axonale Dysfunktion, Degeneration von RGCs und eine Verschlechterung der Sehfunktion beobachtet.

Trotz der in vivo-Korrelation zwischen Glutamataexposition und RGC-Degeneration ist die Anfälligkeit von isolierten RGCs gegenüber Glutamat in vitro umstritten, wobei einige Gruppen Evidenz dafür lieferten während andere keinen signifikanten Effekt nachweisen konnten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Faktoren zu identifizieren, die zu diesen stark unterschiedlichen Ergebnissen beitragen, und ein Modell zu etablieren mit dem die Exzitotoxizität in isolierten RGCs zuverlässig modelliert werden kann. Es wurde beobachtet, dass bestimmte Veränderungen in der Mediumzusammensetzung oder der Zelldichte keinen Einfluss auf das toxische Potenzial der Zugabe von Glutamat hatten. Der Zeitpunkt der Glutamatzugabe beziehungsweise die Dauer der Kultivierung der RGCs vor der Glutamatzugabe hatte jedoch einen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben. Es konnte gezeigt werden, dass RGCs anfällig für eine toxische Wirkung von Glutamat waren, wenn sie direkt am Tag der Zellpräparation exponiert wurden. Bei längerer Kultur konnten keine Anzeichen von Glutamatoxizität mehr beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass dies entweder darauf zurückzuführen ist, dass Zellen durch längere Exposition gegenüber Wachstumsfaktoren eine Resistenz gegen Glutamatoxizität entwickeln oder dass die Zellgesundheit aufgrund der in vitro-Bedingungen reduziert ist.

Bei der Exposition von Zellen gegenüber Glutamat am Tag der Zellpräparation wurde eine zuverlässige toxische Wirkung von Glutamat beobachtet. Dieses Modell wurde im Weiteren verwendet, um die Mechanismen genauer zu untersuchen, durch die Glutamat zum Zelltod führen kann. In der Vergangenheit wurde vermutet, dass verschiedene Glutamatrezeptoren die treibende Kraft hinter der Glutamat-Exzitotoxizität sind. Bei Verwendung verschiedener spezifischer Blocker von Glutamatrezeptoren hatten diese in vitro unabhängig von einer Glutamatexposition bereits einen starken negativen Einfluss auf das Zellüberleben. Dieser Effekt wurde selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen der Blocker beobachtet. Daher konnte eine möglicherweise teilweise schützende Wirkung der Rezeptorblockade nicht zuverlässig bestätigt werden.

Es wird vermutet, dass im Kontext der Exzitotoxizität ein Calciumeinstrom einer der wichtigsten nachgeschalteten Mechanismen der Glutamatrezeptoraktivierung ist. Neben dem Calciumeinstrom über Glutamatrezeptoren werden weitere Mechanismen des Calciumeinstroms bzw. -freisetzung vermutet. Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) an der Zelloberfläche, die physiologisch intrazelluläre Calciumionen im Austausch gegen extrazelluläre Natriumionen aus der Zelle transportieren, können, wenn die intrazellulären Natriumspiegel steigen, ihren Ionenstrom umkehren. Dieser Mechanismus wird verdächtigt, zu einem pathologischen Calciumeinstrom im Zusammenhang mit der Glutamat-Exzitotoxizität beizutragen. SEA0400 ist ein spezifischer Blocker dieser umgekehrten Funktion. Bei Anwendung von SEA0400 auf Zellkulturen wurden RGCs in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten vor Glutamat-Exzitotoxizität geschützt. Im weiteren wurde eine mikroskopische Darstellung der zellulären Calciumkonzentration verwendet, um die zugrundeliegenden Effekte besser zu verstehen. Bei Exposition gegenüber Glutamat zeigten die meisten Zellen zuerst einen physiologischen Calciumeinstrom, der zunächst zu einer stabil erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration führte. Einige dieser Zellen zeigten jedoch innerhalb einer Stunde nach der anfänglichen Glutamatexposition einen plötzlichen unkontrollierten Calciumeinstrom, einen Mechanismus, der als verzögerte Calcium-Dysregulation (DCD) bezeichnet wird. Durch Blockieren der zuvor genannten umgekehrten Funktion des NCX wurden signifikant weniger Zellen beobachtet, die eine DCD durchlaufen.

Mit dem hier etablierten Protokoll zur Modellierung der Glutamat-Exzitotoxizität in RGCs in vitro können weitere Experimente effizient durchgeführt werden. Weitere potenzielle Blocker für Exzitotoxizität können leichter bewertet werden. Die Verwendung der umgekehrten Funktion des NCX lieferte bereits vielversprechende Ergebnisse. Da in vitro-Bedingungen artifiziell sind und vergangene Studien besonders bei isolierten RGCs sehr variable Ergebnisse gezeigt haben, müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht behandelt werden. Dennoch können sie potentiell einen ersten Schritt zu mehr Optionen für die Behandlung neurodegenerativer Krankheiten bieten. Dies ist besonders wichtig in dieser Gruppe von Krankheiten, bei der in den letzten Jahrzehnten wenig Fortschritte bei pharmakologischen Behandlungsoptionen gemacht wurden.