

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol auf mitochondriale Funktionen

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Anika Thiede  
aus Salzwedel  
Magdeburg 2015

### Bibliographische Beschreibung:

Thiede, Anika:

Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol auf mitochondriale Funktion. - 2014. - 80 Bl., 20 Abb., 8 Tab.

### Kurzreferat

Es wird vermutet, dass die Interaktion mit den Mitochondrien eine wesentliche Voraussetzung für die Wirkung von  $\beta$ -Estradiol auf zelluläre Mechanismen ist. An Rattenlebermitochondrien (RLM) konnte mit Hilfe der hochauflösenden Respirometrie der Einfluss von 17- $\beta$ -Estradiol ( $\beta$ E) auf die Funktionen der Atmungskette gezeigt werden. Es wurde ein Anstieg der Ruhe- und der Substratatmung beobachtet, wohingegen die Atmung unter Zugabe von ADP oder  $\text{Ca}^{2+}$  vermindert war. Es wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte gezeigt. Der selektive Estrogenrezeptorantagonist Fulvestrant (Fu) führte ähnliche Effekte herbei oder verstärkte die Inhibition der phosphorylierenden Atmung durch  $\beta$ E. Messungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip bewiesen, dass unter Einfluss von  $\beta$ E die Verwertung der Substrate des Komplex I (Malat/Glutamat) und II (Succinat) eingeschränkt ist. Das Patch-Clamp-Verfahren ermöglichte es, mitochondriale Kanäle zu untersuchen. Aus RLM präparierte Vesikel aus innerer Mitochondrienmembran, Mitoplasten, enthielten die „permeability transition pore“ (PTP). Mitoplasten aus kultivierten Rattenastrocytomzellen verfügten über den mitochondrialen BK-Kanal (mtBK-Kanal). Die Applikation von  $\beta$ E führte zu einem kurzen Anstieg der Kanalaktivität sowohl der PTP als auch des mtBK-Kanals und nachfolgend zur Blockade der Kanäle. Fu bewirkte die Aktivierung des mtBK-Kanals und hob die Blockade des Kanals durch  $\beta$ E auf. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ E Mitochondrien über verschiedene Wege beeinflusst, unter anderem durch partielle Inhibition mitochondrialer Ionen-Kanäle der inneren Membran und durch Modulation der oxidativen Phosphorylierung.

### **Schlüsselwörter**

17- $\beta$ -Estradiol, Mitochondrien, oxidative Phosphorylierung, permeability transition pore (PTP), BK-Kanal

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Mitochondrien . . . . .	6
1.1.1	Aufbau und Funktion . . . . .	6
1.1.2	Die chemiosmotische Theorie . . . . .	8
1.1.3	Mitochondriale Dysfunktion in Zusammenhang mit Erkrankungen . . . . .	11
1.1.4	Apoptose und Mitochondrien . . . . .	14
1.2	Die „permeability transition pore“ (PTP) . . . . .	15
1.3	Der mitochondriale BK-Kanal (mtBK-Kanal) . . . . .	16
1.4	17- $\beta$ -Estradiol - Morphologie und Wirkung . . . . .	18
1.5	Fulvestrant – Morphologie und medizinischer Einsatz . . . . .	21
1.6	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Chemikalien . . . . .	24
2.2	Medien und Pufferlösungen . . . . .	25
2.2.1	Sauerstoffverbrauchsmessungen . . . . .	25
2.2.2	Patch Clamp . . . . .	25
2.3	Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen . . . . .	25
2.3.1	Präparation von Leberzellmitochondrien der Ratte . . . . .	25
2.3.2	Eiweißbestimmung . . . . .	26
2.3.3	Versuchsaufbau . . . . .	27
2.3.4	Kalibrierung der Sauerstoffelektroden . . . . .	27
2.3.5	Respiratorische Messungen . . . . .	28
2.3.6	Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip . . . . .	29
2.3.7	Statistische Verfahren . . . . .	29
2.4	Patch Clamp Verfahren . . . . .	30
2.4.1	Zellkulturen aus Astrocytomzellen . . . . .	30
2.4.2	Präparation von Hirnmitochondrien aus Astrocytomzellen . . . . .	30

---

2.4.3	Aufbau des Versuchsstandes . . . . .	31
2.4.4	Herstellung und Befüllung der Glaspipetten . . . . .	31
2.4.5	Versuchsablauf und Aufzeichnung des Patch-Clamp-Experi- mentes . . . . .	32
2.4.6	Analyse der Messergebnisse . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Sauerstoffverbrauchsmessungen an Rattenlebermitochondrien unter Einfluss von 17- $\beta$ -Estradiol . . . . .	35
3.1.1	$\beta$ E-Zugabe während der Messungen . . . . .	35
3.1.2	$\beta$ E-Zugabe während der Präparation . . . . .	36
3.1.3	Persistieren des $\beta$ E-Effekts und Irreversibilität . . . . .	37
3.1.4	Einfluss von Fulvestrant auf die mitochondriale Atmung . . .	37
3.1.5	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von $\beta$ E . . . . .	40
3.2	Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip .	41
3.2.1	Einfluss von $\beta$ E auf den Komplex I . . . . .	41
3.2.2	Einfluss von $\beta$ E auf den Komplex II . . . . .	44
3.3	$\beta$ E-Wirkung auf mitochondriale Ionenkanäle . . . . .	46
3.3.1	Identifizierung des spannungsabhängigen mtBK-Kanals . . . .	46
3.3.2	Einfluss von $\beta$ E auf den mtBK-Kanal . . . . .	48
3.3.3	Einfluss von Fulvestrant auf den mtBK-Kanal . . . . .	50
3.3.4	Einfluss von $\beta$ E auf die PTP . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Einfluss von $\beta$ E auf Atmungskette und oxidative Phosphorylierung .	57
4.2	$\beta$ E-Konzentrationen . . . . .	60
4.3	mtBK-Kanal . . . . .	61
4.4	Rezeptorabhängigkeit . . . . .	62
4.5	PTP . . . . .	64
4.6	Zusammenhang zwischen BK-Kanal, PTP und Atmungskette . . . .	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>

---

## Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ E	17- $\beta$ -Estradiol
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CcO	Cytochrom-c-Oxidase
Coenzym Q; Q	Ubichinon
CsA	Cyclosporin A
Cytc	Cytochrom c
DNA	deoxyribonucleic acid
EH	Haltepotential
ER $\alpha$ , ER $\beta$	Estradiol-Rezeptor $\alpha$ und $\beta$
Fu	Fulvestrant (ICI182780)
GTP	Guanosintriphosphat
IMAC	inner membrane anion channel
IMM	inner mitochondrial membrane
MnSOD	Mn-Superoxid-Dismutase
mtBK-Kanal	mitochondrialer „Big Potassium“-Kanal
MW	Mittelwert
OMM	outer mitochondrial membrane
P <sub>o</sub> , NP <sub>o</sub>	Offenwahrscheinlichkeit
PTP	permeability transition pore
RCI	Respiratorischer Kontrollindex
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SEM	standard error of the mean
VDAC	Voltage dependend anion channel

# 1 Einleitung

## 1.1 Mitochondrien

### 1.1.1 Aufbau und Funktion

Fast alle Eukaryonten sind Besitzer der auch als Zellkraftwerke bezeichneten Organellen. Nach der Endosymbiontentheorie sind sie aus Eubakterien entstanden, die von einer Ureukaryontenzelle aufgenommen wurden und unter glücklichen Umständen der Verdauung durch Phagozytose entgingen. Die Ureukaryontenzelle war nicht zu aerober Energiegewinnung fähig, wohingegen das Eubakterium Sauerstoff verwerten konnte. Die Endosymbiose dieser Urzellen machte daraufhin die Evolution zu höheren Lebensformen möglich. Die heutigen Mitochondrien besitzen eigenes Erbgut. In Größe von 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  und Form variieren sie stark. Der Innenraum, die Matrix, wird von zwei hoch spezialisierten Membranen umgeben. Dazwischen befindet sich der Intermembranraum. Die äußere mitochondriale Membran (OMM) ist durchsetzt von Porinen, die Moleküle bis zu 5000 Da hindurch lassen. Bei den Porinen handelt es sich um durch nukleäre Gene kodierte Polypeptide, die den außenmembranständigen, mitochondrialen, spannungsabhängigen, Anionen-selektiven Kanal („voltage dependent anion channel“, VDAC) bilden ([Stanley et al., 1995](#)). Der VDAC ist im Unterschied zu anderen Ionenkanälen in  $\beta$ -Faltblattstruktur aufgebaut. Durch den ständigen Austausch zwischen Cytosol und Intermembranraum entsteht ein messbarer Konzentrationsgradient für Nukleotide und Metabolite ([Gellerich et al., 1994](#)). Die OMM enthält ATPasen, die mit diversen cellulären Aktivitäten assoziiert sind. Andere Proteine der OMM sind an der Synthese von Membrankomponenten beteiligt ([Duncan et al., 2011](#)). Im Cytosol synthetisierte mitochondriale Proteine gelangen über die in der OMM lokalisierte Protein-Translokase (TOM) an ihren Bestimmungsort ([Meisinger et al., 1999](#)). IMM und OMM sind miteinander verbunden. Einen Verbindungspunkt stellt die Translokase der inneren Membran (TIM) dar, dessen C-terminaler Anteil in beiden Membranen fest verankert und essentiell für den Proteintransport ins Innere des Mitochondriums ist ([Murcha et al., 2005](#); [Mokranjac et al., 2003](#)). Das unter anderem an der OMM

sitzende Bcl-2-Protein inhibiert die Aktivierung proapoptotischer Proteine wie Bak und Bax (Lindsay et al., 2011).

Die Lipid-Doppelschicht der zu Cristae gefalteten IMM enthält einen hohen Anteil an Cardiolipin, ein stark hydrophobes Phospholipid, das die IMM impermeabler macht. Über hoch selektive Membranproteine, die zum Großteil der „mitochondrial carrier family“ (MCF) angehören, findet ein Stoffaustausch über die IMM statt (Nury et al., 2010). Es konnte ein spezifischer mitochondrialer Transporter für Pyruvat ausfindig gemacht werden (Hildyard & Halestrap, 2003). Ein weiteres Mitglied der MCF, der ADP/ATP-Austauscher oder Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT), war Mittelpunkt vieler Studien (Nury et al., 2010). Phosphat-, Citrat-Isocitrat-, Glutamat-,  $\text{Fe}^{2+}$ -Transporter, Entkopplungs-Proteine, und eine Vielzahl weiterer Mitglieder konnten kategorisiert und genotypisch identifiziert werden (Palmieri, 2004). Die IMM ist Ort der oxidativen Phosphorylierung und ATP-Synthese. Einige spannungsabhängige K-Kanäle wie der mitochondriale BK-Kanal (mtBK-Kanal), der in Epithelien, Endothelien oder Glia, also in nicht erregbaren Zellen, an den fundamentalen Funktionen einer Zelle wie Osmoregulation, Zellproliferation und Zellmigration mitwirkt, sowie der „inner membrane anion channel“ (IMAC), ein  $\text{Cl}^-$ -selektiver Kanal, durchspannen die IMM (Debska-Vielhaber et al., 2009; Siemen et al., 1999). In der IMM und OMM bilden mehrere Proteine die mitochondriale „permeability transition pore“ (PTP). Die Aktivierung der PTP führt zu Cytochrom-c-(Cyt)c-Ausstrom, Zusammenbruch des Membranpotentials und Unfähigkeit der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontrolle (Loupatatzis et al., 2002). Die PTP ist an der Apoptose beteiligt (Wallace, 2005).

Der Matrixraum enthält den Pyruvatdehydrogenase-Komplex zum Pyruvatabbau und zur Acetyl-CoA-Synthese, die  $\beta$ -Oxidation zur energetischen Verwertung von Fettsäuren, den Citratzyklus und mitochondriales Erbgut. Das mitochondriale Matrixenzym Mn-Superoxid-Dismutase (MnSOD) oder die cytosolische oder mitochondriale Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (Cu/ZnSOD) bewirken die Reduktion von hoch reaktiven Superoxid-Anionen zum stabileren Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Wird das  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die mitochondriale oder cytosolische Glutathion-Peroxidase oder die peroxismale Katalase nicht in  $\text{H}_2\text{O}$  umgewandelt, kann das  $\text{H}_2\text{O}_2$  die metallo- genen Zentren der mitochondrialen Enzyme angreifen und diese inaktivieren (Wallace, 2005).

### 1.1.2 Die chemiosmotische Theorie

Das Prinzip der chemiosmotischen Kopplung dient sowohl Prokaryonten als auch Lebewesen mit Mitochondrien oder Chloroplasten zur Erzeugung biologisch nutzbarer Energieträger. Der Terminus beschreibt den Zusammenhang zwischen der eigentlichen chemischen Reaktion der ATP-Synthese und den treibenden Membrantransportprozessen (Alberts et al., 2004). Komplex I, III und IV sind Generatoren der von Mitchell postulierten chemiosmotischen Energie (Mitchell, 1961). Hauptkonsument der elektrochemischen Kraft ist die ATP-Produktion durch die F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase (Komplex V) (Kadenbach et al., 2010). Komplex I und Komplex III verbindet eine feste funktionelle Kopplung (Watzke et al., 2010), die unter anderem durch Cardiolipin vermittelt wird (Nelson et al., 2009).

Die Elektronencarrier der Atmungskette sind Katalysatoren der oxidativen Phosphorylierung. Das Nikotinnukleotid NAD, Succinat und Flavoproteine sowie die Elektronen-Transferierendes-Flavoprotein- (ETF-) Ubichinon-Oxidoreduktase oder die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD) übertragen Elektronen auf Ubichinon (Coenzym Q, Q) - die Schnittstelle im Elektronenfluss zwischen den Komplexen. Cytochrome der Klassen a, b und c, Eisen-Schwefel-Proteine, die Flavoproteine FMN und FAD sind in die Multienzymkomplexe der Atmungskette als prosthetische Gruppen eingebettet.

Ling und viele andere Wissenschaftler bezweifelten lange, dass die Mitchell-Hypothese auch in situ anwendbar wäre (Ling, 1981). Experimente belegten, dass die oxidative Phosphorylierung von einer elektrochemischen Potentialdifferenz abhängig ist (Kunz et al., 1988; Korzeniewski & Zoladz, 2002).

Die chemiosmotische Theorie erklärt die Grundlage der ATP-Synthese. Dabei liegt der Schlüssel in der kontrolliert aufgebauten Differenz eines elektrochemischen Potentials von Protonen. Die H<sup>+</sup>-Ionen gelangen auf unterschiedlichen Wegen vom Matrixraum in den Intermembranspalt. Die Differenz von  $\tilde{\mu}_H$  ist abhängig vom elektrischen Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) und der Differenz des cytosolischen und Matrix-pH ( $\Delta\text{pH}$ ) (Dzбек & Korzeniewski, 2008) und wird auch als Protonenpotential  $\Delta p$  bezeichnet. Großen Anteil am Aufbau des Protonengradienten haben die Komplexe III und IV, der ADP/ATP-Austauscher, der Phosphat-Transporter und ein Protonen-Leck durch nichtlineare Membranpermeabilität (Krishnamoorthy & Hinkle, 1984).

Durch den H<sup>+</sup>-Transport über die IMM wird sowohl ein  $\Delta\text{pH}$ , als auch eine elektrische Potentialdifferenz erzeugt. Der Matrixraum ist in vivo negativer geladen als der Intermembranraum. Das Protonenpotential wird durch die Gleichung 1.1 be-

Tabelle 1.1: Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette. Tief gestellte Buchstaben symbolisieren den Weg der Protonen: P = positive Innenmembranseite (Membranzwischenraum), N = negative Seite (Matrix). Gleichungen in Anlehnung an (Nelson et al., 2009).

Enzymkomplex	Enzymgattung	Reaktionsgleichung
Komplex I	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase	$\text{NADH} + 5 \text{ H}_\text{N}^+ \text{ Q} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4 \text{ H}_\text{P}^+$
Komplex II	Succinat-Dehydrogenase	$\text{Succinat} \rightarrow \text{Furamat} + \text{QH}_2$
Komplex III	Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase	$\text{QH}_2 + 2 \text{ Cyt } c_1 \text{ (oxidiert)} + 2 \text{ H}_\text{N}^+ \rightarrow \text{Q} + 2 \text{ Cyt } c_1 \text{ (reduziert)} + 4 \text{ H}_\text{P}^+$
Komplex IV	Cytochrom-Oxidase	$4 \text{ Cyt } c \text{ (reduziert)} + 8 \text{ H}_\text{N}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ Cyt } c \text{ (oxidiert)} + 4 \text{ H}_\text{P}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Komplex V	ATP-Synthase	$\text{ADP} + n \text{ H}_\text{P}^+ + \text{P}_\text{I} \rightarrow \text{ATP} + n \text{ H}_\text{N}^+$

geschrieben und entspricht einer elektrischen Spannung.

$$\Delta p \equiv \frac{\Delta \tilde{\mu}_\text{H}}{F} = -2.30 \frac{RT}{F} \Delta pH + (\phi_i - \phi_a) \approx -(59 \text{ mV}) \Delta pH + (\phi_i - \phi_a) \quad (1.1)$$

$F$  Faraday-Konstante

$R$  molare Gaskonstante

$T$  absolute Temperatur

$\phi_i$  elektrisches Potential innen

$\phi_a$  elektrisches Potential außen

Der Protonentransport über die Membran führt zunächst zu einem raschen Anstieg der elektrischen Potentialdifferenz  $\phi_i - \phi_a$ , da das  $\text{H}^+$ -Ion eine elektrische Ladung besitzt. Aufgrund hoher Pufferkapazitäten der die Membranen umgebenden wässrigen Lösungen ist die Auswirkung auf  $\Delta pH$  zunächst gering. Ein gleichzeitiger passiver Ionentransport ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) über die semipermeable Membran führt aufgrund des angestrebten Ladungsausgleichs zur Verkleinerung der elektrischen Potentialdifferenz, während die Protonenpumpen kontinuierlich  $\text{H}^+$  in den

Intermembranspalt befördern. Ein Anstieg des  $\Delta\text{pH}$  wird initiiert. Nicholls experimentierte mit Rattenlebermitochondrien und detektierte ein  $\Delta p$  zwischen 170 mV und 220 mV (Nicholls, 1974). Es wird davon ausgegangen, dass etwa 80-85% des  $\Delta p$  aus der elektrischen Potentialdifferenz hervorgehen.  $\Delta\text{pH}$  bewirkt damit einen Beitrag von etwa 30 mV zum Protonenpotential  $\Delta p$ . (Dzbek & Korzeniewski, 2008). Das Protonenpotential treibt die ATP-Synthese und andere Energie verbrauchende Prozesse an.

Ein Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien sind „reactive oxygen species“ (ROS) (Wallace, 2005). Ein Ungleichgewicht der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase kann zum Kontrollverlust führen mit Anstieg der Potentialdifferenz, der Atmung und der ATP-Synthese sowie Protonenpumpenversagen, was eine ineffektive Nutzung der zur Verfügung stehenden Energie zur Folge hätte (Bender & Kadenbach, 2000). Bei ineffizienter Nutzung von Elektronen zur ATP-Synthese oder erhöhtem Angebot an Substraten verbleiben die Elektronen länger in der Elektronentransportkette. Währenddessen können sie direkt an  $\text{O}_2$  binden und die ROS-Produktion erhöhen (Wallace, 2005).

Kadenbach beschreibt einen Mechanismus bei dem unabhängig von der chemiosmotischen Theorie unter niedriger Potentialdifferenz Komplex IV durch ein hohes ATP/ADP-Verhältnis inhibiert und somit eine hohe Effizienz der oxidativen Phosphorylierung aufrecht erhalten wird, ohne dabei die ROS-Produktion zu erhöhen (Kadenbach et al., 2010). Durch Ausschalten der Glukoneogenese-Enzyme Pyruvatcarboxylase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, die ATP und GTP verbrauchen, kann das ATP/ADP-Verhältnis im Matrixraum erhöht und so eine Erniedrigung der Membranpotentialdifferenz erreicht werden (Ramzan et al., 2010). Durch die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheiten II und/oder III und Vb der Cytochrom-c-Oxidase (CcO) durch die Proteinkinase A kann die allosterische ATP-Inhibition herbeigeführt werden (Bender & Kadenbach, 2000). Diese verhindert die Produktion von ROS, die zu degenerativen Erkrankungen führen können (Ramzan et al., 2010). Es wird angenommen, dass unter normalen Bedingungen die mitochondriale Atmung eukaryonter Zellen durch die potentialunabhängige allosterische ATP-Inhibition der CcO reguliert wird. Eine Respirationskontrolle, die die Atmung durch das Potential reguliert, wie von Mitchell postuliert, tritt nur unter Stress auf, wenn die allosterische ATP-Inhibition ausgeschaltet ist (Ramzan et al., 2010).

### 1.1.3 Mitochondriale Dysfunktion in Zusammenhang mit Erkrankungen

Der Einfluss der Mitochondrien auf den Organismus ist multifaktoriell. Von ihm hängen essentielle Funktionen wie Zellatmung, Apoptose und Neutralisierung von ROS ab. Eine Veränderung des mitochondrialen Erbguts durch Mutation kann Auslöser metabolischer Erkrankungen sein. Der Pathophysiologie mitochondrialer Erkrankungen liegt oft eine Störung der oxidativen Phosphorylierung zu Grunde. Ursächlich können spezifische Punktmutationen oder Deletionen nukleärer oder mitochondrialer DNA (mtDNA) sein, die maternal beziehungsweise autosomal dominant und rezessiv vererbt werden oder sporadisch auftreten. Kleinste Modifikationen können zu multiplen klinischen Syndromen mit hoher Variabilität der phänotypischen Expression führen. Grund hierfür ist die Allgegenwärtigkeit der Mitochondrien. Infolge dessen wird das klinische Bild durch den Energieumsatz sowie vom Anteil mutierter mtDNA im betroffenen Gewebe bestimmt. Angesichts des hohen Grundumsatzes in Muskel- und Nervenzellen ist die Bezeichnung „mitochondriale Encephalomyopathien“ treffend. Die Zuordnung zu einem spezifischen Syndrom ist oft schwierig, da verschiedene Mutationen unterschiedliche Symptome hervorrufen können und die Symptome zwischen den Syndromen überlappen. Die häufigsten klinischen Syndrome und deren genetische Grundlagen und klinische Ausprägung sind der Tabelle 1.2 zu entnehmen.

Tabelle 1.2: Häufigste Syndrome mitochondrialer Encephalomyopathien. Tabelle in Anlehnung an ([Hufschmidt et al., 2009](#)).

Erkrankung	Genetik	Klinisches Bild
Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)	70% singuläre Deletion der mtDNA maternal autosomal dominant oder rezessiv	Beginn: meist um 20. Lebensjahr, oft kleinwüchsig, Bilaterale Ptose, Augenbewegungsstörungen, Ataxie, Dystonie, Demenz, proximale Myopathie, PNP (CPEO plus). langsam progressiv oder stationär

Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)	singuläre Deletion der mtDNA (v. A. Komplex I und VI)	Beginn: < 20. Lebensjahr, Retinopathia pigmentosa, externe Ophthalmoplegie mit Ptosis, kardiale Reizleitungsstörungen, cerebelläre Ataxie, Kleinwuchs, Schwerhörigkeit, Demenz, endokrinologische Störungen, axonale PNP
MERRF-Syndrom (Myoklonus-Epilepsie mit ragged red fibres)	Maternal oder sporadisch, meist Punktmutation mtDNA	Beginn: jedes Alter, Myoklonus, Ataxie, epileptische Anfälle, proximale Gliederschwäche, Kopfschmerzen, Demenz, Schwerhörigkeit, Opticusatrophie, Fußdeformitäten, cervicale Lipome
MELAS-Syndrom (Myopathie, Encephalopathie, Lactatazidose und („stroke-like episodes“))	Meist maternale Punktmutation mtDNA (Deletion/Transkription von mtDNA)	Episodische und/oder akute neurologische Defizite, epileptische Anfälle, Erbrechen, Migräne, Myopathie, Schwerhörigkeit, endokrinologische Störungen, Kleinwuchs
NARP (Neruogene Ataxie und Retinopathia pigmentosa)	Heteroplasmie < 90% einer maternalen Punktmutation mtDNA (> 90% M. Leigh)	Axonale Neuropathie, Ataxie, Pigmentretinopathie, Kardiomyopathie, epileptische Anfälle, psychomotorische Retardierung, proximale Muskelschwäche
Hereditäre Leber-Optikus-Neuropathie (LHON)	Maternal meist homoplastische Punktmutation der mtDNA, 85% Männer	Beginn: 18. bis 30. Lebensjahr, bilateraler Visusverlust, Zentralskotom, Multiple Sklerose-ähnliche Erkrankung,
Mitochondriale neurogastrointestinale Encephalomyopathie (MNGIE)	Autosomal rezessive, selten autosomal dominante nukleäre Mutationen	Gastrointestinale Motilitätsstörungen, externe Ophthalmoplegie, Ptosis, PNP, Leukencephalopathie

Andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Friedreich-Ataxie und Alzheimer-Demenz werden mit mitochondrialen Defekten und Fehlfunktionen in Verbindung gebracht. Oxidativer Stress ist eine frühe Erscheinung der Alzheimer-Krankheit und tritt sowohl im Gehirn als auch in peripheren Geweben auf (Gibson, 2002). Ein Vergleich von Kontrollpatienten und Patienten mit Alzheimer-Krankheit gleichen Alters zeigte einen signifikanten Anstieg von oxidativen Schädigungen der mtDNA in der erkrankten Gruppe (Mecocci et al., 1994). Sowohl die idiopathische als auch die erblichen Formen des Parkinson-Syndroms scheinen mit einer mitochondrialen Dysfunktion in Zusammenhang zu stehen (Wallace, 2005). Die autosomal rezessiv vererbte Form des Morbus Parkinson wird durch eine Mutation des PARK 6-Gens, welches eine mitochondriale Serin-Threonin-Kinase kodiert, hervorgerufen (Healy et al., 2004; Baron et al., 2007). Die familiäre Amyotrophe Lateralsklerose beruht auf einem Defekt der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase. Es kommt zur Anhäufung von Superoxid-Anionen im Intermembranspalt (Wallace, 2005). Eine weitere Erkrankung dieses Formenkreises ist die autosomal rezessiv vererbte Friedreich-Ataxie. Durch eine Repeat-Expansion kommt es zur fehlerhaften Produktion und somit zu einem Mangel des nukleär kodierten mitochondrialen Proteins Frataxin. Das fehlerhafte Frataxin hat eine Akkumulation mitochondrialer Eisenkomplexe, defekte Eisen-Schwefel-Enzyme und eine erhöhte Rate an oxidativen Schäden zur Folge (Bulteau et al., 2012). In frühen Stadien des Morbus Huntington wurde eine gestörte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase belegt, die wiederum zur Öffnung der PTP und zum Untergang der Zelle führen könnte (Panov et al., 2002).

MtDNA-Deletionen wurden in Herzgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen, die auf erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen waren (Corral-Debrinski et al., 1992). Auch scheint eine Beziehung zwischen mitochondrialen Störungen und oxidativem Stress mit der Entstehung von Carcinomen zu bestehen (Wallace, 2005). Eine mitochondriale transfer-RNA-Mutation konnte mit einem Subtyp des Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden (van den Ouweland et al., 1994).

Die fortschreitende Schädigung und Akkumulation von mtDNA während des Lebens ist Teil des Alterungsprozesses (Michikawa et al., 1999; Wallace, 2005). Während die Mitochondrienzahl und die basale Zellatmung größtenteils unbeeinflusst bleiben, kommt es altersabhängig zur Reduktion des Cyt<sub>c</sub>, des Cardiolipins, der CcO-Funktion und der Glutamatantwort (Jones & Brewer, 2008). Dieses Wissen könnte ein wichtiger Ansatzpunkt für symptomatische Therapien oder sogar für kurative Behandlungen chronischer, endokrinologischer und neurodegenerativer Erkrankungen sein. Mit dem zunehmenden Verständnis für die mitochondrialen Funk-

tionsabläufe und ihre Bedeutsamkeit in Hinblick auf Apoptose-Mechanismen kann in Zukunft durch den Einsatz von spezifisch wirksamen Pharmaka gezielt Einfluss auf Zelltod und Zellprotektion genommen werden.

### 1.1.4 Apoptose und Mitochondrien

Zellwachstum und -untergang stehen im Organismus im Gleichgewicht. Die „innere Uhr“ diktiert einer Zelle ihren Proliferationszyklus und ihr Sterben. Über Signalkaskaden findet eine Kontrolle dieser cellulären Mechanismen statt. Der programmierte Zelltod (Apoptose) führt zum Untergang der Zelle (Kerr et al., 1972). Durch Apoptose werden embryonale Entwicklung, Menstruationszyklus, sowie Regeneration und Abbau von Organsystemen (z. B. Thymus) reguliert. Der Zelltod kann auch durch äußere Faktoren, die den Organismus potentiell bedrohen, eingeleitet werden. Beispiele hierfür sind Virusinfektionen, Hitze und Gammastrahlung.

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen energieverbrauchenden Zellabbau ohne inflammatorische Umgebungsreaktion. Die intracellulären Strukturen verdichten sich, das Cytoskelett wird aufgelöst, die Zelle schrumpft, während die Kernhülle zerfällt und Endonukleasen das Erbgut kontrolliert spalten, so dass Aminosäuren und Nukleotide wiederverwertet werden können. Durch Ausbildung apoptotischer Vesikel wird eine rasche Phagozytose gewährleistet.

In der Zelle ruhen Procaspasen, deren Aktivierung eine proteolytische Kaskade auslöst. Die Spaltung der Proteasen wird durch „Todesrezeptoren“ an der Oberfläche einer Zelle übermittelt. Hierzu zählen TNF-Rezeptor, FAS-Rezeptor, TRAIL und andere, die über sogenannte „death domains“ mit Cytoplasmaproteinen interagieren (Schubert, 2003). Intracelluläre Proteine regulieren den intrinsischen oder mitochondrialen Apoptose-Mechanismus. Hierzu zählen einige Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak, die durch Erhöhung der Permeabilität der OMM einen Ausstrom von Cytc provozieren und so proapoptotisch wirken. Der Vorgang wird durch anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL und andere gehemmt (Plourde et al., 2013). Wird Cytc als Bindeglied zur Atmungskette freigesetzt, vereint es sich mit ATP und dem Adapterprotein Apaf-1 zu einem Apoptosom, das die Caspase-Kaskade über Dimerisierung der Procaspase-9 zu Caspase-9-Dimeren anstößt oder beschleunigt. Proteine der „Inhibitor of apoptosis“- (IAP-)Familie können durch Bindung an Procaspasen oder Caspasen die Aktivierung oder Aktivität unterbrechen. Die Proteine cIAP1, cIAP2, and XIAP sind Mitglieder der IAP-Familie (Vince et al., 2012). Es wird versucht mit Hilfe von niedermolekularen IAP-Inhibitoren die Apoptose in Carcinomzellen zu induzieren. Basit experimentierte hierfür mit Zell-

kulturen eines Rhabdomyosarkoms ([Basit et al., 2012](#)).

## 1.2 Die „permeability transition pore“ (PTP)

In den vergangenen Jahren ist es gelungen, die Wirkungsweise der unterschiedlichen Ionenkanäle der Mitochondrienmembran und deren gegenseitige Beeinflussung zu untersuchen und somit etwas besser zu verstehen. Mitochondriale Kanäle scheinen eine Schlüsselrolle bei der Regulation und Auslösung der Apoptose einzunehmen. Wie oben bereits beschrieben, wirkt extramitochondriales Cytc proapoptotisch. Der Ausstrom von Cytc wird auf eine Öffnung der sogenannten „permeability transition pore“ (PTP) zurückgeführt ([Loupatatzis et al., 2002](#)). Dabei handelt es sich um einen „high conductance channel“ (Leitfähigkeit  $> 1$  nS) in der IMM ([Bernardi, 1999](#)).

Der Aufbau der PTP ist weitestgehend ungeklärt. Man nimmt an, dass es sich um ein komplexes Gebilde aus mehreren Komponenten, unter anderem dem ANT in der IMM, dem VDAC in der OMM, Bax, Bcl-2 und Cyclophilin D handelt ([Wallace, 2005](#)). Neuerdings wird die F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase als ein wichtiges Element der PTP angesehen ([Bonora et al., 2013](#)). Zwar spielt der VDAC eine modulatorische Rolle bei der Öffnung der PTP, doch zeigten Experimente, dass auch ein Fehlen des Kanals die PTP-Aktivität nicht ausschaltet. In Versuchen mit VDAC-knock-out-Mäusen führte das Öffnen der PTP und die Aktivierung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie unverändert zum Zelltod ([Baines et al., 2007](#)). Eine Aktivierung der PTP konnte nach Inaktivierung der ANT durch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen erreicht werden, so dass die ANT insbesondere modulierenden Einfluss auf die PTP hat ([Kokoszka et al., 2004](#)). Letztendlich bleiben also durchaus Fragen in Hinblick auf die molekulare Natur der PTP offen.

Die Öffnung der PTP kann durch mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, erhöhte ROS-Produktion, verminderte celluläre Atmung und erniedrigte mitochondriale ADP- und ATP-Level sowie die Verschiebung des  $\Delta p$  eingeleitet werden. Eine Aktivierung der Pore führt durch Ein- und Ausstrom von Ionen zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten und letztendlich zur mitochondrialen Schwellung. Dies hat den Verlust von Proteinen mit einem Molekulargewicht bis zu 1500 Da aus dem Intermembranraum zur Folge ([Di Lisa et al., 2001](#)). Unter anderem kommt es zur Freisetzung von Apoptoseauslösern wie Cytc, AIF und Endonuklease G. Durch Aktivierung der Procasen-2, -3 und -9 zu den entsprechenden Caspasen und Cytc wird eine proteolytische Kaskade in Gang gesetzt, die zur DNA-Fragmentierung führt ([Wallace, 2005](#)).

Die neuroprotektive Wirkung einiger Substanzen wird auf eine Interaktion mit der PTP und anderen mitochondrialen Kanälen zurückgeführt. So konnte ein Zusammenhang zwischen Melatonin, einem Hormon der Epiphyse, und dessen protektiver Wirkung auf Neuronen, die zuvor mit dem Serotoninabkömmling behandelt wurden, gezeigt werden. Es wird angenommen, dass der Effekt auf die direkte Blockierung der PTP zurückzuführen ist, die sich mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten an Mitoplasten aus Rattenlebermitochondrien nachweisen ließ (Andrabi et al., 2004). Ein weiterer Inhibitor der PTP ist Cyclosporin A (CsA) (Bernardi et al., 1994; Halestrap et al., 1997). Pramipexol hemmt die PTP reversibel (Sayeed et al., 2006). Der protektive Effekt des (Dimethyl)-Amilorids, ein Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, während der Reperfusion von ischämisch infarzierten Rattenherzen wird ebenfalls auf Blockierung der PTP zurückgeführt (Prendes et al., 2008). Ein neues Chemotherapeutikum, Gold(III)-Dithiocarbamato-Komplex AUL12, soll gezielt die Öffnung der PTP und Aktivierung von Bax in Tumorzellen auslösen (Chiara et al., 2012). Abhängig von der ADP-Konzentration an der IMM kann Atractolysid als Aktivator der PTP wirken (Cheng et al., 2010; Gizatullina et al., 2005).

### 1.3 Der mitochondriale BK-Kanal (mtBK-Kanal)

Kalium-Kanäle (K-Kanäle) zeichnen sich durch eine hohe Variabilität und Spezifität aus. Sie nehmen Einfluss auf den Aufbau des Aktionspotentials erregbarer Zellen, Stabilisierung des Membranpotentials, Regulation der Ausschüttung von Neurotransmittern, Apoptose und Cytoprotektion. Einige der Kaliumkanäle zeichnen sich durch Eigenschaften aus wie Spannungsabhängigkeit (voltage dependent, Kv), ATP-Abhängigkeit (KATP) und Calciumabhängigkeit (KCa). Betrachtet man die Unterschiede in der Leitfähigkeit, den pharmakologischen Eigenschaften und der Spannungsabhängigkeit der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen K-Kanäle, lassen sie sich in drei Untergruppen einteilen. Die Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (10-20 pS) sind vom Membranpotential unbeeinflusst und können mit Apamin gehemmt werden („small-conductance channels“, SK). Spannungsunabhängig aber durch Charybdotoxin hemmbar sind die Kanäle mit einer intermediären Leitfähigkeit von etwa 25-100 pS („intermediate-conductance channels“, IK). Die K-Kanäle mit einer hohen Leitfähigkeit von 100-300 pS („High-conductance (maxi-K) channels“, BK) unter den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen sind spannungsabhängig und durch Charybdotoxin blockierbar (Kaczorowski et al., 1996).

Durch die Fähigkeit, Membranpotentiale und intracelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zu beeinflussen, haben plasmamembranständige BK-Kanäle Anteil an der Regulation neuronaler

ler Erregungsüberleitung, des Muskel- und Vasotonus und an Sekretionsvorgängen (Wallner et al., 1999; Valverde et al., 1999). Der BK-Kanal wird auch intracellulär exprimiert. Bisher konnten BK-Kanäle im Golgiapparat, endoplasmatischen Retikulum, Nucleus und Mitochondrium nachgewiesen werden (Singh et al., 2012).

Eine Fehlfunktion des BK-Kanals begünstigt Carcinomwachstum und die Ausbildung von Krankheiten des rheumatologischen Formenkreises (Mound et al., 2013; Hu et al., 2012). Genmutationen mit nachfolgender Dysfunktion des BK-Kanals können neuronale Übererregbarkeit verursachen und zu Temporallappenepilepsien, tonisch-klonischen Anfällen und Alkoholentzugsanfällen führen (N’Gouemo, 2011). Durch Aktivierung des BK-Kanals wurde das Risiko für Frauen vor der Menopause an einer systemischen Hypertension zu erkranken reduziert (Ohya et al., 2005).

Der porenbildende Ring des BK-Kanals wird durch ein Homotetramer von  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet. Sie stehen in Verbindung mit vier modulierenden  $\beta$ -Untereinheiten, die Einfluss auf Kinetik des Kanals und  $\text{Ca}^{2+}$ - sowie Spannungsabhängigkeit haben. Dem heterogenen, multimetrischen Komplex gehören die Untereinheiten  $\beta 1$ - $\beta 4$  an. Proteinmodulationen der einzelnen Komponenten führen zu einer hohen Variabilität und Zellspezifität (Knaus et al., 1994; Singh et al., 2012; Wu et al., 2013; Miranda et al., 2013). Neuere Studien konnten belegen, dass eine Wanderung intracellulärer BK-Kanäle zur Plasmamembran stattfindet und andererseits fest an Zellorganellen und ihre Funktionen gebundene BK-Kanäle existieren (Singh et al., 2012). Die  $\beta$ -Untereinheiten ( $\text{BK}\beta$ ) bestehen aus zwei membrandurchspannenden Domänen, welche die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität, die Kinetik und die Toxin-Affinität beeinflussen können. Abhängig vom Gewebe gibt es unterschiedliche Isomere der  $\text{BK}\beta$ . Die  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\text{BK}\alpha$ ) formen die porenbildende Komponente. Sie modulieren die biochemischen Eigenschaften des Kanals gewebespezifisch (Ohya et al., 2005; Kaczorowski et al., 1996).

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode konnten Siemen et al. 1999 die Existenz eines mitochondrialen BK-Kanals nachweisen. Dieser zeichnete sich durch die gleichen Eigenschaften wie der bekannte plasmamembranständige BK-Kanal aus: Blockierung durch Charybotoxin, einem Bestandteil eines Skorpiongiftes,  $\text{Ca}^{2+}$ - und Membranpotential- Abhängigkeit (Siemen et al., 1999). Die Öffnung von mitochondrialen K-Kanälen erhöht den  $\text{K}^+$ -Einstrom. Das Membranpotential wird depolarisiert und die Matrix- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration minimiert. Dies wiederum vermindert die  $\text{P}_o$  der PTP und wirkt somit antiapoptotisch und cytoprotektiv. Die Öffnung des mtBK-Kanals hält die PTP geschlossen (Cheng et al., 2010).

Stickstoff-induzierte Hypoxie führte in Patch-Clamp-Versuchen zur Aktivierung des mtBK-Kanals (Cheng et al., 2010). Experimente mit dem selektiven BK-

Kanal-Agonisten NS1619 (1,3-Dihydro-1-[2-Hydroxy-5-(Trifluoromethyl)Phenyl]-5-Trifluoromethyl-2H-benzimidazol-2-on) ließen darauf schließen, dass eine erhöhte BK-Kanalaktivität sich cardioprotektiv auswirkt und ROS-Produktion hemmt. Paxillin, ein BK-Kanal-Blocker, hebt den protektiven Effekt auf (Cao et al., 2005; Xu et al., 2002; Debska-Vielhaber et al., 2009).

Der protektive Effekt des Tumor-Nekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ist auf eine Aktivierung des mtBK-Kanals und eine Inhibition der PTP zurückzuführen (Gao et al., 2005). Dithionit, Guanosinmonophosphat (GMP) und DHS-I sind weitere mtBK-Kanal-Agonisten (Cheng et al., 2010; Kaczorowski et al., 1996).

Die Indolalkaloide Aflatrem, Paspalinin, Paspalicin, Paspalitrem A and C, Paxillin, Penitrem A und Verruculogen haben einen hemmenden Einfluss auf die BK-Kanalaktivität. Es handelt sich hierbei um aus Pilzen gewonnene tremorgene Terpene, die zu neurologischen Ausfällen führen können (Kaczorowski et al., 1996).

Ein Einstrom von  $K^+$  über sarkolemmale K-Kanäle der Myozyten kann im Falle einer Ischämie zu gefährlichen Herzrhythmusstörungen führen. Diese Gefahr besteht bei einer therapeutischen Beeinflussung der mtBK-Kanäle nicht. Der Einsatz von BK-Kanal-Öffnern könnte somit hilfreich in der Behandlung und Prävention cardialer Ischämien sein (Sakamoto et al., 2008).

Typhonium giganteum (chin.: Baifuzi) aus der Familie der Aronstabgewächse ist Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin. Experimente zeigten eine signifikante Reduktion des Neuronenverlustes während eines Schlaganfalls, wenn das Gewebe nach transientser Hypoxie mit Baifuzi behandelt wurde und auch die Öffnung von BK-Kanälen. Ziel derartiger Forschungen ist die Entwicklung potenter neuroprotektiver Agenzien bei der Behandlung von Hirninfarkten (Chi et al., 2010).

## 1.4 17- $\beta$ -Estradiol - Morphologie und Wirkung

Estrogene sind Steroidhormone, die im Stroma ovarii, sowie in den Thekaluteinzelnen des reifenden Follikels und der Plazenta gebildet werden. Aus endokrinen Zellgruppen werden die Inkrete in die Blutbahn abgegeben und gelangen so via Transportprotein an ihren Wirkort. Das Grundgerüst besteht aus einer charakteristischen Vierringstruktur, die sich aus dem Cholesterin bildet. Ort der Synthese sind spezialisierte Mitochondrien, in deren IMM die Seitenkette verändert und Sauerstoffatome mit Hilfe von Cytochrom-P450-Enzymen eingefügt werden. Die wichtigsten Estrogene sind Estron, Estriol und 17- $\beta$ -Estradiol ( $\beta$ E), das potenteste der Gruppe. Wie alle Steroidhormone sind sie stark hydrophob und polar. Der aromatische Ring ist sehr stabil. Die Wasserstoffatome lassen eine positive Partialladung vermuten, was eine

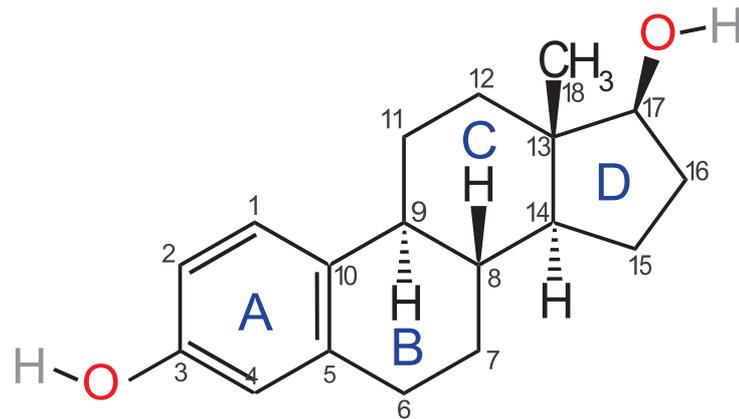


Abbildung 1.1: Strukturformel von 17- $\beta$ -Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol;  $C_{18}H_{24}O_2$ )

gute Membranpermeabilität zur Folge hätte. Zudem konnte  $\beta$ E durch Spektroskopie die Eigenschaft eines Radikalfängers zugewiesen werden (Winterle et al., 2001). Die Membran der Zielzellen durchqueren Estrogene durch Diffusion und Bindung an spezifische Rezeptoren an Membranen und Zellkern. Dies führt zur Konfirmationsänderung des Rezeptors, Bindung an regulatorische Bereiche der DNA und Modifikation der mRNA-Synthese-Rate. Estradiol beeinflusst die Ausprägung weiblicher Geschlechtsmerkmale, steuert Menstruationszyklus, menschliches Sexualverhalten, Knochen- und Knorpelwachstum und wirkt modifizierend auf den Gefäßtonus.

Es gibt zwei unterschiedliche  $\beta$ E-Rezeptoren (ER),  $ER\alpha$  und  $ER\beta$ . Ihre Expression ist zell- und gewebespezifisch. Ein höherer Anteil an  $ER\alpha$  lässt sich in Uterus, fibromuskulären Stroma der Prostata, Thekazellen der Ovarien, Testes, Epididymen, Knochen, Mammae, einigen Gehirnregionen, Leber und weißen Adipozyten finden, wohingegen  $ER\beta$  vor allem in Colon, Epithel der Drüsenzellen der Prostata, Testes, Granulosazellen der Ovarien, Knochenmark, Speicheldrüsen, Gefäßendothelien und Teilen des zentralen Nervensystems nachweisbar sind (Dahlman-Wright et al., 2006). Im Fokus vieler Studien liegt die Spezifizierung von Geschlechtsunterschieden bei der Wirkung von Neuroprotektiva. Heyer et al. fanden heraus, dass männliche Zellen bei Normoxie gegen äußere Einflüsse unempfindlicher waren, wohingegen eine höhere Vulnerabilität bei Hypoxie im Gegensatz zu weiblichen Zellen bestand. Fulvestrant (ICI182780, Fu) blockierte den Effekt von  $\beta$ E in Zellen, die  $ER\alpha$ , jedoch nicht  $ER\beta$  exprimierten. In männlichen hippocampalen Neuronen stieg das Verhältnis von  $ER\beta$  zu  $ER\alpha$  unter Hypoxie, so dass der protektive  $\beta$ E-Effekt während der Hypoxie scheinbar durch  $ER\beta$  vermittelt wurde (Heyer et al., 2005).

Andere  $\beta$ E-Effekte sind rezeptorunabhängig (Green et al., 2001; Yi et al., 2008; Richardson et al., 2012). Richardson et al. zeigten, dass  $\beta$ E die ROS-induzierten

Schäden an intracellulären Lipiden, Proteinen und mitochondrialen Funktionen in Mitochondrien aus Friedreich's Ataxie (FRDA)-Hautfibroblasten reduzierte. Demnach sollen die FRDA-Fibroblasten-Mitochondrien unter Einfluss eines Estrogens in Form eines Phenolrings desensibilisierter gegen ROS-Stress sein und effizienter ATP produzieren (Richardson et al., 2012). Die Forschung mit nichtfeminisierenden estrogenverwandten Substanzen eröffnet die Möglichkeit, vor Symptombeginn protektiv einzugreifen oder den Krankheitsbeginn hinauszuzögern. Eine Behandlung mit  $\beta$ E oder dem Enantiomer von  $\beta$ E vor einem iatrogenen cerebralen Arterien-Verschluss („Middle cerebral artery occlusion“, MCAo) führte in den Studien von Green et al. zu einer 60%-igen Reduktion des Defektareals. Unter den verwendeten Dosen kam es in weiblichen Ratten nicht zu peripheren Estrogenwirkungen. Schon bei einer Konzentration von 10 nM wurde die toxische Wirkung von  $H_2O_2$  in humanen Neuroblastomzellen durch das Enantiomer des  $\beta$ E massiv reduziert (Green et al., 2001). Ähnliche neuroprotektive, rezeptorunabhängige Effekte konnte die Forschungsgruppe um Yi feststellen. Durch Behandlung mit  $\beta$ E ließ sich der glutamatinduzierte Zelltod verhindern (Yi et al., 2008).

Die neuroprotektiven Effekte des  $\beta$ E sind unter anderem von mitochondrialen Funktionen abhängig. Yao et al. sahen eine Steigerung der maximalen respiratorischen Kapazität durch die Wirkung des  $\beta$ E. Die erhöhte Atmungsaktivität unter  $\beta$ E schien zum Großteil auf einem direkten Einfluss auf die mitochondriale oxidative Phosphorylierung durch erhöhte Expression der Komplexe zu beruhen (Yao et al., 2011). Es ließ sich zeigen, dass unter physiologischen  $\beta$ E-Konzentrationen ein schützender Effekt durch Hemmung des Cyt<sub>c</sub>-Verlustes möglich ist, solange es nicht durch zu hohe Konzentrationen zur Schädigung mitochondrialer Funktionen kommt (Morkuniene et al., 2002). Physiologische  $\beta$ E-Konzentrationen verringerten ER $\alpha$ -vermittelt die mitochondriale Superoxid-Produktion und erhöhten die mitochondriale Aconitase-Aktivität.  $\beta$ E führte zum Anstieg der Cyt<sub>c</sub>-mRNA-Transkriptionsrate.  $\beta$ E könnte somit aufgrund der Reduzierung von ROS, Akkumulation der mtDNA und Mutation den Beginn der altersbedingten Gehirnerkrankungen verzögern (Razmara et al., 2008). Die multifaktoriellen Wirkmechanismen und die durch Studien belegten cyto- und neuroprotektiven  $\beta$ E-Effekte wecken Hoffnung auf ein potentes Agens für die Bekämpfung und Behandlung degenerativer, cardiogener und cerebraler Erkrankungen.

## 1.5 Fulvestrant – Morphologie und medizinischer Einsatz

Fulvestrant (Fu, ICI 182, 780; Handelsname: Faslodex<sup>®</sup>) ist ein steroidaler Estrogen-Antagonist, der als ER-„Downregulator“ wirkt (Robertson, 2001). Das Antiestrogen agiert dabei nicht als Agonist (Sawada et al., 2000).

Goldstandard in der Therapie des Mammacarcinoms zur Rezidivprophylaxe ist der selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen. Neben den antagonisierenden Effekten wirkt Tamoxifen jedoch in einigen estrogensensiblen Geweben als Agonist und kann so das Risiko eines Endometriumcarcinoms erhöhen. Die Dauer der Therapie mit Tamoxifen ist durch eine rasche Resistenzentwicklung begrenzt. Die Bindungsaffinität des Fu zum ER gegenüber Tamoxifen ist etwa 100-fach größer. Ein agonistischer Effekt auf den Uterus besteht nicht (Robertson, 2001). Fu wird in der systemischen Therapie von Patienten mit metastasiertem Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs eingesetzt (Tan et al., 2013). Durch den Einsatz von Fu in einer Dosis von 250 mg intramuskulär alle 4 Wochen bei Frauen mit Hormonrezeptor-positivem, fortgeschrittenem Endometriumcarcinom oder Rezidiven konnte in einigen Fällen ein partieller Respons oder Stable Disease erreicht werden. Die Gaben wurden sehr gut vertragen, so dass weitere Studien mit höheren Dosen angestrebt werden (Emons et al., 2013). In der Forschung hat Fu große Relevanz für die Differenzierung von

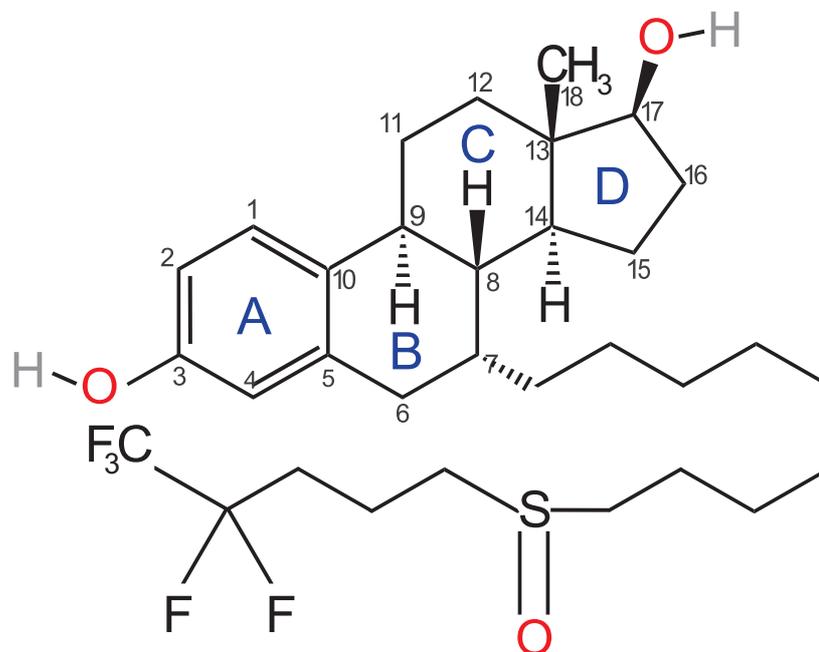


Abbildung 1.2: Strukturformel Fulvestrant (7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)Sulfinyl]Nonyl]-Estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol; C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S)

ER-abhängigen und -unabhängigen  $\beta$ E-Effekten (Grott et al., 2013; Heyer et al., 2005; Kim et al., 2006). Es konnte eine eigene neurotoxische Wirkung nachgewiesen werden, die möglicherweise auf die antiestrogene Wirkung und ER-Downregulation zurückzuführen ist. In weiblichen Ratten, die für eine Woche mit subkutanen Gaben des ER-Antagonisten Fu behandelt wurden, zeigte sich nach zweistündigem MCAo ein signifikant größeres Infarktareal im Striatum im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sawada et al., 2000).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, spielen mitochondriale Defekte eine zentrale Rolle in der Genese vieler Erkrankungen. Mitochondriale Encephalomyopathien sind nur ein Beispiel. Forschungsergebnisse liefern Hinweise auf mitochondriale Dysfunktionen bei neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer-Demenz, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose und amyotrophe Lateralsklerose. Die Forschung ist bestrebt pharmakologisch auf den Verlauf der Erkrankungen Einfluss zu nehmen und sie durch Prävention zu verhindern. Die Aktivität und Interaktion mitochondrialer K-Kanäle und der „permeability transition pore“ (PTP) scheinen ebenfalls am Mechanismus der Nekrose beziehungsweise der Apoptose Anteil zu haben.  $\beta$ E gilt als Neuroprotektivum und liegt im Fokus dieser Arbeit. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Nimmt  $\beta$ E Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung? Zur Untersuchung wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen an Rattenlebermitochondrien durchgeführt.
- Lassen sich Effekte von  $\beta$ E auf die Komplexe der Atmungskette nachweisen? Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip sollten diese Frage klären.
- Welche Wirkung hat  $\beta$ E auf den mtBK-Kanal? Mitoplasten aus Astrocytomzellen der Ratte wurden mit Hilfe von Einzelkanalanalysen mit der Patch-Clamp-Methode untersucht.
- Wird die Aktivität der PTP durch  $\beta$ E beeinflusst? Patch-Clamp-Experimente an Rattenlebermitochondrien wurden zur Klärung herangezogen.
- Sind die  $\beta$ E-Effekte rezeptorassoziiert? Durch den Einsatz des selektiven Estrogen-Rezeptoren-Antagonisten Fulvestrant sollte eine Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkung des  $\beta$ E untersucht werden.

- Wirkt  $\beta$ E an Mitochondrien und Ionenkanälen im Sinne einer Neuroprotektion?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen:

- *Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)*: Kaliumhydroxid (KOH), Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Saccharose, Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS), Kalium-Natrium-Tartat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ), Ethylendinitrilo-tetraessigsäure (EDTA), Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Kaliumchlorid (KCl), Natriumhydroxid (NaOH), Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- *PAA Laboratories (Pasching, Österreich)*: Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), Fetales Kälberserum (FCS), HBSS-Lösung (Hank's Balanced Salt Solution ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )
- *Roche Pharma (Grenzach, Deutschland)*: Streptomycin, Penicillin, Pyruvat, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form, NADH), Malat (Mal)
- *SERVA (Heidelberg, Deutschland)*: Succinat, Rinderserumalbumin (BSA)
- *Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)*: Cyclosporin A (CsA), Desoxycholat, Fulvestrant, Adenosin-5'-diphosphat (ADP), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 17- $\beta$ -Estradiol ( $\beta\text{E}$ ), Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-N,N, N',N'-tetraessigsäure (EGTA), L-Glutamat (Glu), 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Tylosin, Rotenon
- *Gibco by Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien)*: L-Glutamin
- *OROBOROS (Innsbruck, Österreich)*: Dithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )
- *GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)*: Agarose
- *Biochrom (Berlin, Deutschland)*: Trypsin
- *Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R.*: Ethanol

## 2.2 Medien und Pufferlösungen

### 2.2.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Tabelle 2.1: Bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen verwendete Lösungen und die Zusammensetzung

Saccharose-Medium	250 mM Saccharose; 10 mM HEPES; 1 $\mu$ M EGTA; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7.2
Hansson-Medium (Mansson et al., 2007)	125 mM KCl; 10 mM HEPES; 1 $\mu$ M EGTA; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7.2
Präparationslösung A	250 mM Saccharose; 10 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1 % RSA
Präparationslösung B	250 mM Saccharose; 10 mM HEPES, pH mit 5 mM KOH eingestellt

### 2.2.2 Patch Clamp

Tabelle 2.2: Beim Patchclamp verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

Isotone Lösung	150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH=7.2
$\text{CaCl}_2$ -Lösung	200 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 mM HEPES, pH=7.2
Isolationslösung	250 mM Saccharose, 5 mM HEPES, pH=7.2
Storage solution	150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH=7.2, pH mit 5 mM KOH eingestellt

## 2.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen

### 2.3.1 Präparation von Leberzellmitochondrien der Ratte

In den Experimenten zur Sauerstoffverbrauchsmessung und in der Patch-Clamp-Methode zur Untersuchung der PTP wurden Lebermitochondrien aus adulten Ratten verwendet, die unter Einhaltung der gesetzlichen Tierschutzbestimmungen präpariert wurden. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dislozierung der Halswirbelsäule mit anschließender Dekapitierung. Nach Entnahme der Leber und Transport auf Eis in Präparationslösung B wurde das Gewebe gereinigt, Gefäße und Bindege-

webe entfernt und das Lebergewebe zweimalig in Präparationslösung B gewaschen. Die zerkleinerte Leber wurde in Präparationslösung A homogenisiert und anschließend bei 800 *g* in der auf ca. 4 °C vorgekühlten Zentrifuge für 5 min zentrifugiert. Es folgte die Zentrifugation des durch Gaze gefilterten Überstandes bei 5100 *g* für 4 min. Das Pellet wurde in Präparationslösung B resuspendiert und anschließend in einem Homogenisator homogenisiert. Nach der Zentrifugation bei 12300 *g* für 2 min erfolgte die erneute Resuspension mit anschließender Zentrifugation unter gleichen Bedingungen für 10 min. Nach diesem Schritt enthielt das Pellet die gewünschte Konzentration an Lebermitochondrien und wurde in 1-1,5 ml Präparationslösung B aufgenommen. Die Suspension wurde kontinuierlich auf Eis gelagert und war so etwa 8 Stunden für Sauerstoffmessungen nutzbar. Die Präparationslösungen wurden teilweise mit 30  $\mu\text{M}$ /100  $\mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  oder 100  $\mu\text{M}$  Fu versetzt und wie gewohnt zur Präparation verwendet.

### 2.3.2 Eiweißbestimmung

Nach der Präparation wurde mit Hilfe eines Biuret-Schnelltests die Proteinkonzentration in der Suspension bestimmt. Hierfür war ein Ansatz von insgesamt 7 Reaktionsgefäßen notwendig. Die Zusammensetzung der einzelnen Röhren stellt Tabelle 2.3 dar. Nach Durchmischung mit Hilfe eines Vortexers erfolgte die Erhitzung im Thermocycler bei 95 °C für 4 min.

Tabelle 2.3: Biuret-Schnelltest zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Lebermitochondriensuspension, Zugaben in  $\mu\text{l}$

		Probe	Standard	Leerwert
Anzahl		3	3	1
Lösungen ( $\mu\text{l}$ )	Desoxycholat-Lsg. 3 %	250	250	250
	Biuret-Reagenz	750	750	750
	Aqua dest.	490	495	500
	Protein	10 $\mu\text{l}$ Probe 5 $\mu\text{l}$ Standard		

Im Anschluss erfolgte nach erneuter Durchmischung eine Extinktionsmessung bei 540 nm. Probe- und Standard-Extinktion wurden gegen den Leerwert gemessen. Die erhaltenen Werte für Probe und Standard wurden gemittelt und ins Verhältnis gesetzt. Gleichung (2.1) dient zur Errechnung der Proteinkonzentration in der Mitochondriensuspension. Das Einsatzvolumen sollte eine Proteinkonzentration von

500  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  nicht überschreiten.

$$\frac{200 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ Standard} \cdot \bar{P}}{2 \cdot \bar{S}} = \frac{\text{ml Probe}}{\text{ml Einsatzvolumen Mitos}} \quad (2.1)$$

$\bar{P}$  Mittelwert der Extinktion der Mitochondriensuspension

$\bar{S}$  Mittelwert der Extinktion der Standardlösung

### 2.3.3 Versuchsaufbau

Der Oxygraph (Fa. Oroboros, Innsbruck, Österreich) besteht aus zwei separaten Kammern, in denen mit Hilfe einer Clark-Elektrode der Sauerstoffgehalt in der Lösung gemessen werden kann. Über die in einer Elektrolytlösung befindlichen Elektroden ist eine Spannung angelegt, die bei Reduktion des Sauerstoffs zum Stromfluss führt. Dieser wiederum verhält sich direkt proportional zum Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in Suspension. Durch einen ebenfalls in der Kammer liegenden Magnetrührer wird die Suspension konstant durchmischt. Die Sensoren werden durch die angelegte Spannung unabhängig voneinander polarisiert. Ein A/D-Converter digitalisiert diese. Der tatsächliche Sauerstoffgehalt und seine erste Ableitung werden mit dem Programm DatLab 4.2 (Fa. Oroboros, Innsbruck, Österreich) am PC graphisch dargestellt. Die zwei separaten Kammern haben jeweils ein Fassungsvermögen von 2 ml und können einzeln mit Hilfe von „Hamilton“-Spritzen mit Testsubstanzen befüllt werden. Als Suspensionsmedium in den Kammern eignet sich sowohl Saccharose-Medium als auch KCl-Medium.

### 2.3.4 Kalibrierung der Sauerstoffelektroden

Vor Versuchsbeginn wurden der Oxygraph kalibriert und die Kurven der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauches durch Elektrodenpflege stabilisiert. Bei offenen Kammern strömte Sauerstoff aus der Raumluft in das Medium. Blieb die Sauerstoffkonzentration konstant, erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze Dithionit, ein kristallines Pulver mit stark reduzierender Wirkung, so dass der Sauerstoff aus den Kammern vollständig verbraucht wurde. Die Messung in Dithionit entsprach dem Nullwert. Die Kalibrierung wurde abgeschlossen, indem die Differenz zwischen der Messung in Sauerstoff und der Messung nach Dithionit-Zugabe als Sauerstoffgehalt des Mediums bei Raumtemperatur festgelegt wurde. Die Sauerstoffkonzentration bei 30 °C und einem Luftdruck von 101 kPa betrug 210-250  $\frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$  Medium.

### 2.3.5 Respiratorische Messungen

Der Versuchsablauf bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip (vgl. Abbildung 2.1):

Die Kammern wurden mit 2 ml Medium befüllt. Dieses wurde vorab auf 30 °C

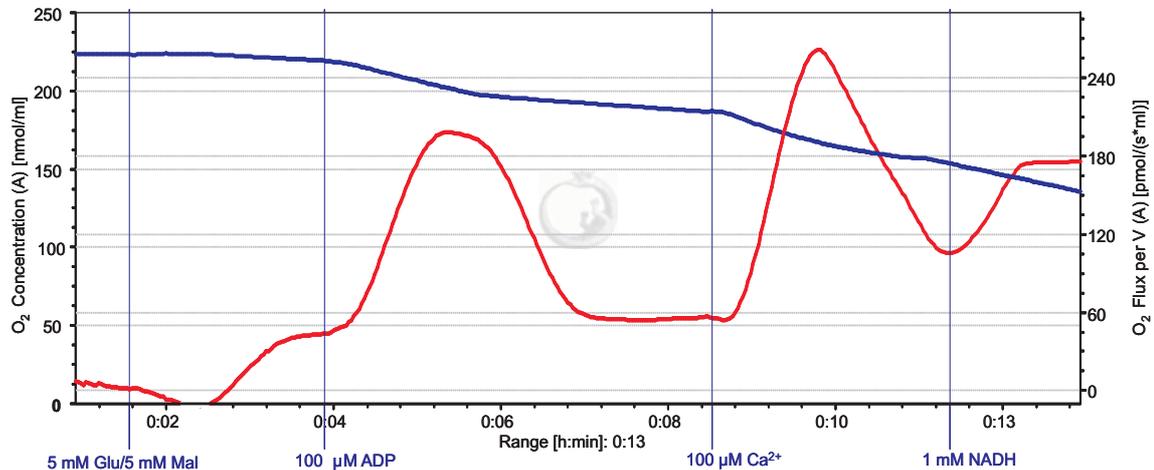


Abbildung 2.1: Sauerstoffverbrauchsmessungen von Lebermitochondrien in Saccharose-Medium ohne  $\beta$ E. Die blaue Kurve repräsentiert die Sauerstoffkonzentration in der Kammer. Die rote Kurve entspricht der ersten Ableitung der Sauerstoffkonzentration und somit die Änderung der Konzentration über die Zeit.

erwärmt und belüftet. Anschließend erfolgte die Zugabe der aus den Extinktionsmessungen berechneten Menge Mitochondriensuspension. Nach Verschließen der Kammern wurde das Erreichen einer konstanten Ruheatmung abgewartet (state 1). Je nach Versuchsreihe wurde dem System vor Substratzugabe  $\beta$ E hinzugefügt. Die Zugabe der Substrate Glutamat (Glu) und Malat (Mal) erfolgte in einer Endkonzentration von jeweils 5 mM. Es zeigte sich ein geringer Anstieg der Atmung. Nach Erreichen eines Plateaus wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 1 mM ADP zur maximalen Atmungsaktivität angeregt. Zeigte sich ein Plateau mit mindestens 3-fachem Anstieg des Fluxes, sprach dies für eine gute Qualität der Präparation.

In den folgenden Experimenten wurden eine Endkonzentration von 100  $\mu$ M ADP verwendet. Unter dieser Menge ADP zeigte sich ein schneller Anstieg der Atmung bis zum Maximum und ein fast ebenso schneller Rückgang. Nach 5 min wurde die Atmung durch Zugabe von 100  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  erneut stimuliert. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Mitochondrium und die Öffnung der PTP wurden initiiert. Die nachfolgende NADH-Gabe führte erneut zum Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Dies war durch den Einstrom des NADH über die nun offene PTP zu erklären. Die Zugabe des spe-

zifischen PTP-Inhibitors CsA zum Ende des Experimentes sollte Aufschluss über die Aktivität der PTP geben. Des Weiteren hemmt CsA den Ausstrom von Cytochrom c. Mit den während der Präparation mit  $\beta$ E und Fu vorbehandelten Mitochondrien wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren.

### 2.3.6 Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip

Die gewebespezifischen Atmungsraten isolierter Mitochondrien lassen sich mit Hilfe von Substraten und Inhibitoren der einzelnen Komplexe der Atmungskette detailliert untersuchen. Es sollte durch Sauerstoffverbrauchsmessungen und Anwendung des Substrat-Inhibitor-Prinzips eine quantitative Aussage über die Atmungsaktivität der Komplexe in Lebermitochondrien und der Einfluss von Testsubstanzen auf die Komplexe veranschaulicht werden.

Nach Erreichen des state 1 wurde allen Messansätzen 2 mM Mal und 10 mM Glu zugefügt (state 2). Die anschließende Zugabe von 100  $\mu$ M ADP führte zum kurzzeitigen, schnellen Anstieg der phosphorylierenden Atmung. Nach dem vollständigen Verbrauch des ADP stellte sich ein niedriges Atmungsniveau ein, welches den state 4 darstellt. Unter der Zugabe von 2 mM ADP wurde ein stationärer state 3 der Komplex I-abhängigen Substrate Mal und Glu erreicht (state  $3_{\text{mal/glu}}$ ). Die Zugabe von Pyruvat sollte klären, ob der Komplex I noch zusätzlich stimulierbar ist. Succinat (Succ) ist das Substrat der Komplex II-Atmung. Durch die sofortige Zugabe ließ sich die maximale state 3-Atmung der Komplex I- und Komplex II-abhängigen Substrate erreichen (state  $3_{\text{mal/glu/succ}}$ ), die lediglich durch die Komplexe III, IV und V der Atmungskette limitiert wird. Das Einbringen von Rotenon (Rot) in die Kammer hemmte den Komplex I, so dass eine Beurteilung der Komplex II-Atmung ermöglicht wurde.

### 2.3.7 Statistische Verfahren

Die statistische Analyse der gespeicherten Daten erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel. Um die einzelnen Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte der Konzentrationsänderung über mehrere Versuchsreihen gemittelt. Dafür wurden die größten Änderungen der  $\text{O}_2$ -Konzentration nach jeder Substanzzugabe aus den Kurven entnommen. Mit Hilfe eines zweiseitigen Studentst-T-Tests für abhängige Stichproben wurde die Signifikanz geprüft. War die Größe der Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0.05, so war das Stichprobenverhältnis signifikant verschieden. Bei  $p \leq 0.01$  galt es als hoch signifikant, bei  $p \leq 0.001$  als höchst

signifikant unterschiedlich. Die Darstellung erfolgte durch Sternchen (\*/\*\*/\*\*\* = signifikante/hoch signifikante/höchst signifikante Unterschiede in der Atmung). Anhand der Standardabweichung (SD) ließ sich die Güte der Experimente beurteilen. Die Streuung wurde durch den „standard error of the mean“ (SEM) veranschaulicht.

## 2.4 Patch Clamp Verfahren

### 2.4.1 Zellkulturen aus Astrocytomzellen

Im Lauf der Zeit zeigte sich, dass sich zur Beobachtung des mitochondrialen (mt)BK-Kanals am ehesten Mitochondrien aus Astrocyten eignen. Hierfür wurden Astrocytomzellen aus Rattenhirnen (U-87MG) entnommen und in DMEM-Medium kultiviert. Den Kulturflaschen wurden 10% FCS (foetales Kälberserum), 2 mM L-Glutamat, 100 U/ml Penicillin, 100  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Streptomycin und 10  $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Tylosin hinzu. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in Luft. Innerhalb von 3 Tagen war der Flaschenboden überwachsen und die Zellen konnten geerntet werden.

### 2.4.2 Präparation von Hirnmitochondrien aus Astrocytomzellen

Um eine ausreichende Menge Mitochondrien zu gewinnen, wurden 4-6 Flaschen verwendet, auf deren Boden die Astrocytomzellen nahezu zu Konfluenz gewachsen waren. Das Medium wurde abgegossen und der Flaschenboden zweimal vorsichtig mit 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zell-Scrapers vom Flaschenboden gelöst und der Inhalt aller Flaschen in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, um sie anschließend bei 800 *g* für 10 min zu zentrifugieren. Nach Resuspension des Pellets in 1 ml Isolationslösung und Homogenisierung in einem 2 ml Glashomogenisator folgte eine schnelle Zentrifugation bei 9200 *g* für 10 min zum Auswaschen von durch die Homogenisierung frei gewordenen Proteasen. Danach wurde das Pellet in 1 ml Isolationslösung resuspendiert. Mit Hilfe einer langsamen Zentrifugation bei 800 *g* für 10 min konnten die Mitochondrien von anderen Zellbestandteilen separiert werden. Die in der flüssigen Schicht enthaltenen Mitochondrien wurden sorgfältig von der festen Zellmasse am Grund des Eppendorfröhrchens abgesaugt und erneut bei 9200 *g* für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml „storage solution“ resuspendiert. Durch die letzte Zentrifugation soll die Saccharose, die in höherer Konzentration die Seal-Bildung bei der Patch-Clamp-

Technik stört, ausgewaschen werden. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

### 2.4.3 Aufbau des Versuchsstandes

Die empfindliche Anlage war auf einem pneumatischen Tisch gelagert, um mechanische Stöße und Gebäudeschwingungen vor allem zwischen 0.5 und 2 Hz zu dämpfen. Ein Faraday'scher Käfig schützte die Messeinheit vor elektrischen Störungen. Alle Geräte, die sich in der Nähe der Anlage befanden, waren geerdet. Das Signal des Patch-Clamp-Verstärkers wurde durch einen AD/DA-Converter digitalisiert und auf dem Computerbildschirm sichtbar gemacht. Zur besseren (rauscharmen) Darstellung und elektrischen Kontrolle dienten ein im Verstärker eingebauter Filter, ein Oszilloskop sowie ein manueller Impulsgenerator. Im Zentrum des Arbeitsplatzes befand sich ein inverses Mikroskop. Dieses war zur Kontrolle des Annäherns der Patch-Pipette an die in der Schale schwimmenden Mitoplasten (bei 400-facher Vergrößerung) notwendig, sowie zur Überwachung der Testlösungszugabe durch ein Flusssystem (bei 100-facher Vergrößerung). Das Flusssystem bestand aus einer peristaltischen Pumpe, Tygon-Schläuchen und den Abflussröhrchen. Die Umspülung des Patches mit Hilfe dieser sogenannten „sewer pipes“, die mit unterschiedlichen Testsubstanzen befüllt werden konnten und einzeln steuerbar waren, erlaubte die Modulation der in der Mitoplastenmembran befindlichen Ionenkanäle.

### 2.4.4 Herstellung und Befüllung der Glaspipetten

Zur Herstellung der Glaspipetten wurden Kapillaren der Firma Harvard Apparatus Ltd. (Edenbridge, UK) verwendet. Diese wurden im Voraus gründlich mit Ethanol gereinigt. Die Enden der Kapillaren waren abgerundet. Der Innendurchmesser betrug 0.86 mm, der Außendurchmesser 1.5 mm. Die Kapillaren wurden am Morgen eines jeden Versuchstages mittels eines vertikalen Pullers in zwei Arbeitsschritten gezogen. Die Form und der Durchmesser der Spitze waren entscheidende Kriterien. Die Größe der Öffnung ließ sich anhand der sogenannten „bubble number“ abschätzen. Über eine Spritze (10 ml) wurde ein positiver Druck auf die Pipette ausgeübt und die Pipette in Methanol eingetaucht. Sobald kleine Luftblasen an der Spitze der Pipette zu sehen waren, konnte die „bubble number“ der Patch-Pipette auf der Spritze abgelesen werden. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Annäherung wurden Pipetten mit einer „bubble number“ zwischen 4.5 und 5.5 verwendet, was einem Widerstand von etwa 10 bis 20 M $\Omega$  entsprach (Vogel & Safronov, 1999). Als Referenzelektroden wurden Agar-befüllte Kapillaren mit isotoner KCl-Lösung verwendet.

### 2.4.5 Versuchsablauf und Aufzeichnung des Patch-Clamp-Experimentes

Die hochkonzentrierte Mitochondriensuspension war für Messungen ungeeignet, so dass eine stark verdünnte Suspension in isotoner Lösung mit  $200 \mu\text{M Ca}^{2+}$  angefertigt wurde. Eine Petrischale als Untersuchungskammer wurde mit 2 ml hypotoner Lösung und  $1 \mu\text{l}$  der verdünnten Mitochondriensuspension befüllt. Nach ca. 40 Sekunden wurde mit 0.5 ml einer hypertonen Lösung aufgefüllt, so dass die sich bildenden Mitoplasten in 2.5 ml einer  $100 \mu\text{M}$  isotonen Lösung schwammen. Unter Überdruck wurde die Messpipette in die Lösung getaucht und mittels Schrittmotor einem geeigneten Mitoplasten angenähert. Nach Beseitigung des Überdrucks wurde der Mitoplast durch Kapillarkräfte angesaugt und es kam zum hochohmigen Kontakt der Membranen mit den Glaswänden der Pipettenspitze. Zumeist war es notwendig durch leichtes Saugen einen zusätzlichen Unterdruck an der Spitze zu erzeugen, um den Widerstand zu erhöhen. Werte zwischen  $800 \text{ M}\Omega$  und  $1.7 \text{ G}\Omega$  sind optimale Voraussetzungen für ein gutes Experiment. Etwa jeder dritte Patch erreichte einen Abdicht-Widerstand von mehr als  $500 \text{ M}\Omega$ . Die für die Einzelkanalableitung erwünschten mtBK-Kanäle ließen sich wiederum bei etwa jedem 10. Patch mit gutem Widerstand darstellen.

Die PTP ließ sich nur selten in Astrocytommitochondrien finden. Hierfür eigneten sich Lebermitochondrien, die auf die gleiche Weise präpariert wurden, wie für die Sauerstoffverbrauchsmessungen. Für die Einzelkanalableitungen der PTP wurde eine Verstärkung von  $20 \frac{\text{mV}}{\text{pA}}$  gewählt, für die des mtBK-Kanals wurde sie auf  $50 \frac{\text{mV}}{\text{pA}}$  erhöht.

Zur endgültigen Identifizierung eines Kanals dient die Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$ . Für den mtBK-Kanal wurde eine Leitfähigkeit von  $295 \text{ pS}$  bestimmt (Siemen et al., 1999). Die PTP-Leitfähigkeit liegt bei bis zu  $1.4 \text{ nS}$  (Loupatazsis et al., 2002). Das Ohmsche Gesetz ist Grundlage für die Anfertigung einer Strom-Spannungskurve, aus der  $\gamma$  als Steigung bestimmt werden kann. Mit Gleichung (2.2) lässt sich die Einzelkanalleitfähigkeit bei einem eingestellten Haltepotential und dem dabei gemessenen Strom berechnen.

$$\gamma = \frac{i}{E_H} \quad (2.2)$$

$\gamma$  Einzelkanalleitfähigkeit [S]

$i$  Stromamplitude [A]

$E_H$  Haltepotential [V]

Die Registrierungen der Kanalaktivität wurden in 1-minütigen Intervallen durch die Clampex Software (Axon-Instruments, Sunnyvale, CA, USA) aufgezeichnet. Eine ruhige Baseline für verwertbare Aufzeichnungen ließ sich meist bei einem  $E_H$  zwischen -20 und +20 mV erzielen. Alle Potentiale sind für die Membraninnenseite angegeben, Auswärtsströme zeigen immer aufwärts.

### 2.4.6 Analyse der Messergebnisse

Eine Art der Darstellung war die sogenannte „all-points“-Analyse. Hierbei wertete das Programm jeden einzelnen Punkt in Hinblick auf Amplitudenhöhe und Häufigkeit aus. Die Amplituden der Offen- und Geschlossenzustände waren normalverteilt und wurden als Histogramm visualisiert (Colquhoun & Sigworth, 1983). Im nächsten Schritt erfolgte die Anpassung einer gaußschen Verteilungskurve an das Histogramm (Loupatatzis et al., 2002). Die Fläche unter den Gipfeln der Kurve ( $A_n$ ) korreliert mit der Häufigkeit, die der Kanal bei dieser Amplitude verweilte. Die Gipfel lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Amplitudenhöhe ( $B_n$ ) den unterschiedlichen Amplituden der Offen- und Geschlossenzustände zuordnen. So lässt sich die Fläche der als offen gewerteten Ereignisse ins Verhältnis setzen zur Gesamtfläche in Bezug auf die maximale Kurvenamplitude und somit eine Aussage über die Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  treffen (siehe Gleichung (2.3a) und (2.3b)):

- Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  der PTP (Loupatatzis et al., 2002):

$$P_o = \frac{\sum_{k=1}^n (A_k \cdot B_k)}{(B_{max} - B_{min}) \cdot \sum_{k=0}^n A_k} \quad (2.3a)$$

- Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  des mtBK-Kanals:

$$P_o = \frac{\sum_{k=1}^n (k \cdot A_k)}{n \cdot \sum_{k=0}^n A_k} \quad (2.3b)$$

$A_0$  Fläche unter der Gauß-Kurve des geschlossenen Zustandes

$A_k$  Fläche unter der Gauß-Kurve des offenen Zustandes und der Unterzustände

$B_k$  Amplituden der verschiedenen Unterzustände

$B_{max}$  maximale Öffnungsamplitude

$B_{min}$  Geschlossenamplitude

$n$  Anzahl der Kanäle im Patch

Im sogenannten „single-channel“-Suchmodus der pClamp Software wurde die  $NP_o$  des mtBK-Kanals berechnet. Es wurden dabei auch registrierte Unterzustände berücksichtigt. Die Summe der in dem jeweiligen Unterzustand verbrachten Zeiten wurde zur Gesamtzeit ins Verhältnis gesetzt. Hierfür bestimmte das Programm eigenständig Offen- und Geschlossenzustände für mehrere Tausend Ereignisse. Dabei wurden nur Ereignisse berücksichtigt, die eine Mindestdauer von 0.5 ms, also dem doppelten der Abtastrate, erreichten. Ereignisse, deren Amplitude 50% der geöffneten Amplitude erreichten, wurden als Offenzustand des Kanals gewertet (Unterzustände eingeschlossen). Da zwischen dem voll geöffneten Zustand kleinere Verweilzustände existieren und auch die Möglichkeit besteht, dass sich mehrere Kanäle in einem Patch befinden, wurden wiederholt gemessene Amplituden als Grundlage für die unterschiedlichen Level verwendet, um die Experimente vergleichbar zu machen. Unterzustände mit einer Amplitude kleiner als 50% des ersten Offenzustandes wurden automatisch als Geschlossenzustand gezählt. Nach der Formel in Gleichung (2.4) wird die  $NP_o$  berechnet.

$$NP_o = \frac{1}{T} \sum_{j=1}^N jt_j \quad (2.4)$$

$N$  Anzahl aller Öffnungszustände (definiert als Übergang von Level  $j$  zu  $j+1$ )

$t_j$  In Level  $j$  eines Kanals verbrachte Zeit

$T$  Gesamtdauer der Aufnahme

Hieraus wurden die Verweildauern, die sogenannten „dwell times“, der unterschiedlichen Offenlevel (Level 1, Level 2, Level 3, Level 4, Level 5) und des Geschlossenzustandes (Level 0) errechnet. Eine Exponentialfunktion wurde mit ein bis zwei Zeitkonstanten den dwell-time-Histogrammen angepasst. Diese Zeitkonstanten (offen:  $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4, \tau_5$ ; geschlossen:  $\tau_0$ ) dienen der Beschreibung der einzelnen Öffnungs- bzw. Schließungseignisse unabhängig von der Dauer vorheriger Kanalzustände. Um den Einfluss der Testsubstanzen auf ihre Signifikanz hin zu prüfen, wurden die Offenwahrscheinlichkeiten durch einen zweiseitigen Students-T-Test für abhängige Stichproben miteinander verglichen. Die Fehlerbalken in den Abbildungen entsprechen den Standardabweichungen.

## 3 Ergebnisse

Durch Messungen des Sauerstoffverbrauchs mit Hilfe der hochauflösenden Respirometrie und Quantifizierung der Ionenströme über die innere Membran durch Einzelkanalableitungen mit der Patch-Clamp Technik wird versucht die Fragestellungen (siehe Abschnitt 1.6) zu beantworten.

### 3.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen an Rattenlebermitochondrien unter Einfluss von 17- $\beta$ -Estradiol

#### 3.1.1 $\beta$ E-Zugabe während der Messungen

Für diese Experimente wurde  $\beta$ E zugegeben (Anzahl der Versuche: n=32), sobald sich bei geschlossenen Kammern konstante Respiration einstellte. Versuche ohne  $\beta$ E-Zugabe (n=50) dienten als Kontrolle.

In der Mehrzahl aller Versuche zeigte sich eine Zunahme der Ruheatmung nach  $\beta$ E-Zugabe, die für alle getesteten Konzentrationen signifikant ( $p \leq 0.05$ ) war. Nach Zugabe der Substrate Glu (5 mM) und Mal (5 mM) zeigte sich ebenfalls häufig eine Zunahme der Atmung. Die Zunahme der Substratatmung war nur bei  $\beta$ E-Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M signifikant (n=7,  $p \leq 0.05$ ). Es folgte die Zugabe von 100  $\mu$ M ADP um ein Maximum der phosphorylierenden Atmung zu erreichen. Unter Einfluss einer hohen  $\beta$ E-Konzentration von 30  $\mu$ M zeigte sich eine stark reduzierte Atmung und ein massiv verbreiteter Peak (n=6,  $p \leq 0.05$  für n=2,  $p \leq 0.01$  für n=4). Die ADP-Zugabe führte an jeweils einem Versuchstag mit 1  $\mu$ M und einem mit 10  $\mu$ M zu signifikant erniedrigten Atmungsaktivitäten.

Die nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe diente der Öffnung der PTP. Dies führte in den Kontrollversuchen zu verstärkter Atmung. Die Antwort auf das zugegebene  $\text{Ca}^{2+}$  in den Experimenten mit  $\beta$ E war sehr viel geringer ausgeprägt. Während sich bei niedrigen Konzentrationen von 1  $\mu$ M  $\beta$ E lediglich eine Tendenz zu verringerter Atmungsaktivität (n=6,  $p \leq 0.05$  für n=1) zeigte, war die Abnahme unter Konzentra-

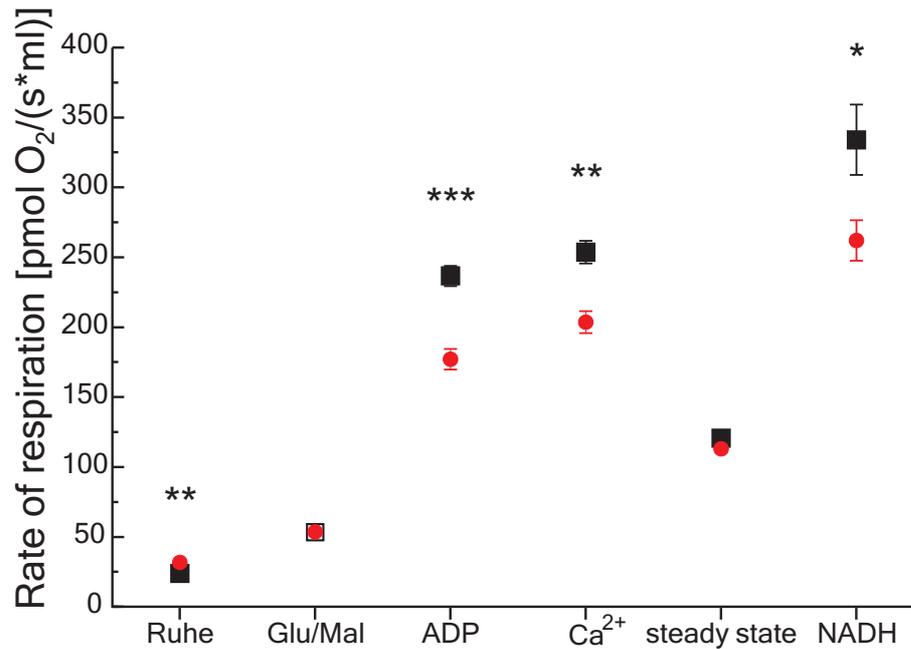


Abbildung 3.1: Darstellung der veränderten Respiration unter  $\beta$ E-Einfluss. Aufgetragen sind die MW der Atmung und deren SEM aus 5 Versuchen eines repräsentativen Experimentes: Schwarze Quadrate: Kontrolle; rote Kreise: 30  $\mu$ M  $\beta$ E. \*: Signifikanz. Ruheatmung, 5 mM Glu und 5 mM Mal, 100  $\mu$ M ADP, 100  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM NADH. Saccharose-Medium. Ruheatmung mit  $\beta$ E vermehrt, Atmung eingeschränkt nach ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  und NADH.

tionen  $\geq 10 \mu\text{M}$  bei  $n=2$  signifikant ( $p \leq 0.05$ ), für  $n=4$  hochsignifikant ( $p \leq 0.01$ ) und in 3 Versuchen höchstsignifikant ( $p \leq 0.001$ ). Nach einer Wartezeit von etwa 5 min gleichen sich die Atmungsaktivitäten beider Versuchsreihen unabhängig von der Ausgangsatmung wieder an (steady state). Die nachfolgende Zugabe von NADH sollte aufgrund der durch das  $\text{Ca}^{2+}$  geöffneten PTP erneut zum Anstieg der Atmungsaktivität führen. Unter höheren  $\beta$ E-Konzentrationen war die NADH-Antwort weniger ausgeprägt ( $n=7$ ,  $p \leq 0.05$  für  $n=4$ ,  $p \leq 0.001$  für  $n=2$ ). In Abbildung 3.1 wurde der veränderte Sauerstoffverbrauch unter  $\beta$ E-Einfluss in repräsentativen Versuchen in einem Diagramm veranschaulicht.

### 3.1.2 $\beta$ E-Zugabe während der Präparation

Um zu testen, ob  $\beta$ E nur direkt am Mitochondrium wirkt oder ob seine Wirkung durch Prozessierung an der Plasmamembran oder im Cytosol moduliert wird, wurde an 5 Versuchstagen ein Teil der entnommenen Rattenlebern zu verschiedenen Zeitpunkten während der Präparation mit  $\beta$ E gewaschen. Nach der Präparation wurde

mit den Mitochondrien auf die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene Art verfahren. An vier Tagen wurde die Atmung mit unbehandelten Mitochondrien verglichen. In 8 Versuchen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Ruheatmung ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 4$ ;  $p \leq 0.01$ ,  $n = 4$ ), sowie der Atmung nach Substratzugabe ( $p \leq 0.01$ ,  $n = 8$ ). Die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  führte unter Einfluss von  $\beta\text{E}$  zu einem signifikant geringeren Atmungsanstieg ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 4$  für  $1 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$ ;  $p \leq 0.01$ ,  $n = 4$  für  $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$ ). Die ADP-Atmung war unter Einwirkung von  $1 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  tendenziell erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Nach Behandlung mit hohen  $\beta\text{E}$ -Konzentrationen ( $30 \mu\text{M}$ ) war an einem der zwei Tage eine starke Reduktion der ADP-Antwort zu erkennen ( $p \leq 0.01$ ;  $n = 4$ ). Der zuvor gezeigte hemmende Effekt des  $\beta\text{E}$  auf die NADH-Atmung war an zwei Versuchstagen ebenfalls nachweisbar, jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend ließ sich nach Behandlung des Lebergewebes mit  $\beta\text{E}$  während der Präparation ( $1 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ ) bei tendenziell erhöhter Ruheaktivität und Substrat-atmung eine Hemmung der Atmungsaktivität nach Zugabe von ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  und NADH aufzeigen. Eine zusätzliche Gabe von  $\beta\text{E}$  während des Experimentes führte zu einer zusätzlichen Hemmung der Atmungsaktivität der schon mit  $\beta\text{E}$  präparierten Mitochondrien.

### 3.1.3 Persistieren des $\beta\text{E}$ -Effekts und Irreversibilität

Die Lebensdauer der präparierten Mitochondrien ist begrenzt. Nach vier bis sechs Stunden sieht man eine Abnahme der Atmungsaktivität unter unveränderten Voraussetzungen. Bei der Wiederholung der Experimente mit Mitochondrien mit und ohne  $\beta\text{E}$ -Präparation zum Ende eines Versuchstages ließ sich auch nach 6 Stunden der hemmende Effekt des  $\beta\text{E}$  nachweisen. In dieser Zeit ist der Einfluss von  $\beta\text{E}$  auf die Atmung irreversibel (siehe Abb. 3.2).

### 3.1.4 Einfluss von Fulvestrant auf die mitochondriale Atmung

Durch den Einsatz des selektiven  $\beta\text{E}$ -Rezeptorblockers Fulvestrant (Fu) sollte geklärt werden, ob der  $\beta\text{E}$ -Effekt rezeptorgebunden ist. Dazu wurde der Effekt von Fu an vier Tagen in Versuchen mit variiertem Aufbau dargestellt ( $n = 25$ ). Eine zusätzliche Gabe von  $100 \mu\text{M}$  Fu nach Erreichen einer konstanten Ruheatmung und nachfolgend  $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  führte im Vergleich zur alleinigen Gabe von  $\beta\text{E}$  zu einem nicht signifikanten Anstieg der Ruheatmung, signifikantem Anstieg der Substrat-atmung ( $n = 7$ ;  $p \leq 0.05$  für  $n = 4$ ) und Abnahme der Atmungsaktivität nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Gabe ( $n = 7$ ,  $p \leq 0.05$  für  $n = 4$ ).

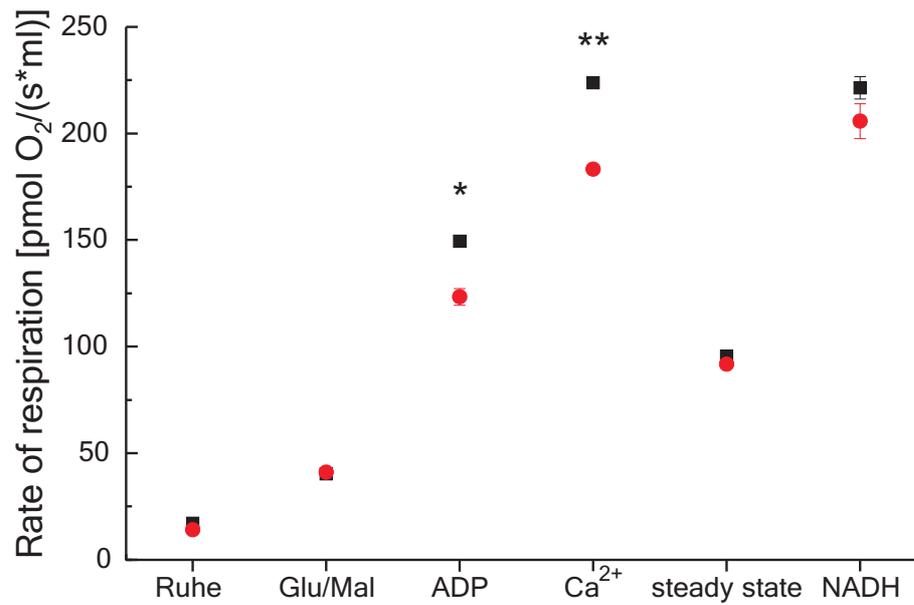


Abbildung 3.2: In 6 Stunden keine Rückbildung der eingeschränkten Respiration nach Präparation mit 30  $\mu\text{M}$   $\beta\text{E}$ . MW  $\pm$  SEM, n=2: Schwarze Vierecke: Kontrolle; rote Kreise: 30  $\mu\text{M}$   $\beta\text{E}$ . Ruheatmung, 5 mM Glu und 5 mM Mal, 100  $\mu\text{M}$  ADP, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM NADH. KCl-Medium.

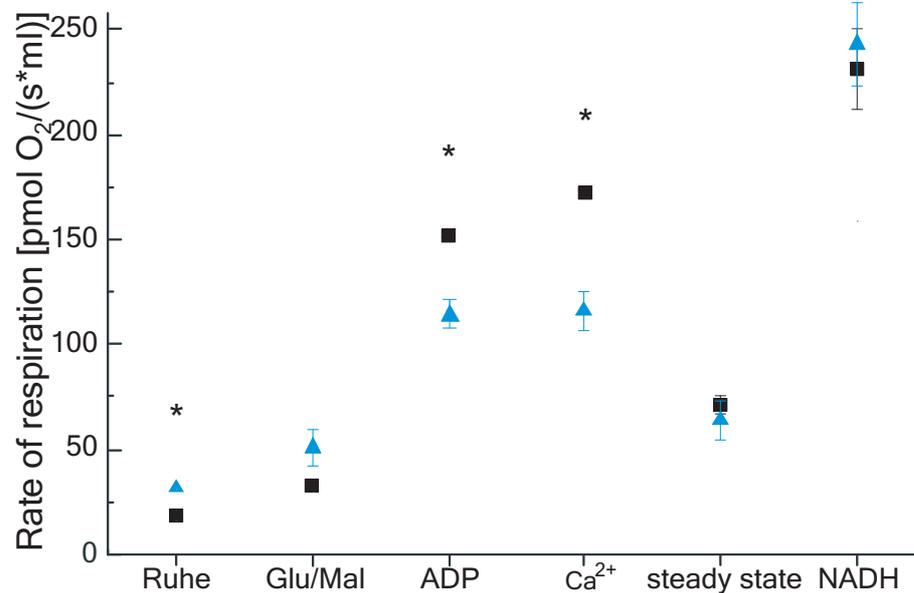


Abbildung 3.3: Respiration unter Fu-Einfluss. MW  $\pm$  SEM, n=2: Schwarze Vierecke: Kontrolle; blaue Dreiecke: 100  $\mu\text{M}$  Fu. Ruheatmung, 5 mM Glu und 5 mM Mal, 100  $\mu\text{M}$  ADP, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mM NADH. Saccharose-Medium. Ruheatmung mit Fu vermehrt, eingeschränkt nach ADP und  $\text{Ca}^{2+}$ .

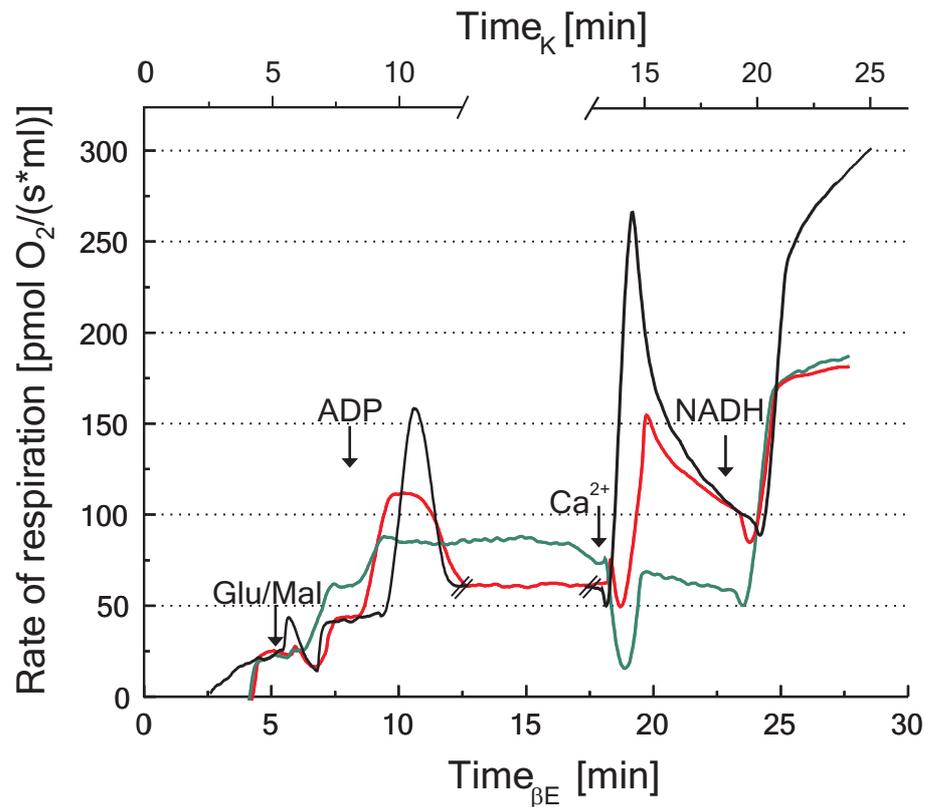


Abbildung 3.4: Dargestellt sind die Kurvenverläufe repräsentativer Sauerstoffverbrauchsmessungen ohne Testsubstanz (schwarz), mit Zugabe von  $30 \mu\text{M } \beta\text{E}$  (rot) und mit Zugabe von  $100 \mu\text{M Fu}$  und  $30 \mu\text{M } \beta\text{E}$  (grün). Die obere Zeitachse entspricht dem Zeitverlauf der Kontrollkurve, die untere Zeitachse dem der Testkurven. Alleinige Zugabe von  $\beta\text{E}$  führte zu eingeschränkter Atmungsaktivität, Anstieg der Substratatmung und Einschränkung der ADP-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und NADH-Atmung bei gleichzeitiger Applikation von  $\beta\text{E}$  und Fu.

Um zu klären, ob den Veränderungen ein unabhängiger Effekt des Fu auf die Atmungskettenenzyme zugrunde lag, wurde nach Erreichen der Ruheatmung Fu allein zugegeben. Dies führte zu hochsignifikanten Veränderungen der Atmung mit Anstieg der Ruheatmung und Reduktion der NADH-Atmung ( $n=4$ ,  $p \leq 0.01$  für  $n=2$ ), sowie signifikanten Abnahme der ADP-Antwort und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gipfels ( $n=4$ ,  $p \leq 0.05$  für  $n=2$ ). Die Mittelwerte aus 2 Versuchen sind in Abb. 3.3 dargestellt.

In den folgenden Experimenten wurde die Präparationslösung mit  $100 \mu\text{M Fu}$  versetzt und ein Teil des Lebergewebes mit Fu präpariert. Die Mitochondrien zeigten in 4 Versuchen im Vergleich mit unbehandelten eine signifikant verringerte Ruheaktivität und ADP-Antwort. Die Atmung nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe war hochsignifikant reduziert. Fügte man den mit Fu präparierten Mitochondrien während der Messung  $\beta\text{E}$  hinzu, führte dies zu den in Unterabschnitt 3.1.1 beschriebenen Effekten des  $\beta\text{E}$

mit Zunahme der Ruhe- und Substratatmung ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$  für  $n=4$ ), Reduktion von ADP- ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$  für  $n=6$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Atmung ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$  für  $n=4$ ) und einer nicht signifikanten Abnahme der NADH-Atmung. Die Hemmung der  $\beta\text{E}$ -Wirkung auf die Atmungsenzyme durch Rezeptorblockade ist somit unwahrscheinlich. Abbildung 3.4 zeigt den deutlich veränderten Kurvenverlauf der Respirationsmessung unter Fu bzw. unter Fu und  $\beta\text{E}$  über die Zeit.

### 3.1.5 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von $\beta\text{E}$

Um die Abhängigkeit des  $\beta\text{E}$ -Effekts von der Konzentration auf die mitochondriale Atmung zu beschreiben, wurden die Daten auf den Kontrollwert normiert. Es wurde die Wirkung von  $0 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  ( $n=14$ ),  $1 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  ( $n=5$ ),  $10 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  ( $n=4$ ) und  $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  ( $n=8$ ) auf die Änderung der Atmungsgeschwindigkeit getestet. Die Experimente wurden alle in gleicher Anordnung durchgeführt. Die Zugabe von  $1 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  führte zur signifikanten Steigerung der Ruheatmung und der Substratatmung, sowie einer signifikanten Abnahme der ADP-Atmung. Bei hoher Konzentration ( $30 \mu\text{M}$ ) war die Ruheatmung weiterhin signifikant erhöht, jedoch schien der Effekt mit steigender Konzentration abzunehmen. Auch die gegenüber der Kontrollatmung verstärkte Substratatmung nahm unter höheren  $\beta\text{E}$ -Konzentrationen tendenziell ab.  $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$

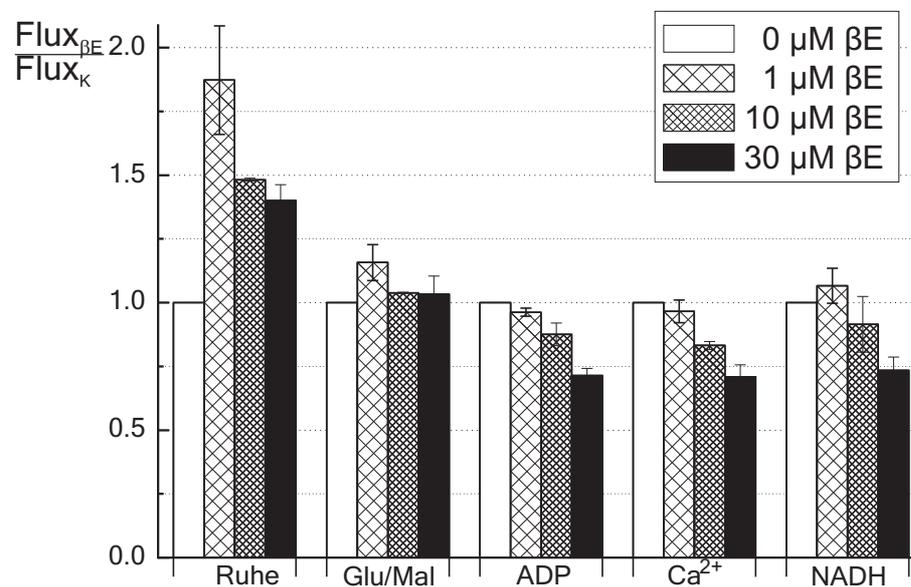


Abbildung 3.5: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der  $\beta\text{E}$ -Konzentration und der mitochondrialen Atmung. Höhere Konzentrationen hatten hemmenden Einfluss auf die ADP-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und NADH-Atmung. Getestet wurden 4 Konzentrationen ( $0 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ ). Es wurde auf die Kontrollatmung bei  $0 \mu\text{M}$  normiert.

fürten zu einer drastischen, hoch- bis höchstsignifikanten Reduktion der Atmung nach ADP-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und NADH-Zugabe (siehe Abb. 3.5).

Zusammenfassend führt die stufenweise Erhöhung der  $\beta\text{E}$ -Konzentration zur kontinuierlichen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs. Bei der Hemmung der ADP-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und NADH-Atmung ließ sich ein deutlicher Konzentrations-Wirkungs-Effekt feststellen. Offensichtlich sind höhere Konzentrationen notwendig, um die oxidative Phosphorylierung von Leberzellmitochondrien zu hemmen.

## 3.2 Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip

Die Substratverwertung in der mitochondrialen Atmungskette variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Geweben. Ebenso verhält es sich mit der Ausschöpfung der Kapazität der einzelnen Atmungskettenkomplexe. Wie in den Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden Lebermitochondrien für die Messungen verwendet. Nach kurzer Inkubation der Mitochondrien in Saccharose-Medium bei offenen Kammern wurden 2 mM Mal appliziert und die Kammer verschlossen.  $\beta\text{E}$  wurde während der Inkubationsphase hinzugegeben. Nach Erreichen konstanter Ruheatmung (state 1<sub>mal</sub>) wurden 10 mM Glu als Komplex I-Substrat appliziert. Um die einzelnen Experimente untereinander vergleichbar zu machen, wurde auf die Werte der Messungen ohne  $\beta\text{E}$  normiert.

### 3.2.1 Einfluss von $\beta\text{E}$ auf den Komplex I

Die Ruheatmung unter  $\beta\text{E}$  war durchschnittlich um 14% erhöht ( $n=17$ , state 1 <sub>$\beta\text{E}$ (mal)</sub> =  $114 \pm 25\%$ ,  $p=0.04$ ). Die Atmung nach Mal und Glu (state 2) stieg im Durchschnitt um 10% ( $n=17$ , state 2 <sub>$\beta\text{E}$</sub>  =  $110 \pm 12\%$ ,  $p=0.01$ ).

Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  ADP führte zu einem steilen Anstieg der Atmungskurve. Da es sich dabei um eine geringe ADP-Menge handelte, war die Atmung nicht voll aktiviert und sank mit dem Verbrauch des ADP auf die nicht phosphorylierende Restaktivität, dem state 4. Während der Atmungsanstieg unter  $\beta\text{E}$ -Wirkung nach der ADP-Zugabe nur etwa  $\frac{3}{4}$  der Ursprungshöhe erreichte ( $n=17$ ,  $\text{ADP}_{1(\beta\text{E})} = 71 \pm 7.9\%$ ,  $p=1 \cdot 10^{-10}$ ), blieb der state 4 unbeeinflusst ( $n=17$ , state 4 <sub>$\beta\text{E}$</sub>  =  $96 \pm 13\%$ ,  $p=0.38$ ).

Die Gabe von 2 mM ADP führte zum Erreichen des state 3<sub>mal/glu</sub> unter der Annahme, dass Glu und Mal optimal verwertet wurden. Der state 3<sub>mal/glu</sub> unter  $\beta\text{E}$  war in allen Experimenten stark erniedrigt. Diese Maximalatmung unter Verbrauch von

Glu und Mal erreichte im Durchschnitt nur  $\frac{2}{3}$  der Kontrollatmung ( $n=17$ ,  $3_{\beta E(\text{mal}/\text{glu})}=60 \pm 17\%$ ,  $p=1.3 \cdot 10^{-7}$ ). In Einzelfällen kam es sogar zu einer Abnahme der Atmungsaktivität, vermutlich weil die vorherige ADP-Menge noch nicht vollständig verbraucht war. Dies könnte auch der Grund für die mit nur 22% der Kontrollaktivität stark eingeschränkte Atmung im Experiment VI gewesen sein. Die Ergebnisse der Experimente werden in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Einfluss von  $\beta E$  auf die mitochondriale Atmung mit Malat und Glutamat, n: Anzahl der Einzelversuche pro Experiment.  $ADP_1$ : Atmung nach Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  ADP;  $state 4_{\text{mal}/\text{glu}}$ : state 4-Atmung nach ADP-Verbrauch;  $state 3_{\text{mal}/\text{glu}}$ : state 3-Atmung nach Zugabe von 2 mM ADP. Sauerstoffänderung pro Volumen in  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{ml}} \pm \text{SD}$ ; [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollversuchen ohne  $\beta E$  (100%); \*=Änderung zur Kontrolle signifikant ( $p \leq 0.05$ ); \*\*= Änderung zur Kontrolle hoch signifikant ( $p \leq 0.01$ )

Experiment	Versuch	n	$ADP_1$	[%]	$state 4_{\text{mal}/\text{glu}}$	[%]	$state 3_{\text{mal}/\text{glu}}$	[%]
Exp I	ohne $\beta E$	2	$131.38 \pm 4.88$	[100]	$48.61 \pm 0.97$	[100]	$140.08 \pm 1.89$	[100]
	mit $\beta E$	2	$81.92 \pm 4.23^*$	[62]	45,68	[94]	88,43	[63]
Exp II	ohne $\beta E$	3	$157.51 \pm 17.25$	[100]	$41.58 \pm 1.17$	[100]	$154.47 \pm 22.07$	[100]
	mit $\beta E$	1	107,99	[69]	51,09	[123]	98,02	[63]
Exp III	ohne $\beta E$	2	$137.57 \pm 13.03$	100	$68.11 \pm 2.96$	100	$134.83 \pm 18.24$	[100]
	mit $\beta E$	2	$94.14 \pm 4.86^*$	[68]	$61.47 \pm 3.76$	[90]	$56.59 \pm 29.77$	[42]
Exp IV	ohne $\beta E$	1	146,73	[100]	74,98	[100]	143,38	[100]
	mit $\beta E$	1	93,39	[64]	54,31	[72]	31,91	[22]
Exp V	ohne $\beta E$	3	$170.99 \pm 21.11$	[100]	$62.52 \pm 5.47$	[100]	174,86	[100]
	mit $\beta E$	2	$105.31 \pm 9.46^*$	[62]	$57.67 \pm 7.21$	[92]	117,09	[67]
Exp VI	ohne $\beta E$	3	$131.24 \pm 6.57$	[100]	$48.26 \pm 3.12$	[100]	$146.23 \pm 11.86$	[100]
	mit $\beta E$	2	$89.91 \pm 2.99^{**}$	[69]	$49.76 \pm 0.14$	[103]	$94.43 \pm 5.67^{**}$	[65]
Exp VII	ohne $\beta E$	1	91,57	100	46,98	[100]	113,8297	[100]
	mit $\beta E$	1	79,01	[86]	45,77	[97]	76,9393	[68]
Exp VIII	ohne $\beta E$	1	121,02	[100]	49,08	[100]	182,32	[100]
	mit $\beta E$	1	88,94	[73]	43,74	[89]	111,58	[61]
Exp IX	ohne $\beta E$	1	114,91	[100]	46,38	[100]	161,41	[100]
	mit $\beta E$	1	84,82	[74]	50,54	[109]	77,03	[48]
Exp X	ohne $\beta E$	2	$165.70 \pm 27.87$	[100]	67,88	[100]	$179.73 \pm 7.81$	[100]
	mit $\beta E$	2	$137.37 \pm 3.14$	[83]	$70.7 \pm 1.20$	[104]	$155.11 \pm 8.98^*$	[86]
Exp XI	ohne $\beta E$	2	175,94	[100]	80,99	[100]	$201.29 \pm 9.01$	[100]
	mit $\beta E$	2	128,62	[73]	70,34	[87]	$141.55 \pm 7.05^*$	[70]

Errechnete man den Quotienten der Sauerstoffänderungen aus state 3 und state 4, so erhielt man den sogenannten respiratorischen Kontrollindex (RCI), der als Maß für die Kopplung zwischen Atmung und oxidativer Phosphorylierung dient.

Ein erniedrigter RCI ist Ausdruck einer Dysfunktion innerhalb der Atmungskette. Bei einer Schädigung des Protonentransportes resultiert eine eingeschränkte ATP-Synthese. Der gemittelte  $RCI_{mal/glu}$  in den Kontrollexperimenten betrug  $2.9 \pm 0.65$  (n=18). Mit durchschnittlich  $1.68 \pm 0.65$  ist der  $RCI_{\beta E(mal/glu)}$  unter  $\beta E$ -Einfluss sehr viel kleiner (n=15,  $p = 7.4 \cdot 10^{-6}$ ; Vergleich Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Einfluss von  $\beta E$  auf die mitochondriale Atmung mit Pyruvat und Succinat, n: Anzahl der Einzelversuche pro Experiment. Pyr: Verhältnis state 3<sub>mal/glu/pyr</sub>-Atmung zu state 3<sub>mal/glu</sub>-Atmung;  $RCI_{mal/glu}$ : Respiratorischer Kontrollindex; state 3<sub>mal/glu/succ</sub>: state 3-Atmung nach Zugabe von Glu, Mal und 10 mM Succ. Sauerstoffänderung pro Volumen in  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{ml}} \pm \text{SD}$ ; [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollversuchen ohne  $\beta E$  (100%); \*=Änderung zur Kontrolle signifikant ( $p \leq 0.05$ ); \*\*= Änderung zur Kontrolle hoch signifikant ( $p \leq 0.01$ )

Experiment	Versuch	n	Pyr	[%]	$RCI_{mal/glu}$	[%]	state3 <sub>mal/glu/succ</sub>	[%]
Exp I	ohne $\beta E$	2	$0.95 \pm 0.05$	[100]	$2.88 \pm 0.10$	[100]		
	mit $\beta E$	2	0,77	[81]	1,94	[67]		
Exp II	ohne $\beta E$	3	$0.96 \pm 0.03$	[100]	$3.72 \pm 0.6$	[100]	$275.08 \pm 20$	[100]
	mit $\beta E$	1	0,93	[97]	1,92	[52]	211,14	[77]
Exp III	ohne $\beta E$	2			$1.98 \pm 0.18$	[100]		
	mit $\beta E$	2			$0.61 \pm 0.35^*$	[31]		
Exp IV	ohne $\beta E$	1			1,91	[100]		
	mit $\beta E$	1			0,34	[18]		
Exp V	ohne $\beta E$	3	$0.97 \pm 0.02$	[100]	$2.81 \pm 0.27$	[100]	$249.37 \pm 42.03$	[100]
	mit $\beta E$	2	$0.96 \pm 0.00$	[99]	$2.03 \pm 0.03$	[72]	$225.21 \pm 23.71$	[90]
Exp VI	ohne $\beta E$	3	$0.97 \pm 0.02$	[100]	$3.03 \pm 0.16$	[100]	$206.32 \pm 10.62$	[100]
	mit $\beta E$	2	$0.95 \pm 0.03$	[98]	$1.90 \pm 0.12^{**}$	[63]	$184.46 \pm 11.61$	[89]
Exp VII	ohne $\beta E$	1	0,99	[100]	2,42	[100]		
	mit $\beta E$	1	0,85	[86]	1,68	[69]		
Exp VIII	ohne $\beta E$	1			3,71	[100]		
	mit $\beta E$	1			2,55	[69]		
Exp IX	ohne $\beta E$	1			3,48	[100]		
	mit $\beta E$	1			1,52	[44]		
Exp X	ohne $\beta E$	2			2,75	[100]	$263.24 \pm 1.79$	[100]
	mit $\beta E$	2			$2.13 \pm 0.11$	[78]	$287.74 \pm 21.02$	[109]
Exp XI	ohne $\beta E$	2			2,41	[100]	282,78	[100]
	mit $\beta E$	2			1,94	[81]	253,37	[90]

Ein weiteres Komplex I-Substrat ist Pyruvat (Pyr). Je nach Ursprung der Mitochondrien wird Pyruvat unterschiedlich stark veratmet. In einigen Experimenten wurden nach Erreichen des state 3<sub>mal/glu</sub> 10 mM Pyruvat in die Kammern gege-

ben. state  $3_{\text{mal/glu/pyr}}$  war nicht größer als state  $3_{\text{mal/glu}}$ . Es kam sogar zu einer geringfügigen Abnahme der Atmung. So betrug die Differenz in der Kontrolle im Mittel  $3 \pm 1\%$ , während sie in den Versuchen mit  $\beta\text{E}$  bei  $11 \pm 9\%$  lag ( $n=5$ ;  $p=0.22$ ). Pyruvat wurde somit nur sehr schlecht oxidiert oder hemmte sogar die Atmung. Einzeldaten sind der Tab.3.2 zu entnehmen.

### 3.2.2 Einfluss von $\beta\text{E}$ auf den Komplex II

Die Zugabe von Succinat (Succ) aktiviert zusätzlich den Komplex II, so dass die maximale Respiration der Komplexe I und II erreicht werden kann. Sind beide Komplexe aktiviert, ist die daraus resultierende Maximalatmung kleiner als die Summe der Einzelumsatzraten. Daraus folgt, dass bei Schädigung des Komplex I ein intakter Komplex II das Defizit bis zu einem gewissen Grad der Schädigung ausgleichen kann. Im Experiment II erreichte der state  $3_{\beta\text{E}(\text{mal/glu/succ})}$  nach Zugabe von  $\beta\text{E}$  nur 77% des state  $3_{\text{mal/glu/succ}}$  der Kontrollversuche. In den Experimenten V, VI und XI wurden 89 bis 90% der Kontrollwerte erreicht. Lediglich im Experiment X kam es unter  $\beta\text{E}$  zu einem überdurchschnittlichen Anstieg der Atmung nach der Succ-Gabe. Der state  $3_{\beta\text{E}(\text{mal/glu/succ})}$  erreichte eine relative Zunahme von 109% der Kontrollwerte. Somit lässt sich eine eindeutige Tendenz erkennen, jedoch ohne Signifikanz (siehe Tabelle3.2). Um eine klare Aussage über die Aktivität des Komplexes II machen zu können, wurde den Messkammern nach Erreichen des state  $3_{\text{mal/glu}}$  1.5  $\mu\text{M}$  Rotenon (Rot), ein spezifischer Komplex I-Inhibitor, hinzugefügt. Es induzierte ein abruptes Absinken der Atmungskurve. Die nachfolgend erfassten Atmungswerte erreichten nie einen Nullpunkt. Diese rotenoninsensitive Restatmung beruht auf einem extramitochondrialen, nicht enzymatischen Sauerstoffverbrauch. Auch ein Protonenrückfluss von der Innenmembran in den Matrixraum durch Entkopplung oder die Öffnung der PTP könnte ursächlich dafür sein.

In den Kontrollexperimenten sanken die Atmungswerte nach der Rotenon-Gabe auf ein Niveau, der dem state  $1_{\text{mal}}$  sehr nahe kam. Im Gegensatz dazu zeigten die Versuche mit  $\beta\text{E}$  eine im Vergleich zu den Kontrollen auf 43% bis 86% verringerte Atmung nach Rotenon ( $n=10$ ;  $\text{Rot}_{\beta\text{E}(\text{mal/glu})}=71 \pm 23.6\%$ ;  $p=0.004$ ). Lediglich im Experiment X war die Rotenon-Atmung um 12% erhöht. Dabei handelt es sich um jenes Experiment, in dem auch schon der state  $3_{\beta\text{E}(\text{mal/glu/succ})}$  im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Atmung aufwies. Möglicherweise ist es aufgrund der stark hydrophoben Struktureigenschaften beim Injizieren in die Kammern zum Ausfallen des  $\beta\text{E}$  gekommen.

Nachdem der Komplex I unter dem Einfluss von Rotenon vollständig blockiert

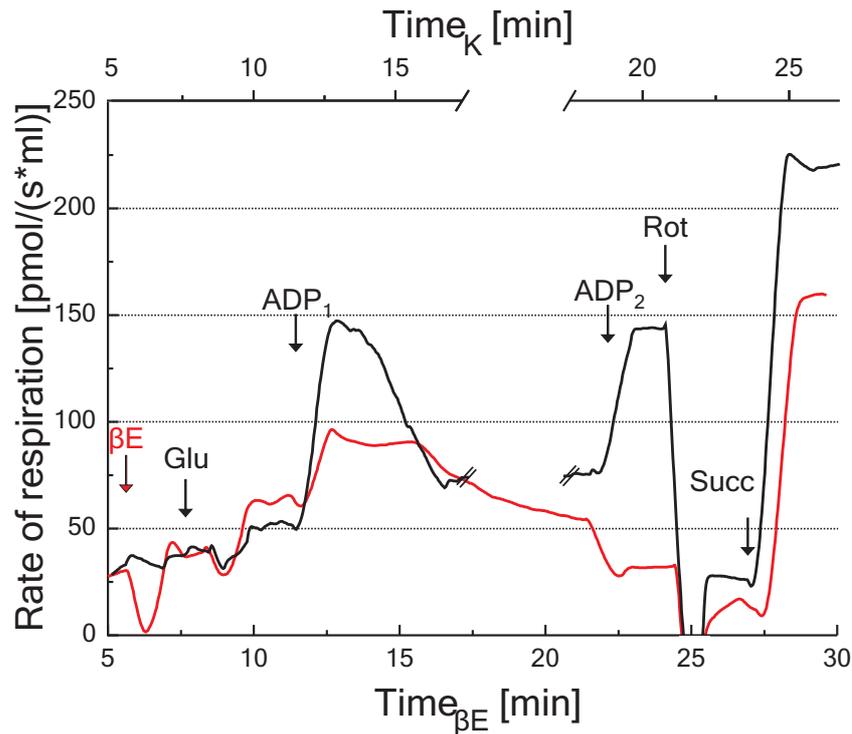


Abbildung 3.6: Kurvenverläufe repräsentativer Versuche ohne  $\beta E$  (schwarz) und nach Zugabe von  $30 \mu M \beta E$  (rot). Pfeile markieren die Zugabe von:  $30 \mu M \beta E$  (nur rote Kurve),  $10 \text{ mM Glu}$ ,  $100 \mu M \text{ ADP}$  ( $\text{ADP}_1$ ),  $2 \text{ mM ADP}$  ( $\text{ADP}_2$ ),  $1.5 \mu M \text{ Rot}$  und  $10 \text{ mM Succ}$ , ( $2 \text{ mM Mal}$  vor Aufzeichnung hinzugegeben). Obere Zeitachse entspricht Zeitverlauf der Kontrollkurve, untere Zeitachse dem der Testkurve. Substratatmung nach  $\beta E$ -Zugabe erhöht. Komplex I-Atmung nach Zugabe von  $\beta E$  eingeschränkt.  $\text{ADP}_2$  führte zum Abfall des Sauerstoffverbrauchs. Atmung nach Rot und Komplex II-Atmung vermindert.

war, erfolgte die Zugabe von  $10 \text{ mM Succinat}$ . Dieses führte zu einer raschen Zunahme des Sauerstoffverbrauchs auf Werte, die den  $\text{state } 3_{\text{mal/glu}}$  überschritten. Folglich hat der Komplex II in den Lebermitochondrien eine höhere Umsatzrate als der Komplex I. Zur Bestimmung der Komplex II-Atmung wurde die  $\text{Rot}_{\text{mal/glu}}$  vom Maximalwert der Respiration nach der Succinat-Gabe abgezogen. In den Versuchen mit  $\beta E$  zeigte sich in sechs Experimenten eine Einschränkung der Succinatverwertung von  $8\text{-}42\%$  (Siehe Tab. 3.3). In den Experimenten IX und X war die Komplex II-Atmung mit  $1\text{-}4\%$  diskret erhöht. Insgesamt war die Komplex II-Atmung signifikant eingeschränkt ( $n=9$ ,  $\text{Komplex II}\beta E=83 \pm 16\%$ ,  $p=0.01$ ). Die Tab. 3.3 gibt einen Überblick über die Einzelergebnisse der gepoolten Experimente. In Abb. 3.6 wird der Kurvenverlauf mit und ohne  $\beta E$  gegen die Zeit dargestellt.

Tabelle 3.3: Einfluss von  $\beta$ E auf die mitochondriale Atmung nach Rotenon, n: Anzahl der Einzelversuche pro Experiment. Rot<sub>mal/glu</sub>: Atmung nach Zugabe von 1.5  $\mu$ M Rotenon; Succ: Atmung nach Zugabe von 10 mM Succinat nach Rotenon; Komplex II: Differenz zwischen Succ und Rot<sub>mal/glu</sub>. Sauerstoffänderung pro Volumen in  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}\cdot\text{ml}} \pm \text{SD}$ ; [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollversuchen ohne  $\beta$ E (100%); \*=Änderung zu Kontrolle signifikant ( $p \leq 0.05$ ); \*\*= Änderung zu Kontrolle hoch signifikant ( $p \leq 0.01$ )

Experiment	Versuch	n	Rot <sub>mal/glu</sub>	[%]	Succ	[%]	Komplex II	[%]
Exp I	ohne $\beta$ E	2	19.17 $\pm$ 1.83	[100]	183.12 $\pm$ 24.09	[100]	163.95 $\pm$ 22.27	[100]
	mit $\beta$ E	1	14,80	[77]	110,08	[60]	95,29	[58]
Exp III	ohne $\beta$ E	2	26.20 $\pm$ 5.16	[100]	222.42 $\pm$ 27.45	[100]	196.22 $\pm$ 22.29	[100]
	mit $\beta$ E	2	11.16 $\pm$ 6.16	[43]	192.34 $\pm$ 15.49	[86]	181.18 $\pm$ 21.66	[92]
Exp IV	ohne $\beta$ E	1	26,51	[100]	226,58	[100]	200,07	[100]
	mit $\beta$ E	1	12,95	[49]	159,80	[71]	146,85	[73]
Exp VII	ohne $\beta$ E	1	15,1156	[100]	170,1045	[100]	154,9889	[100]
	mit $\beta$ E	1	12,975	[86]	119,6449	[70]	106,6699	[69]
Exp VIII	ohne $\beta$ E	1	10,12	[100]	273,52	[100]	263,41	[100]
	mit $\beta$ E	1	6,99	[69]	219,42	[80]	212,43	[81]
Exp IX	ohne $\beta$ E	1	11,83	[100]	242,41	[100]	230,58	[100]
	mit $\beta$ E	1	5,75	[49]	245,91	[101]	240,15	[104]
Exp X	ohne $\beta$ E	1	20,16	[100]	253,83	[100]	233,67	[100]
	mit $\beta$ E	1	22,61	[112]	259,15	[102]	236,53	[101]
Exp XI	ohne $\beta$ E	1	24,04	[100]	285,65	[100]	261,60	[100]
	mit $\beta$ E	1	20,40	[85]	250,77	[88]	230,38	[88]

### 3.3 $\beta$ E-Wirkung auf mitochondriale Ionenkanäle

Im Fokus dieser Arbeit standen ein mitochondrialer,  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver und spannungsabhängiger K-Kanal (mtBK-Kanal) sowie die PTP der inneren Mitochondrienmembran. Es sollte untersucht werden, ob  $\beta$ E seinen putativ protektiven Einfluss über die Modulation dieser Kanäle ausübt.

#### 3.3.1 Identifizierung des spannungsabhängigen mtBK-Kanals

Mit Hilfe der pClamp-Software wurde regelmäßig ein Ionenkanal detektiert, der reproduzierbar die folgenden Charakteristika aufwies:

1. Leitfähigkeit

Die maximale Amplitude des voll geöffneten Kanals lag bei  $5.2 \pm 0.25$  pA

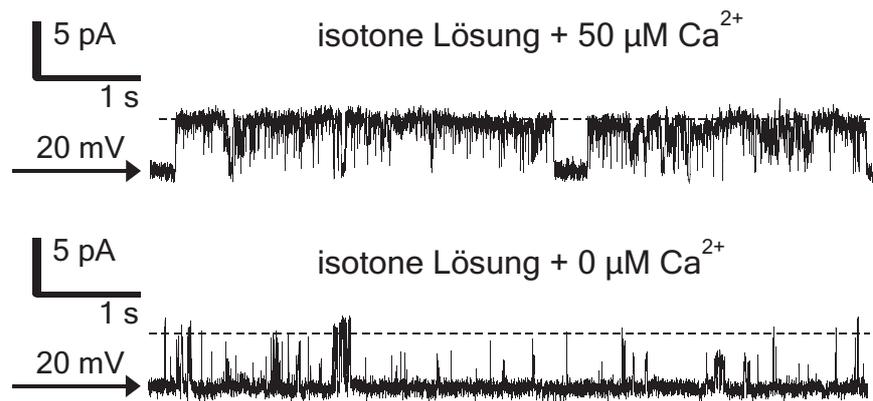


Abbildung 3.7: Calciumabhängigkeit des beobachteten Kanals. Einzelkanalregistrierungen bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (isotone Lösungen mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und ohne appliziertes  $\text{Ca}^{2+}$ );  $E_{\text{H}}=20 \text{ mV}$ . Pfeile markieren den Geschlossenenzustand, die gestrichelte Linie die maximale Amplitude.

( $n=4$ ) bei einem  $E_{\text{H}}$  von  $20 \text{ mV}$ . Liegen innen und außen  $0 \text{ mV}$  an, so sollte bei symmetrischer Ionenverteilung auch der Mitoplast keine ableitbare Spannung über die Membran erzeugen. Sein Umkehrpotential sollte in diesem Fall bei  $0 \text{ mV}$  liegen. Mit Hilfe eines repräsentativen Experimentes und dessen Stromspannungskurve ließ sich feststellen, dass das Umkehrpotential bei etwa  $-2.5 \text{ mV}$  lag. Daraus ergab sich eine Leitfähigkeit von etwa  $295.3 \pm 14.7 \text{ pS}$  (Abb. 3.10), was den Literaturwerten für den mtBK-Kanal entspricht. Durch die Abweichung des Umkehrpotentials von null erscheint die Amplitude bei positivem  $E_{\text{H}}$  etwas größer als bei negativem  $E_{\text{H}}$ , was möglicherweise durch die ungleiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung und den dadurch bedingten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Messpipette verursacht wird.

## 2. Calciumabhängigkeit

$\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Depolarisierung der Mitochondrienmembran und Aktivierung vieler Ionenkanäle. In der Mehrzahl der Experimente enthielt die Badlösung  $50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , der Kontrolllösung wurde kein  $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt. Beim Wechsel aus dem Bad in die Kontrolle konnte man eine Abnahme der Kanalaktivität feststellen. In Abbildung 3.7 sind die Ableitungen eines Experimentes zu sehen, das bei einem  $E_{\text{H}}$  von  $20 \text{ mV}$  aufgenommen wurde. In der Badlösung (isotone Lösung,  $+ 50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) wurde eine  $\text{NP}_o$  von  $3.3 \pm 0.23$  bestimmt. Nachdem Wechsel des Patches in die Kontrolllösung (isotone Lösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) sank die  $\text{NP}_o$  auf  $0.22 \pm 0.04$ . Die Restaktivität könnte auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Verunreinigungen in den Lösungen zurückzuführen sein. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -

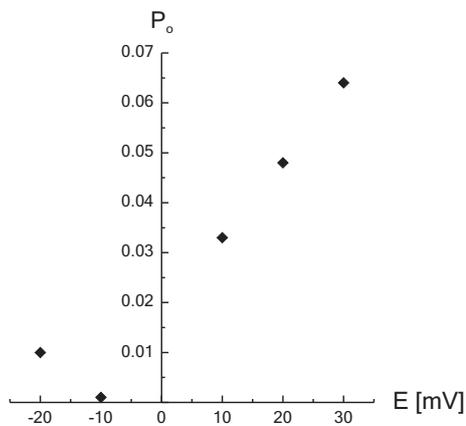


Abbildung 3.8: Potentialabhängigkeit der  $NP_o$  des detektierten Kanals. Das Experiment wurde bei den angegebenen  $E_H$  durchgeführt. Kontrolllösung: isotone Lösung mit  $30 \mu\text{M } \beta\text{E}$ . Pipettenlösung: isontone Lösung mit  $200 \mu\text{M } \text{Ca}^{2+}$  verwendet. Erhöhung der  $NP_o$  durch Verschiebung des Membranpotentials in depolarisierende Richtung. Die Differenz zwischen den  $NP_o$ -Werten bei  $-20 \text{ mV}$  und  $-10 \text{ mV}$  gibt etwa die Streubreite von  $NP_o$  an, die schon durch einzelne sehr lange Ereignisse relativ stark beeinflusst werden kann.

Abhängigkeit des Kanals steht im Einklang mit der Annahme eines mtBK-Kanals.

### 3. Potentialabhängigkeit

Über die IMM lässt sich eine Spannung (Membranpotential) ableiten. Der physiologische Gradient der Ionen an der Außen- und Innenseite der semipermeablen Membran lässt ein Ruhepotential entstehen. Durch Anlegen eines  $E_H$  kann Einfluss auf die Membranpolarisierung genommen werden. Ein positiveres  $E_H$  führt zur Depolarisierung der Membran, ein negativeres  $E_H$  führt zur Hyperpolarisierung. Der hier beobachtete Kanal antwortete mit Abnahme der Kanalaktivität auf eine Hyperpolarisierung und ließ sich umgekehrt durch Depolarisierung öffnen (siehe Abb. 3.8 und Abb 3.9). Ein solches Spannungsverhalten, zusammen mit der oben beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und der genannten Einzelkanalleitfähigkeit ist typisch für den mitochondrialen Kaliumkanal vom Typ BK (Siemen et al., 1999; Gu et al., 2007). Wir gehen daher im Folgenden davon aus, dass es sich beim hier detektierten Kanal um den mtBK-Kanal handelt.

#### 3.3.2 Einfluss von $\beta\text{E}$ auf den mtBK-Kanal

Es wurde ein cytoprotektiver Effekt des  $\beta\text{E}$  beschrieben (Morkuniene et al., 2002; Richardson et al., 2012; Razmara et al., 2008; Ohya et al., 2005). Da eine Abhängigkeit der PTP vom mtBK-Kanal und damit ein Einfluss des mtBK-Kanals auf den intrinsischen Apoptosemechanismus bekannt ist (Cheng et al., 2010), wurde die Wirkung von  $\beta\text{E}$  auf diesen spannungsabhängigen Kationen-Kanal untersucht.

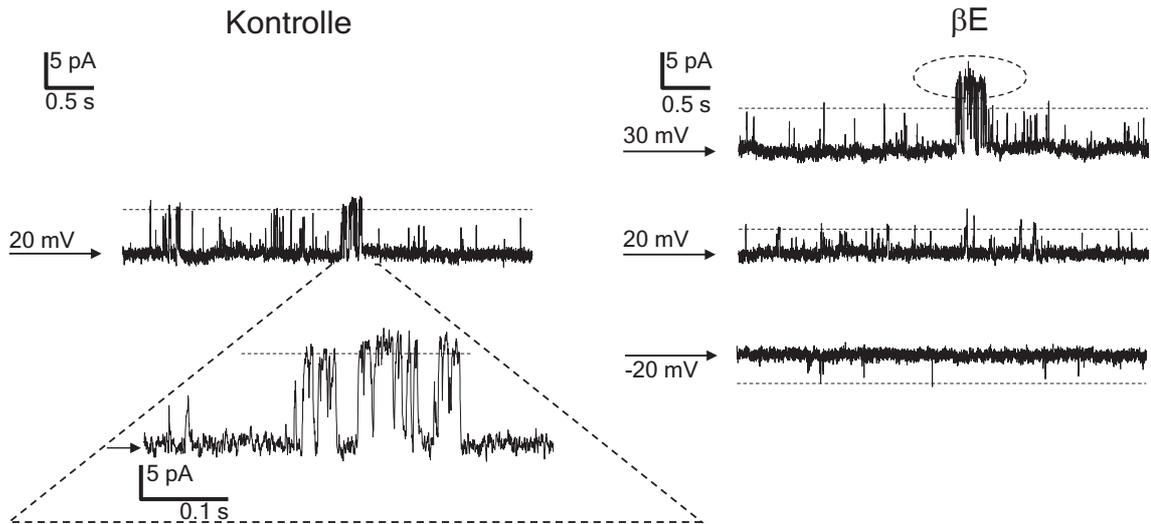


Abbildung 3.9: Einzelkanalregistrierungen des mtBK-Kanals bei verschiedenen  $E_H$  demonstrieren die Spannungsabhängigkeit und hohe Aktivität bei depolarisierenden Potentialen. Kontrolllösung: isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$ ; Testlösung:  $30 \mu M$   $\beta E$  in isotoner Lösung ohne  $Ca^{2+}$ . Pfeile markieren den Geschlossenenzustand des mtBK-Kanals. Gestrichelte Linien: maximale Öffnungsamplitude. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Ableitung in der Kontrolllösung. Kurzzeitige Aktivität eines zweiten mtBK-Kanals bei  $E_H$  30 mV oval eingefasst.

Für die Analyse wurden vier Experimente mit Patch-Clamp-Technik ausgesucht. Eine isotone Lösung mit  $200 \mu M$   $Ca^{2+}$  wurde zum Befüllen der Pipetten verwendet, isotone Lösung mit  $50 \mu M$   $Ca^{2+}$  als Badlösung. Die „sewer pipe“ enthielt mit den Testsubstanzen versetzte isotone Lösung. Die Analyse von 4 unabhängigen Experimenten führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Repräsentativ werden zwei der Experimente näher besprochen. Mit Hilfe einer Strom-Spannungskurve wurde gezeigt, dass  $\beta E$  keinen Einfluss auf die maximale Öffnungsamplitude des mtBK-Kanals hatte und damit die Leitfähigkeit weitestgehend unverändert blieb (Siehe Abbildung 3.10).

Zur Beurteilung des Einflusses von  $\beta E$  auf die Aktivität des mtBK-Kanals wurde außerdem mit Hilfe der „all-points“-Analyse die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) bestimmt. Dafür wurde zu Beginn das Aktivitätsniveau in Badlösung mit  $50 \mu M$   $Ca^{2+}$  aufgezeichnet. Es zeigte sich nach wenigen Minuten eine starke Zunahme des Offenzustandes. Grund hierfür war eine Stabilisierung des Patches in den ersten Minuten nach der Seal-Bildung. In Kontrolllösung ohne  $Ca^{2+}$  nahm die Aktivität schnell wieder ab. Nach dem Wechsel in isotone Lösung mit  $30 \mu M$   $\beta E$  zeigte sich wie in den in Abbildung 3.11 dargestellten Einzelkanalableitungen eine kurze Aktivitätssteigerung. Nach wenigen Minuten nahm  $P_o$  kontinuierlich ab, bis es unter

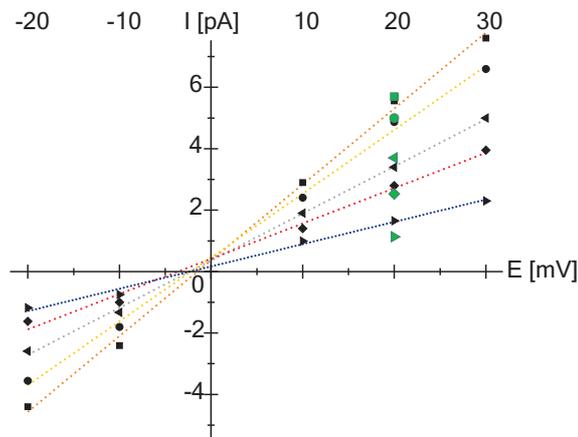


Abbildung 3.10: Die Strom-Spannungskurven des mtBK-Kanals und diverser Substates demonstrieren, dass Stromamplituden von  $\beta E$  weitgehend unbeeinflusst sind. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Amplituden vom angelegten  $E_H$ . Unterzustände des Kanals: Level 1-4; volle Amplitude: Level 5 (Quadrate). Schwarze Symbole: Messung in isotoner Lösung mit  $30 \mu\text{M } \beta E$ . Grüne Symbole: Messung: in isotoner Lösung ohne  $\beta E$ .

das Aktivitätsniveau vom Beginn der Messungen sank. Der darauf folgende Wechsel in die Kontrolllösung ließ einen Wiederanstieg der Aktivität erwarten. Dieser blieb jedoch aus und  $P_o$  blieb weiterhin höchst signifikant unter dem Niveau von  $P_o$  vor  $\beta E$  ( $p \leq 0.001$ ). Das lässt den Schluss auf einen irreversiblen Effekt des  $\beta E$  zu. Die Graphische Darstellung der Amplitudenhistogramme in Abbildung 3.12a veranschaulicht mit Hilfe der Gauß-Kurven die Abnahme der Offenzustände und die Zunahme des Geschlossenzustandes.

Nachdem die Blockade des Kanals in der Kontrolllösung nicht reversibel war, wurde der Patch im gezeigten Experiment erneut mit Testlösung ( $30 \mu\text{M } \beta E$ ) umspült. Der Kanal blieb weiterhin blockiert und es war keine Änderung der  $P_o$  zu erkennen. Daraufhin wurde der Fluss gestoppt und der Patch in der Badlösung (isotone Lösung mit  $50 \mu\text{M } \text{Ca}^{2+}$ ) belassen. Der Kanal erholte sich nur unvollständig und  $P_o$  blieb unter dem Ausgangslevel. Durch die starke Streuung der  $P_o$  in Bad vor  $\beta E$  ist die Differenz zur Badlösung nach  $\beta E$ -Einfluss nicht signifikant (Abbildung 3.12b).

### 3.3.3 Einfluss von Fulvestrant auf den mtBK-Kanal

Um die  $\beta E$ -induzierte Blockade des mtBK-Kanals zu charakterisieren, wurden Mitoplasten während der Patch-Clamp-Experimente mit dem ER-Blocker Fulvestrant behandelt. Dazu wurde eine Lösung hergestellt, die  $100 \mu\text{M } \beta E$  und  $100 \mu\text{M } \text{Fu}$  enthielt. Die alleinige Wirkung von  $\text{Fu}$  wurde untersucht, indem isotone Lösung mit  $100 \mu\text{M } \text{Fu}$  versetzt wurde. In Sauerstoffverbrauchsmessungen verstärkte Fulvestrant den Effekt des  $\beta E$ . In Patch-Clamp-Experimenten kam es unter  $\text{Fu}$  zu einem Wiederanstieg der  $P_o$ , nachdem zuvor  $\beta E$  zu einer Blockade geführt hatte ( $NP_{o(K)}$  nach  $\beta E = 0.13 \pm 0.1$ ;  $NP_{o(K)}$  nach  $\text{Fu} = 1.45$ ; Vergleich Abbildung 3.13). Eine vorherige

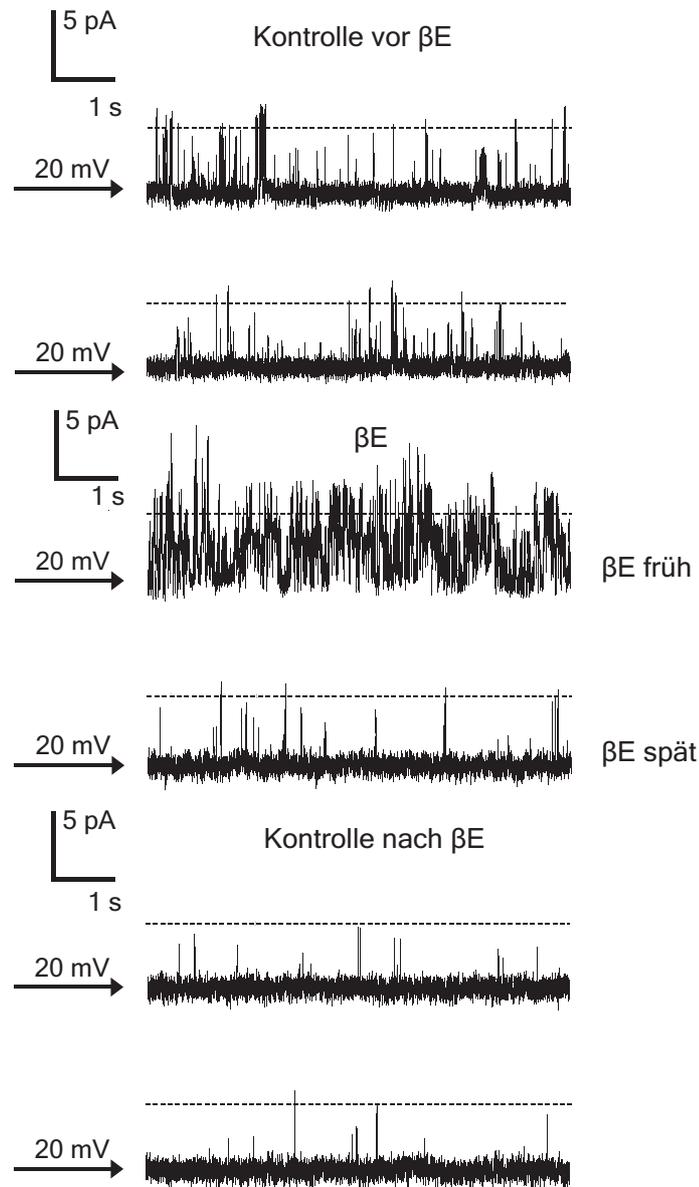


Abbildung 3.11: Blockierung des mtBK-Kanals durch  $\beta E$ . Dargestellt sind Einzelkanalableitungen des mtBK-Kanals in Kontrolllösung vor  $\beta E$  (isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$ ), in Testlösung mit  $\beta E$  (isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$  mit  $30 \mu M \beta E$ ) 1 min und 5 min nach dem Wechsel und in Kontrolllösung nach  $\beta E$  1 min und 4 min nach dem Wechsel. In  $\beta E$  zeigt sich eine transiente Aktivitätszunahme. Es folgt die Hemmung der Kanalaktivität noch in  $\beta E$ . Weitgehende Blockierung des Kanals auch nach Auswaschen von  $\beta E$ . Pfeile markieren den Geschlossen-zustand des mtBK-Kanals, gestrichelte Geraden den Offenzustand.

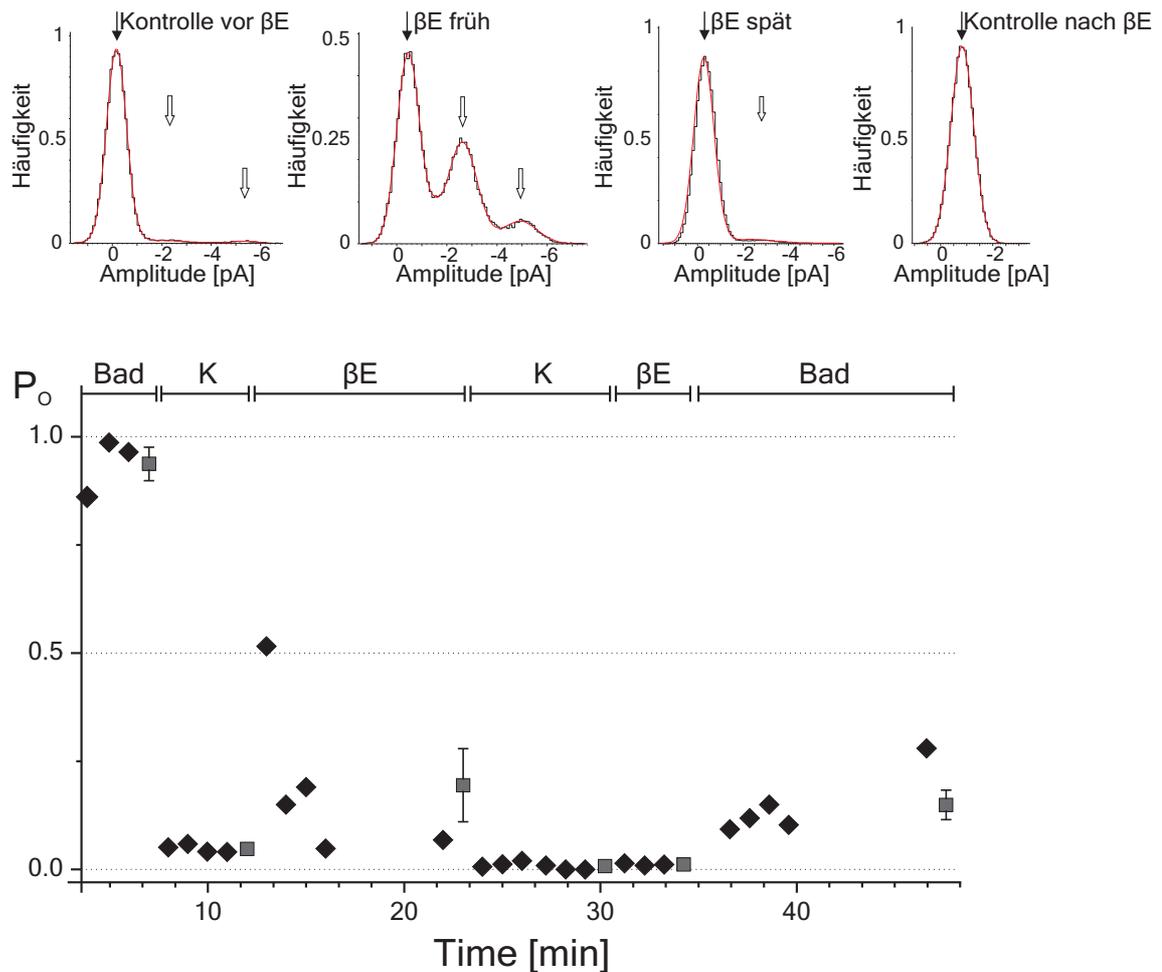


Abbildung 3.12:  $P_o$  des mtBK-Kanals unter Einfluss von  $\beta E$ . a) Repräsentative Amplitudenhistogramme für die Ermittlung der  $P_o$ . Iterativ angepasste Gauß-Verteilungen zur Beschreibung der Histogramme. Die Flächen unter den Gauß-Kurven entsprechen den Häufigkeiten der jeweiligen Amplituden und damit der Gesamtdauer im jeweiligen Zustand. Gefüllte Pfeile markieren die Geschlossenamplitude, offene Pfeile den Offenzustand des mtBK-Kanals und seinen Unterzustand. Die Aktivitätszunahme unter  $\beta E$  war zum großen Teil auf eine Häufung des Unterzustandes zurückzuführen. Nach Wechsel in die Kontrolllösung war keine Aktivität mehr zu verzeichnen. b) Dargestellt ist  $P_o$  über der Zeit. Bad - isotone Lösung mit  $50 \mu M Ca^{2+}$ ; K - isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$ ;  $\beta E$  - isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$  mit  $30 \mu M \beta E$ . Im Bad hohe Aktivität. In Kontrolllösung ohne  $Ca^{2+}$ : Rückgang  $P_o$ . In  $\beta E$ : kurzzeitiger Anstieg und schneller Rückgang bis zur Blockade. Kontrolle: kein Wiederanstieg der  $P_o$ , Effekt scheinbar irreversibel. Unter  $Ca^{2+}$  (Bad) nur unvollständige Rückbildung  $P_o$ . Graue Vierecke markieren Mittelwerte  $\pm$  SD. Fehlerbalken z.T. kleiner als Symbole.  $P_o$  der Kontrolle nach  $\beta E$  signifikant kleiner als  $P_o$  der Kontrolle vor  $\beta E$  ( $p \leq 0.001$ ).

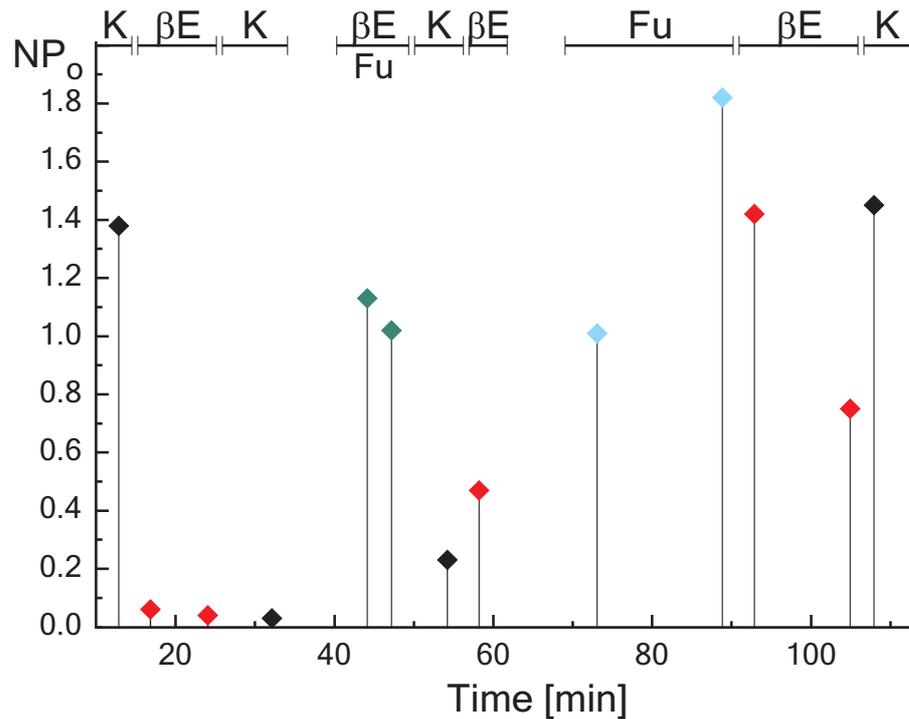


Abbildung 3.13: Einfluss von  $\beta E$  und Fu auf die  $NP_o$  des mtBK-Kanals. Dargestellt ist  $NP_o$  gegen die Zeit. K: isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$ ;  $\beta E$ : isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$  mit  $100 \mu M$   $\beta E$ , Fu: isotone Lösung ohne  $Ca^{2+}$  mit  $100 \mu M$  Fu. In K Aktivität, die bei Wechsel in  $\beta E$  ohne vorherige Zunahme sofort verschwindet. Die Blockade ist in der Kontrolle irreversibel. Unter Fu rascher Anstieg des Aktivitätsniveaus über Kontroll- $NP_o$  hinaus. In der letzten Kontrolle Rückgang auf das Ausgangsniveau.  $NP_o$  in  $\beta E$  ist signifikant kleiner als  $NP_o$  in der Kontrolle vor  $\beta E$  ( $p \leq 0.001$ ),  $NP_o$  Kontrolle nach  $\beta E$  signifikant kleiner als  $NP_o$  Kontrolle vor  $\beta E$  ( $p \leq 0.01$ ).

Fu-Gabe wirkte der  $\beta E$ -bedingten Kanalblockade entgegen. In zwei unabhängigen Experimenten wurde auch unter Verwendung der „single-channel“-Analyse nach  $\beta E$ -Blockade ein deutlicher Wiederanstieg der  $NP_o$  verzeichnet ( $NP_{o(\beta E)} = 0.05 \pm 0.01$ ;  $NP_{o(FU)} = 1.42 \pm 0.405$ ). Die alleinige Gabe von Fu führte zu einer deutlichen Aktivierung des mtBK-Kanals ( $NP_{o(K)} = 0.22 \pm 0.07$ ;  $NP_{o(FU)} = 2.29 \pm 0.26$ ;  $p = 0.02$ ).

Abbildung 3.14 stellt den Einfluss von  $\beta E$  und Fu auf die mittleren Offen- und Geschlossenzeiten des mtBK-Kanals aus Abbildung 3.13 graphisch dar. Zumeist enthielten die Zustände eine schnelle ( $\tau_{fast}$ ) und eine langsame Zeitkonstante ( $\tau_{slow}$ ).  $\tau_0$  beschreibt dabei die mittlere Geschlossenzeitkonstante,  $\tau_1$  die Zeitkonstante des ersten Unterzustandes des Kanals und  $\tau_4$  die mittlere Offenzeit der maximalen

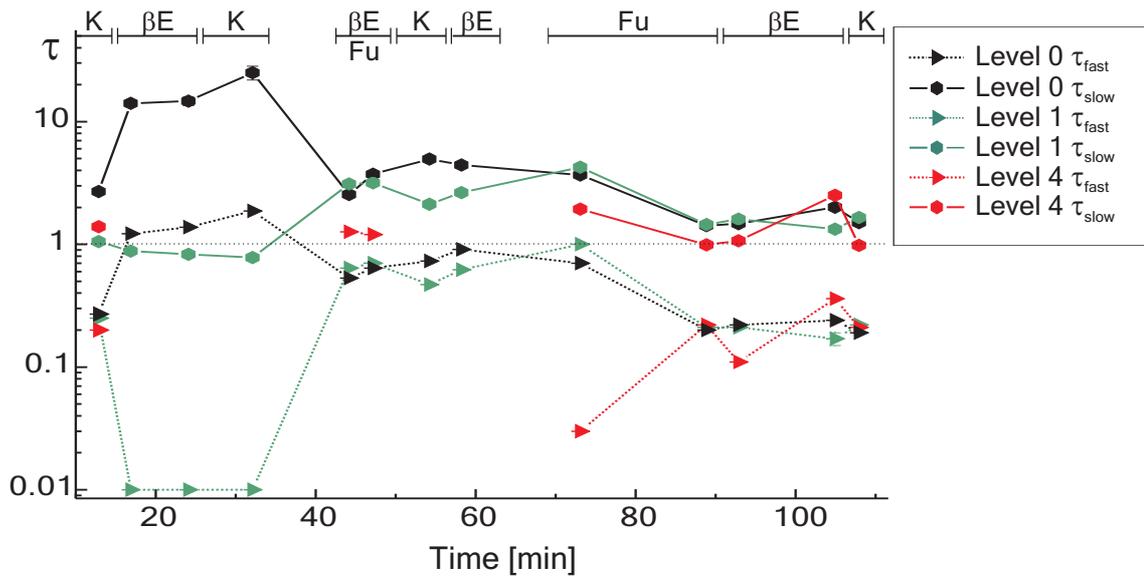


Abbildung 3.14: Einfluss von  $\beta E$  und  $F_u$  auf die mittleren Offen- und Geschlossenzeiten des mtBK-Kanals. Dargestellt sind die mittleren Zeitkonstanten  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  der Level 0 (geschlossen), Level 1 (1. Unterzustand) und Level 4 (maximale Öffnungsamplitude).  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  stiegen und sanken synchron. Unter  $100 \mu M$   $\beta E$  wuchs die Geschlossenzeitkonstante massiv an, während die  $\tau_{slow}$  des Level 1 rapide sank. Level 4 war unter  $\beta E$  nicht okkupiert. Keine Änderung in Kontrolle. Unter Einfluss von  $100 \mu M$   $F_u$  und  $\mu M$   $\beta E$  Rückbildung und Anstieg der Offenzeitkonstanten. Nachträgliche Applikationen zeigten nur minimale Effekte.

Öffnungsamplitude des BK-Kanals. Nach Applikation von  $\beta E$  stiegen sowohl die langsame als auch die schnelle Zeitkonstante des Geschlossenzustandes, während die Zeitkonstanten der Offenzustände abnahmen. Unter  $F_u$  sank die mittlere Geschlossenzeit und der Kanal war im Mittel wieder länger offen. Wurde der Patch wiederholt mit  $\beta E$  behandelt, war kaum noch eine Änderung der Zeitkonstanten zu erkennen. Ein ganz ähnliches Phänomen trat auch bei der Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeiten auf, was eine Desensitivierung des Kanals für  $\beta E$  vermuten ließ.

### 3.3.4 Einfluss von $\beta E$ auf die PTP

Zur Untersuchung der PTP wurden isolierte Rattenlebermitochondrien verwendet, da bekannt ist, dass sie viele Poren enthalten und die aus ihnen gewonnenen Mitoplasten sich mit der Patch-Clamp-Methode gut untersuchen lassen (Loupataz et al., 2002). Frühere Arbeiten aus dem Labor zeigten, dass eine hohe  $P_o$  der K-Kanäle zur Blockierung der PTP führen (Cheng et al., 2010). Aus diesem Grund

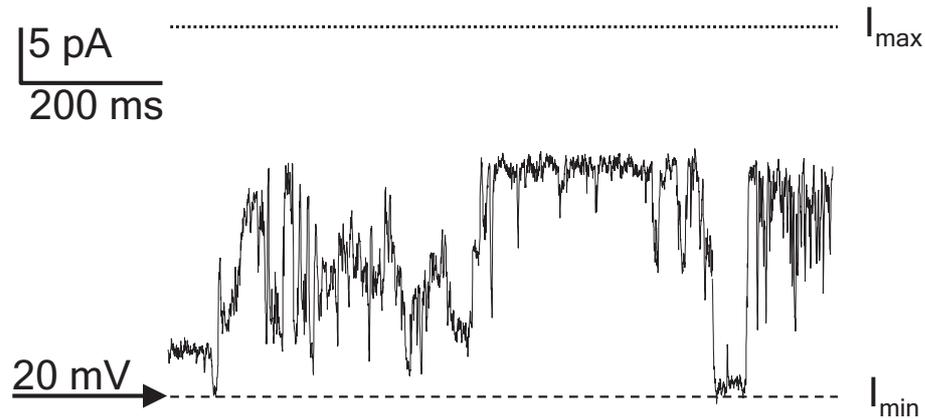


Abbildung 3.15: Einzelkanalableitung der PTP in isotoner Lösung mit  $200 \mu\text{M Ca}^{2+}$ .  $E_H=20 \text{ mV}$ .  $I_{\text{min}}$ : Geschlossenenzustand;  $I_{\text{max}}$ : Maximale Öffnungsamplitude. Maximale Leitfähigkeit:  $>1 \text{ nS}$ ; multiple Substates erkennbar.

sollte getestet werden, ob  $\beta\text{E}$  selbst einen Effekt auf die PTP hat. Unter hohen Pipettenwiderständen von  $1.5$  bis  $3 \text{ M}\Omega$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $200 \mu\text{M}$  und einem  $E_H$  von  $\pm 20 \text{ mV}$  ließ sich ein großer Kanal mit deutlich mehr als zwei Offenzuständen mit variabler Kinetik und einer Leitfähigkeit von bis zu  $1.4 \text{ nS}$  beobachten, der sich bei Depolarisation öffnete. In unserem Labor wurde die PTP ausführlich beschrieben (CsA-Blockierbarkeit, Öffnung durch Depolarisierung u.a.) (Loupatatzis et al., 2002), so dass die Identifizierung als PTP gesichert war. Die Einzelkanalableitungen in Abbildung 3.15 zeigen repräsentative Registrierungen der PTP in Kontrolllösung mit  $200 \mu\text{M Ca}^{2+}$ .

Die PTP wurde in einer Testlösung mit  $30 \mu\text{M } \beta\text{E}$  untersucht. In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich eine kurzzeitige Aktivierung, der ein rascher Abfall der Aktivität folgte ( $P_{o(K)}$  vor  $\beta\text{E}=0.28 \pm 0.02$ ;  $P_{o(K)}$  nach  $\beta\text{E}=0$ ;  $p=2.8 \cdot 10^{-10}$ ). Die Blockierung war in Kontrolllösung irreversibel (Siehe Abbildung 3.16).

Das mit Hilfe der „all-points“-Analyse berechnete  $P_o$  vor, während und nach  $\beta\text{E}$  ist in Abbildung 3.17 graphisch dargestellt. Zusammenfassend bewirkte  $\beta\text{E}$  an der PTP einen raschen, transienten Anstieg der  $P_o$ , gefolgt von einer andauernden, weitgehend irreversiblen Blockade.

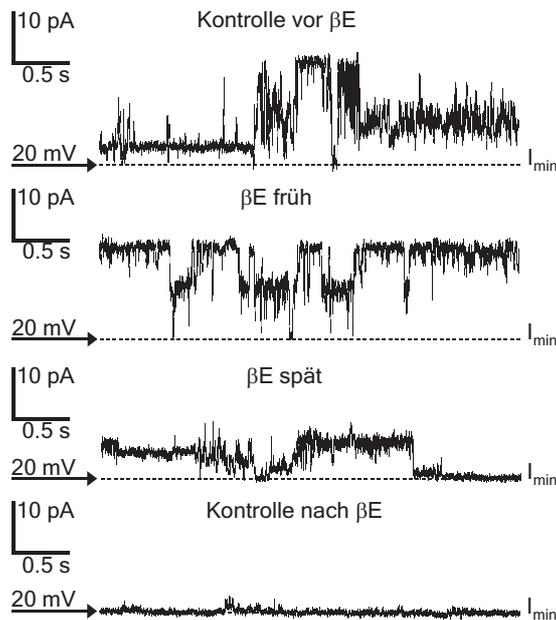


Abbildung 3.16: Einzelkanalableitung der PTP unter Einfluss von  $\beta E$ . Kontrolle: isotone Lösung mit  $200 \mu M Ca^{2+}$ ;  $\beta E$ : isotone Lösung mit  $200 \mu M Ca^{2+}$  und  $30 \mu M \beta E$ .  $E_H = 20 mV$ .  $I_{min}$ : Geschlossenzustand;  $I_{max}$ : Maximale Öffnungsamplitude. Während der Applikation von  $\beta E$  zunächst starke Aktivität mit langen Öffnungszeiten, jedoch auf niedrigerem Niveau als der Maximalamplitude in Kontrolle. Nach etwa 5 min zunehmend längere Geschlossenzeiten bis zum vollständigen Block. In Kontrolle weiterhin keine Aktivität.

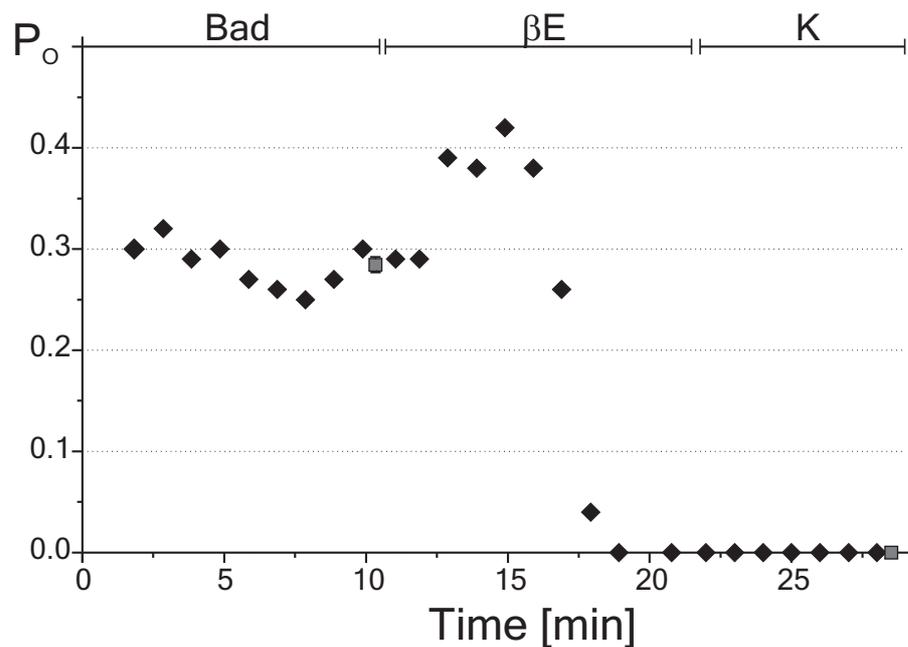


Abbildung 3.17:  $P_o$  der PTP unter Einfluss von  $\beta E$ . Dargestellt ist  $P_o$  gegen die Zeit. Bad: hypotone und hypertone Lösung mit  $200 \mu M Ca^{2+}$ ; Kontrolle: isotone Lösung mit  $200 \mu M Ca^{2+}$ ;  $\beta E$ : isotone Lösung mit  $200 \mu M Ca^{2+}$  und  $30 \mu M \beta E$ . Im Bad hohe Aktivität, in  $\beta E$  kurze Aktivitätssteigerung und schneller Abfall bis zur vollständigen Blockade. Effekt irreversibel in der Kontrolle. Graue Vierecke markieren die MW  $\pm$  SD. Fehlerbalken z. T. kleiner als Symbole.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von $\beta$ E auf Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

17- $\beta$ -Estradiol,  $\beta$ E, hat in den letzten Jahren vermehrt Interesse geweckt. Die Wirkung und zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen des Hormons sind komplex. Der neuro- und cytoprotektive Effekt von  $\beta$ E wird kontrovers diskutiert (Duckles et al., 2006; Henderson & Brinton, 2010; Spampinato et al., 2012). Besonders interessiert der Einfluss des  $\beta$ E auf die Mitochondrien von Geweben mit hohem Energieumsatz und speziell auf die Komplexe der Atmungskette. Man geht davon aus, dass die neuroprotektiven Effekte des  $\beta$ E in den Mitochondrien vermittelt werden (Yao et al., 2011).

$\beta$ E ist ein lipophiles, polares Molekül, das leicht durch die Mitochondrienmembranen diffundiert. Als Steroidhormon beeinflusst es die Transkription von Genen. Das mitochondriale Genom kodiert eine Vielzahl von Proteinen, die am Aufbau der Komplexe der Atmungskette beteiligt sind.

In der präsentierten Arbeit wurden Rattenlebermitochondrien für Sauerstoffverbrauchsmeasurements und Experimente nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip verwendet. Die Ruheatmung (state 1) stieg unter Einfluss von 1 und 10  $\mu$ M  $\beta$ E. Auch nach Zugabe der Komplex I-Substrate Glutamat und Malat war die Atmung (state 2) unter den angegebenen Konzentrationen signifikant erhöht, ein Hinweis für die Entkopplung der Atmungskette. Dies sollte eine erhöhte ROS-Bildung nach sich ziehen, so dass eine kurzzeitige Behandlung mit  $\beta$ E in pharmakologischen Konzentrationen keinen protektiven Effekt erwarten lässt. Die Injektion von 30  $\mu$ M  $\beta$ E in die Messkammern führte zu einer massiven Reduktion des state 3 nach Zugabe von ADP.

Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studiengruppen (Moreno et al., 2012; Morkuniene et al., 2002; Moreira et al., 2006). Moreno verwendete ebenfalls Mitochondrien aus Rattenleber, die in Saccharose-Medium inkubiert wurden. Unter dem Einfluss von 25  $\mu$ M  $\beta$ E war die state 3-Atmung deutlich gehemmt, die state 4-Atmung erhöht. Der RCI ließ auf eine Schädigung der Atmungskette

schließen und war im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt.  $\beta$ E führte nach Zugabe von ADP zu einer massiven Depolarisierung von  $\Delta\Psi$  (Moreno et al., 2012).

Hohe  $\beta$ E-Konzentrationen (50-100  $\mu$ M) führten in den Experimenten von Morkuniene zu einer eingeschränkten state 3-Atmung und Verminderung des Membranpotentials. State 4 blieb unbeeinflusst (Morkuniene et al., 2002). In unseren Atmungs- und Komplexmessungen war ebenfalls keine signifikante Änderung des state 4 zu verzeichnen.

Moreiras Studien zeigten unter Einfluss von 25  $\mu$ M  $\beta$ E und/oder Tamoxifen eine Hemmung der ADP-Atmung von Rattenlebermitochondrien (state 3). Durch Bindung des  $\beta$ E und Tamoxifens an Komplex I wurde die oxidative Phosphorylierung gestört und die ROS-Produktion erhöht. Die Inkubation mit Fu (1  $\mu$ M) blockierte die Wirkung von  $\beta$ E oder Tamoxifen nicht. Der isolierte Einsatz des ER-Antagonisten Fu (1  $\mu$ M) zeigte keine Veränderung der Atmungsaktivität in state 3 oder erhöhte ROS-Level. (Moreira et al., 2006, 2007). In den abgehandelten Sauerstoffverbrauchsmessungen führte der Einsatz von 100  $\mu$ M Fu mit  $\beta$ E zu einer signifikanten Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort und Steigerung der Substrat-Atmung. Die alleinige Verwendung von 100  $\mu$ M Fu während der Präparation und die direkte Zugabe in die Messkammern zog eine signifikante Änderung des state 1 (Steigerung), der ADP-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und NADH-Atmung (Reduktion) nach sich.

In Experimenten von Araujo et al. zeigten Mitochondrien mit 1  $\mu$ M  $\beta$ E kurz vor der Messung in kortikalen Astrozyten eine deutliche Reduktion der Substrat-Atmung, in mesenzephalen Astrozyten jedoch eine Steigerung der Atmung. Die Atmung unter ADP war in kortikalen Mitochondrien unverändert, während sie bei mesencephalen zunahm. Behandelte man die Astrozyten 8 Stunden vor der Mitochondrienpräparation mit  $\beta$ E, wurde eine verstärkte Transkription von Atmungskettenenzymen beobachtet. Die Atmung in Succinat und ADP blieb unverändert. Es war eine Entkopplung der Atmung erkennbar (Araujo et al., 2008). Yao beschreibt eine Steigerung der maximalen respiratorischen Kapazität in Mitochondrien hippocampaler Neuronen durch  $\beta$ E. Die erhöhte Atmungsaktivität unter  $\beta$ E schien zum Großteil auf einem direkten Einfluss auf die mitochondriale oxidative Phosphorylierung durch erhöhte Expression der Komplexe zu beruhen (Yao et al., 2011). Es lassen sich also klare Unterschiede in der Auswirkung des  $\beta$ E-Effektes sowohl in Hinblick auf Einwirkzeit als auch die Zelltypen feststellen. Dies könnte die inkongruenten Daten verschiedener Studien erklären.

Der  $\beta$ E-Effekt auf die mitochondriale Atmung scheint durch Bindung an unterschiedliche Membranproteine vermittelt zu werden. Es wird eine Schädigung der Elektronentransportkette und der Eigenschaften der IMM postuliert (Morkuniene

et al., 2002). Das „Oligomycin sensitivity-conferring Protein (OSCP)“, eine Unter-einheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase in der IMM von Säugetieren, fungiert als Bindungsstelle für  $\beta$ E. Die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase-Aktivität von Rattenhirnmitochondrien wurde unter Einfluss von  $\beta$ E signifikant gehemmt (17  $\mu$ M, 7%; 42  $\mu$ M, 25%) (Zheng & Ramirez, 1999). Zusammen mit den erhobenen Daten der Atmungsmessungen liegt es nahe, dass  $\beta$ E zur Abkopplung der F<sub>0</sub>-Phase der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase führt. Moreno et al. zeigten, dass nach der Entkopplung weiterhin ATP synthetisiert wurde (Moreno et al., 2012). Die Annahme von Moreno et al. wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, weil der signifikant erniedrigte RCI in 30  $\mu$ M  $\beta$ E Zeichen einer Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung ist (RCI Kontrolle:  $2.9 \pm 0.65$ ; RCI  $\beta$ E:  $1.68 \pm 0.65$ ).

Pyruvat, ein weiteres Komplex I-Substrat, wurde nur schlecht oder gar nicht von den Lebermitochondrien veratmet. Succinat speist den Komplex II. Komplex I- und Komplex II-Atmung ergeben zusammen die maximale Leistung der Atmungskette. Eine Schädigung des Komplex I kann durch erhöhte Aktivität des Komplex II kompensiert werden. Der state 3 unter Glutamat, Malat und Succinat war in 7 von 9 Versuchen mit  $\beta$ E deutlich reduziert. In einer Serie von Experimenten zeigte sich ein Anstieg der maximalen Kapazität unter  $\beta$ E. Die für die Sauerstoffverbrauchsmessungen nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip gewählten  $\beta$ E-Konzentrationen waren mit 30  $\mu$ M hoch. Präzipitation von  $\beta$ E in der Inkubationslösung könnte eine mögliche Ursache für die erhöhte state 2-Atmung in 2 von 9 Experimenten gewesen sein, da für  $\beta$ E-Lösungen Sättigung bei 70  $\mu$ M angegeben wird (Zheng & Ramirez, 1999).

Rotenon wurde als Insektizid und Akarizid eingesetzt. Es wirkt als spezifischer Komplex I-Inhibitor. Durch die Anwendung lässt sich eine gezielte Aussage über einen von Komplex I der Atmungskette unabhängigen Sauerstoffverbrauch treffen. Nach Zugabe von 1.5  $\mu$ M Rotenon ergab sich in unseren Experimenten eine Restatmung, die nicht auf enzymatische, oxidative Phosphorylierung zurückzuführen ist. Die Experimente zeigten unter Einfluss von 30  $\mu$ M  $\beta$ E eine signifikante Abnahme der rotenonsensitiven Atmung.  $\beta$ E scheint eine Reduktion des Protonen-Lecks über die IMM zu bewirken. Die nachweisliche Schädigung des Komplex I könnte aufgrund der festen funktionellen Bindung mit Komplex III zu dessen Fehlfunktion führen und somit zu einem Abbau des Protonengradienten. Alternative Studien wurden so gedeutet, dass  $\beta$ E die Atmung unter Einfluss des Entkopplers Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) hemmt und  $\Delta\Psi$  verringert (Moreira et al., 2006).

Durch Zugabe des Substrates Succinat wird Komplex II aktiviert. Die Messungen ergaben in den Kontrollexperimenten eine deutlich höhere Atmungskapazität verglichen mit der des Komplex I. Unter dem Einfluss von  $\beta$ E war die Komplex II-

Atmung signifikant eingeschränkt. Abweichungen ergaben sich in zwei Experimenten, die bereits im Vorfeld höhere  $O_2$ -Verbrauchsraten zeigten. Eine Verunreinigung oder Ausfällung des  $\beta E$  aufgrund der hohen Konzentrationen wäre denkbar. Die Ergebnisse sprechen für eine Schädigung von Komplex II durch  $\beta E$ .

Zusammenfassend war unter hohen Konzentrationen des  $\beta E$  kein protektiver Effekt erkennbar. Es kam zur massiven Hemmung der oxidativen Phosphorylierung mit eingeschränkter state 3-Atmung, Succinatatmung und rotenonsensitiver Atmung durch Beeinträchtigung von Komplex I und II. Eine Inhibition weiterer Komplexe ist nicht auszuschließen.

## 4.2 $\beta E$ -Konzentrationen

Vor Beginn der Arbeit galt es zu klären, welche  $\beta E$ -Konzentrationen eingesetzt werden sollten. Dabei muss zwischen physiologischen und pharmakologischen Plasmakonzentrationen unterschieden werden. Die physiologische  $\beta E$ -Konzentration von Frauen im gebärfähigem Alter liegt im Bereich von etwa 100 nM (Torres-Santiago et al., 2013; Green et al., 2001). Außerdem sind die Mitochondrien selbst der Produktionsort von  $\beta E$ . Moats und Ramirez zeigten, dass intravasal verabreichtes  $\beta E$  hauptsächlich in Mitochondrien und andere Zellkompartimente von Leber, adrenergen Drüsen und Milzgewebe von Ratten transportiert wurde (Moats & Ramirez, 1998).

Experimente von Studiengruppen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in den von uns verwandten wurden als Referenz genommen, um Ergebnisse vergleichbar zu machen (Morkuniene et al., 2002; Ohya et al., 2005; Moreno et al., 2012; Moreira et al., 2006). Es ist jedoch zu bedenken, dass unphysiologisch hohe  $\beta E$ -Konzentrationen im menschlichen Organismus das Risiko für thrombembolische Ereignisse, Ovarial-, Endometrium- und Mamma-Carcinome erheblich steigern. Eine Behandlung mit dem Enantiomer von 17- $\beta$ -Estradiol hatte zu keinen peripheren Estrogen-Wirkungen geführt (Green et al., 2001). Hier lassen sich interessante Ausgangspunkte für weitere Studien vermuten.

Die in der Arbeit von Behl et al. getesteten Estrogene schützten die präparierten hippocampalen Mausneuronen vor dem toxischen Einfluss von  $H_2O_2$  und Amyloid-Protein. Hierfür wurde eine Mindestkonzentration von 10  $\mu M$  benötigt (Behl et al., 1997). Andere Studien zeigten ebenfalls, dass ein signifikanter Effekt des  $\beta E$  unter pharmakologischen Konzentrationen im  $\mu M$ -Bereich erreicht wurde (Valverde et al., 1999; Moreira et al., 2007; Ohya et al., 2005). Green et al. belegten sogar, dass bereits Konzentrationen von 10 nM die toxische Wirkung von  $H_2O_2$  in humanen

Neuroblastomzellen massiv reduzieren konnten ([Green et al., 2001](#)).

### 4.3 mtBK-Kanal

Eine Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen K-Kanälen ist durch hohe Leitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit gekennzeichnet. Man bezeichnet sie als BK-Kanäle („Big“ K-channels). Der mitochondriale (mt)BK-Kanal nimmt Einfluss auf entscheidende Vorgänge wie die Apoptose ([Cheng et al., 2011](#)).

Valverde et. al bewiesen, dass eine Interaktion zwischen Hormonen und spannungsabhängigen Kanälen stattfindet ([Valverde et al., 1999](#)). Für die Experimente verwendeten wir Mitoplasten aus kultivierten Astrocytomzellen von Ratten (U-87 MG), da diese in früheren Versuchen eine höhere Anzahl an BK-Kanälen in der IMM zeigten ([Bednarczyk et al., 2013](#)). Der Badlösung wurden  $50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt. Sowohl Kontrolllösung als auch Testlösung ( $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$ ) enthielten kein zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$ . In Badlösung zeigte sich zunächst ein langsamer Anstieg der Kanalaktivität, der auf das Einströmen des  $\text{Ca}^{2+}$  zurückzuführen war. Bei Wechsel in Kontrolllösung nahm die Aktivität ab. In  $\beta\text{E}$ -Testlösung kam es zunächst zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität, in den folgenden Minuten aber zu einer kontinuierlichen Abnahme, bis  $P_o$  nach etwa fünf Minuten unter das Kontrollniveau sank. Diese Inhibition ließ sich durch Spülen mit isotoner Kontrolllösung nicht aufheben. Die initiale Aktivierung wurde auch von Ohya an cardialen Mitoplasten beobachtet ([Ohya et al., 2005](#)). Ohya sah in seinen Patch-Clamp-Experimenten an der IMM cardialer Mitoplasten einen spannungsabhängigen Kanal mit einer Leitfähigkeit von etwa 270 pS, der durch Paxillin vollständig blockiert wurde. Die Kanaleigenschaften sprachen für einen BK-Kanal, jedoch wurde von Ohya et al. die Auswertung durch Überlagerung der Messungen von anderen Kanalereignissen als schwierig beschrieben. Eine exakte Bestimmung der  $P_o$  des BK-Kanals wurde nur in 3 Experimenten erreicht. Nach Zugabe von  $30 \mu\text{M}$   $\beta\text{E}$  wurde ein Anstieg der  $P_o$ , also Kanalaktivierung, registriert. Die Einwirkzeit und Dauer einzelner Versuche ist nicht dokumentiert ([Ohya et al., 2005](#)). Eine verlängerte Einwirkzeit führte in unseren Experimenten zu einer Abnahme der  $P_o$  bis zur vollständigen Blockierung des Kanals.

Valverde injizierte Krallenfroschoozyten mRNA der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Einheiten des BK-Kanals oder die Kombination beider Untereinheiten und registrierte mit Hilfe des Patch-Clamp-Verfahrens die Kanalaktivität. Über die Pipettenlösung wurde  $\beta\text{E}$  zugeführt, was zu einer Steigerung der Kanalaktivität führte, wenn beide Untereinheiten exprimiert wurden. Dies galt auch für die Untersuchungen des BK-Kanals in aortalen Gefäßmuskelzellen jedoch nicht für Skelettmuskelzellen. Die elektrophysy-

siologischen und Bindungsstudien zeigten, dass der  $\beta$ E-Effekt über Bindung an der Außenseite der Zelle vermittelt wird. Die Bindung von  $\beta$ E an die  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals bewirkte nur in Anwesenheit von  $\alpha$ -Untereinheiten eine Aktivierung des Kanals (Valverde et al., 1999). Wie Ohya beschrieb auch Valverde eine Öffnung des BK-Kanals unter Einfluss von  $\beta$ E an Oozyten und glatten Gefäßmuskelzellen, die durch direkte Bindung an Untereinheiten des plasmalemalen Kanals bedingt war (Valverde et al., 1999). Bei Applikation durch die Messpipette im Versuchsaufbau von Valverde ist jedoch ein längerer Kontakt mit der Substanz gegeben. Die Variabilität der gewebe-, zell- und zellorganellspezifischen BK-Kanal-Typen legt es nahe, dass Bindungsverhalten und Wirkmechanismus von  $\beta$ E an den miteinander interagierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten komplex sind.

Um die Bindung von  $\beta$ E am Kanal zu untersuchen, wurde die Testlösung (30  $\mu$ M  $\beta$ E, ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ ) mit 100  $\mu$ M Fu, einem selektiven ER-Antagonisten, versetzt. Mehrere unabhängige Experimente zeigten einen Wiederanstieg der Kanalaktivität unter Fu und das Fehlen einer  $\beta$ E-bedingten Blockade, wenn Fu bereits vor oder zusammen mit  $\beta$ E appliziert wurde. Die Spülung eines  $\beta$ E-naiven Patches mit Fu führte zu anhaltender Aktivierung des BK-Kanals.

## 4.4 Rezeptorabhängigkeit

Es konnten bis heute drei Estrogen-Rezeptoren (ER) identifiziert werden,  $\text{ER}\alpha$ ,  $\text{ER}\beta$  und einen G-Protein-gekoppelten ER. GPR30 ist ein intracellulärer ER, der unter anderem Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase nehmen kann (Revankar et al., 2005).  $\text{ER}\alpha$  und  $\text{ER}\beta$  werden in vielen Geweben exprimiert und ließen sich beispielsweise in neuronalen Zellen und Mitochondrien nachweisen (Monje & Boland, 2001; Pozo Devoto et al., 2008; Smith et al., 2011; Marinis et al., 2013).

Razmara und Kollegen zeigten, dass  $\beta$ E die Expression mitochondrialer Cyto-mRNA und deren Protein über  $\text{ER}\alpha$  erhöht (Razmara et al., 2008). Estrogen supprimierte zudem die Superoxid-Produktion. Der Effekt konnte durch Zugabe des Rezeptor-Antagonisten Fulvestrant aufgehoben werden (Razmara et al., 2008). Die Wirkung von  $\beta$ E scheint somit rezeptorvermittelt zu sein. Weitere rezeptorgebundene Effekte von  $\beta$ E sind zum Beispiel die Erhöhung der NO-Produktion und Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation in Myocardzellen (Morkuniene et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ E-Blockade des mtBK-Kanals von Rattenastrozyten durch Fu antagonisiert werden kann. Cheng et al. beobachteten in Einzelkanalanalysen an glatten Muskelzellen mesenterialer Arterien von Frauen in der Postmenopause eine Induktion der plasmalemalen BK-Kanalaktivität durch

$\beta$ E, während Fu zur Inhibition des Effektes führte. Die Autoren schlossen auf einen rezeptorabhängigen Wirkmechanismus (Cheng et al., 2012). Diese scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse schließen einen ähnlichen Wirkmechanismus nicht aus, sondern sprechen für eine rezeptorvermittelte Wirkung von  $\beta$ E auf den mtBK-Kanal.

In Mitochondrien humaner Neuroblastomzellreihen wurden sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  nachgewiesen. Die Anwesenheit von  $\beta$ E reduzierte den durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Zelltod durch ER $\beta$  abhängige Induktion von Neuroglobin, einem Neuroprotektivum (Marinis et al., 2013). Smith et al. fanden Hinweise auf eine erhöhte Expression antiapoptotischer und ER-codierender Gene in Mikrogliazellen unter Einfluss von  $\beta$ E und ER-Agonisten. Es handelt sich um einen cytoprotektiven Effekt vor der Toxizität von Lipopolysacchariden, der unter Einfluss von Fu vermindert war (Smith et al., 2011). Dass  $\beta$ E nicht in jedem Fall vor dem Zelluntergang schützt, bewies Waters an Neuronen des anteroventralen, periventriculären Nucleus der präoptischen Region des Hypothalamus, die sich erst postnatal unter Einfluss von Geschlechtshormonen differenzieren. Die Behandlung mit  $\beta$ E führte bei Anwesenheit des ER $\alpha$  zu erhöhten Apoptoseraten (Waters & Simerly, 2009).

Die hier vorgestellten Experimente zur Wirkung von  $\beta$ E auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und auf einzelne Atmungskettenenzyme wurden zur Kontrolle mit dem ER-Antagonisten Fu durchgeführt. Es zeigte sich bei der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung ein summativer Effekt beider Substanzen mit eingeschränkter state 3-Atmung. Die Suppression der Atmung ließ sich auch ohne  $\beta$ E durch alleinige Zugabe von Fu erzeugen, so dass es sich höchstwahrscheinlich nicht um einen rezeptorgebundenen Effekt handelt. Behl et al. wiesen einen rezeptorunabhängigen, neuroprotektiven Effekt von  $\beta$ E und einiger seiner Derivate nach. Die neuroprotektive Aktivität wurde auf die Anwesenheit einer OH-Gruppe am C3 des A-Rings im Steroid-Molekül zurückgeführt (Behl et al., 1997). Fu weist ebenfalls diese OH-Gruppe auf. Die hier beschriebenen Effekte des Antagonisten sind also möglicherweise in der strukturellen Ähnlichkeit von  $\beta$ E und Fu begründet. Eine Bindung an Atmungskomplexe ist denkbar, allerdings könnte es sich auch um einen indirekten, durch den mtBK-Kanal vermittelten Effekt handeln (Bednarczyk.2013).

Andere Arbeitsgruppen wiesen ebenfalls rezeptorunabhängige  $\beta$ E-Effekte nach. Der durch die Behandlung mit  $\beta$ E erworbene Schutz von Hühner-Hepatozyten vor der durch Hypoxie induzierten ROS-Produktion wurde nicht durch Fu antagonisiert (Lee et al., 2008). Auch der Einfluss von  $\beta$ E auf Ionenkanäle wurde untersucht. Wang et al. zeigten eine reversible  $\beta$ E-Blockade eines durch hohe Potentiale aktivierten Ca<sup>2+</sup>-Kanals corticaler Neurone, auf die Fu keinen Einfluss nahm. Es wurde ein Proteinkinase-abhängiger Signalweg ohne ERs postuliert. (Wang et al.,

2013). Estrogenrezeptorbindung und ein Einfluss auf die Genexpression scheinen somit nicht grundsätzlich für die Effekte des  $\beta$ E notwendig zu sein.

## 4.5 PTP

Die mitochondrialen Membranen werden von einer Vielzahl von Ionenkanälen, Transporter- und Signalproteinen durchspannt. Der Zusammenbruch des Membranpotentials und der Verlust der Barrierefunktion der mitochondrialen Membranen durch massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und oxidativen Stress bei gleichzeitiger Freisetzung proapoptotischer Faktoren wird als „permeability transition“ bezeichnet. Hohe Ionenleitfähigkeit durch Öffnung einer wenig selektiven Pore, der PTP, ist mit diesem Vorgang assoziiert. Die PTP hat einen Zustand niedriger Leitfähigkeit nur für Ionen wie  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , oder  $\text{K}^+$  mit einem Molekulargewicht unter 300 Da durchlässig ist und in diesem teilgeöffneten Zustand nicht zur Matrixschwellung führt (Brenner & Moulin, 2012).

Cyclophylin D ist ein Bestandteil der PTP. Es handelt sich um eine Peptidylprolylisomerase, die als Chaperon zur Faltung von Proteinen beiträgt. Als Baustein der PTP nimmt es Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ - und ROS-Sensitivität der PTP (Baines et al., 2005). ANT, VDAC, Benzodiazepinrezeptor, Hexokinase, Creatinkinase, Bcl2, Phosphat-Carrier und andere Proteine spielen eine modulatorische Rolle. Als essentielle Komponente der PTP ist die ANT umstritten (Kokoszka et al., 2004; Baines et al., 2007; Javadov & Kuznetsov, 2013).

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass spannungsabhängige K-Kanäle den Offenzustand der PTP beeinflussen können. Cheng et al. gelang der indirekte Nachweis des blockierenden Effektes eines offenen mtBK-Kanals auf die PTP (Cheng et al., 2011). Unsere Experimente sollten klären, ob  $\beta$ E einen direkten Effekt auf die PTP hat und sich hieraus ein protektiver Charakter des Steroids ableiten lässt. Wie in den Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden Mitochondrien aus Rattenleber präpariert. Ihre Mitoplasten zeigen ein hohes Aufkommen der PTP und die Ergebnisse ließen sich mit früheren Versuchsreihen gut vergleichen (Loupatatzis et al., 2002).

Die Recherchen zur Wirkung von  $\beta$ E sprechen mehrheitlich für eine Blockierung der Pore. Die hierfür verwendeten Methoden wiesen den Einfluss auf die PTP nur indirekt nach. Su et al. postulierten, dass den degenerativen Prozessen der inflammatorischen Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose mitochondriale Dysfunktionen und unter Anderem die Öffnung der PTP zu Grunde liegen (Su et al., 2013). Andere sahen unter dem Einfluss von  $\beta$ E an kultivierten, hippocampalen Zellen ei-

ne Protektion vor einer durch Alkoholentzug induzierten Öffnung der PTP ([Jung et al., 2009](#)). Mit Hilfe der Calcein-Acetoxy-methylester/Cobalt-Methode beschrieben La Colla et al. fluoreszenzmikroskopisch und mit Flusscytometrie den Effekt von  $\beta$ E auf eine Zelllinie skelettaler Muskelzellen näher. Die Behandlung der Zellen mit 10 nM  $\beta$ E vor Apoptoseinduktion durch Zugabe von 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  schützte vor der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Öffnung der PTP ([La Colla et al., 2013](#)).

Morkuniene et al. prüften, ob  $\beta$ E in physiologischen Konzentrationen an Rattenherzmitochondrien die Öffnung der PTP und den hierdurch erzeugten schädlichen, intracellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg während cardialer Ischämien verhindern kann. Der Einfluss von 100 nM  $\beta$ E bewirkte eine reduzierte Öffnung der PTP, weniger aktive PTP und damit verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Ausstrom von Cyt c aus dem mitochondrialen Spalt. Auch 100 nM des  $\beta$ E-Antagonisten Tamoxifen führten zu einer Inaktivierung der PTP ([Morkuniene et al., 2002](#)). Membranpotential-, Schwellungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxmessungen an Rattenlebermitochondrien deuteten ebenfalls auf einen blockierenden Effekt von Tamoxifen auf die PTP hin ([Custódio et al., 1998](#)).

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode gelang es in dieser Arbeit, den direkten Einfluss von  $\beta$ E auf die PTP nachzuweisen. Der Kanal zeigte eine hohe Leitfähigkeit von  $\sim 1.4$  nS, multiple Offenzustände sowie  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit. Er ließ sich durch Zugabe von CsA blockieren, was ihn zweifelsfrei als PTP identifizierte. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration betrug in allen Lösungen 200  $\mu\text{M}$ . Die Experimente wurden bei einem Haltepotential von 20 bis -20 mV durchgeführt. Es wurden 30  $\mu\text{M}$   $\beta$ E in isotoner Lösung zugeführt. Kurz danach stieg die Aktivität kleinerer Zwischenzustände deutlich an, ohne dass die maximale Öffnungsamplitude erreicht wurde. Nach etwa 5 Minuten sank die zunächst erhöhte Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  wieder bis sie null erreichte. Die  $\beta$ E-Blockade der PTP nach transientem Anstieg von  $P_o$  war irreversibel in Kontrolllösung. Diese Ergebnisse decken sich mit den vorab besprochenen Studien.

Welcher genaue Mechanismus dem Effekten von  $\beta$ E zugrunde liegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxmessungen von Bopassa an Rattenherzmitochondrien führten zu der Annahme, dass die Aktivierung des oben beschriebenen GPR30 zur Hemmung der PTP führt ([Bopassa et al., 2010](#)).

## 4.6 Zusammenhang zwischen BK-Kanal, PTP und Atmungskette

Der Einfluss des Membranpotentials, der Matrixschwellung und der Ionenfluxe über die Membranen auf die mitochondrialen Funktionen wurde vielfach belegt (Bernardi, 1999; Gellerich et al., 1994; Bender & Kadenbach, 2000). Dabei interessiert insbesondere die Interaktion mitochondrialer Kanäle mit der oxidativen Phosphorylierung.

Die Analyse der Multienzymkomplexe von Rattenlebermitochondrien erbrachte Hinweise auf eine direkte Interaktion von  $\beta E$  mit der Atmungskette. Nach Zugabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon ist Restatmung zu beobachten. Es handelt sich hierbei um einen von der Atmungskette unabhängigen Protonenfluss durch Entkopplungsprozesse mit Rückstrom von Protonen über die IMM oder Öffnung der PTP (Hall et al., 2013). In den von mir durchgeführten Experimenten war die Restatmung unter Einfluss von  $\beta E$  vermindert. Die Reduktion der rotenonsensitiven Atmung ist mit einer Blockade der PTP vereinbar. Die Patch-Clamp-Experimente beweisen, dass  $\beta E$  die PTP hemmt.

Aon et al. gelang es mit Hilfe eines spezifischen Aktivators des mtBK-Kanals, NS11021, die Öffnung des Kanals und damit einen  $K^+$ -Einstrom mit nachfolgender Matrixschwellung herbeizuführen, wobei eine signifikante Änderungen des Membranpotentials ausblieb. Durch NS11021 kam es abhängig von der Anwesenheit des BK-Kanals zu einer verminderten state 4-Atmung ohne Beeinträchtigung des state 3. Hieraus resultierte ein erhöhter RCI, was für eine verbesserte Kopplung von Atmung und oxidativer Phosphorylierung spricht (Aon et al., 2010). Schon früher wurde vermutet, dass Öffnung des mtBK-Kanals wenn überhaupt, dann nur eine sehr kleine Änderung von  $\Delta\Psi$  verursacht (Garlid, 2000).

In unseren Experimenten war der RCI nach Zugabe von  $\beta E$  während der Versuche nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip signifikant erniedrigt. Die Wirkung des  $\beta E$  ist an eine Entkopplung der  $O_2$ -Verwertung von der oxidativen Phosphorylierung und Schädigung der Atmungskette geknüpft. Die höhere Substrat-Atmung in den Sauerstoffverbrauchsmessungen mit  $\beta E$  stützt die Vermutung einer Entkopplung.

Debska et al. zeigten, dass Agonisten mitochondrialer ATP-abhängiger K-Kanäle (mtKATP) zu einer Steigerung der mitochondrialen Atmung führen (Debska et al., 2002). Der durch Aktivierung der mtKATP vermittelte zytoprotektive Effekt beruht auf einer kontrollierten ROS-Produktion (Akao et al., 2003; Pain et al., 2000). ROS dienen als Signalmoleküle und ihre Freisetzung ist ein wichtiger Schritt in der Cardioprotektion, insbesondere nach Ischämien (Thuc et al., 2010). Andrukhiv folgte, dass Komplex I der Atmungskette Produktionsort der Superoxide sein muss

(Andrukhiv et al., 2006). Der Mechanismus des zytoprotektiven Effekts ist unklar. Es wird vermutet, dass die Radikale durch die Öffnung von mitochondrialen K-Kanälen (mtBK-Kanal, mtKATP) die PTP indirekt blockieren (Costa et al., 2006; Cheng et al., 2010). Andere Arbeiten sprechen jedoch für eine Induktion des Cyto-Ausstroms durch die PTP, verursacht durch erhöhte ROS-Produktion (Gilliam et al., 2013; Reza Eskandari et al., 2013). Die unterschiedlichen Endpunkte der ROS-Signalkaskade sind wenig verstanden und scheinen von multiplen Faktoren abhängig zu sein.

Die Patch-Clamp-Experimente zur Untersuchung des mtBK-Kanals erfolgten an aus Rattenastrozyten extrahierten Mitoplasten. Bednarczyk et al. wiesen eine spezifische Interaktion und Bindung der  $\beta 4$ -Untereinheit der mtBK-Kanäle von Rattenastrozyten mit dem Komplex IV der Atmungskette nach. Zudem wurde der Kanal durch Zufuhr von Substraten der oxidativen Phosphorylierung gehemmt (Bednarczyk et al., 2013).

Die mitochondrialen K-Kanäle und die PTP scheinen also in ständiger Interaktion mit den Multienzymkomplexen der Atmungskette zu stehen.  $\beta E$  bewirkte in den Einzelkanalmessungen des mtBK-Kanals nach kurzem Anstieg eine deutliche Abnahme der  $P_o$ . Die Kopplung des mtBK-Kanals mit der Atmungskette und dessen Hemmung kann möglicherweise einen raschen und unkontrollierten Einstrom von  $K^+$ -Ionen verhindern. Die Zugabe von  $Ca^{2+}$  während der Sauerstoffverbrauchsmessungen dient der Öffnung der PTP und führt zur Steigerung des  $O_2$ -Verbrauchs. Unter Einfluss von  $\beta E$  war dieser Anstieg, vermutlich durch Inhibition der PTP, deutlich geringer. Die Blockierung der Ionenkanäle könnte protektiven Charakter haben, indem das Membranpotential  $\Delta\Psi$  stabil gehalten wird.

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweisen von  $\beta E$  sind weitere Untersuchungen notwendig. Patch-Clamp-Experimente ließen durch Einsatz von Fu vermutlich differenziertere Aussagen über eine mögliche rezeptorabhängige Bindung des  $\beta E$  an den PTP-Komplex zu. Weitere Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Einsatz des Substrat-Inhibitor-Prinzips könnten Aufschluss über die Interaktion von  $\beta E$  mit anderen Atmungskomplexen geben. Die nähere Betrachtung der Verknüpfung von mitochondrialen K-Kanälen und der PTP mit der Atmungskette und ihr Einfluss auf Cytoprotektion und Apoptosemechanismen kann ein Ansatzpunkt weiterer Studien sein.

## 5 Zusammenfassung

Die Unterschiede in Inzidenz, Prävalenz, Krankheitsbeginn, und -verlauf zwischen Männern und Frauen brachte Sexualhormone und ihre Abkömmlinge als mögliche Prädiktoren in den Fokus der Forschung. 17- $\beta$ -Estradiol ( $\beta$ E), ein endogenes Steroidhormon, wurde auf seine protektiven Eigenschaften als Ausgangspunkt zur Prävention, Heilung und Linderung von Krankheiten untersucht. Die cyto- und neuroprotektiven Mechanismen des  $\beta$ E sind vielfältig und größtenteils ungeklärt. Die Arbeit untersucht die mitochondriale Wirkungsweise des  $\beta$ E. An Mitochondrien aus Rattenleber wurden in Sauerstoffverbrauchsmessungen die oxidative Phosphorylierung und die Multienzymkomplexe der Atmungskette betrachtet. Die Zugabe von  $\beta$ E während der Messungen führte zu einem Anstieg der Ruhe- und der Substratatmung. Die Atmung nach Zugabe von ADP und  $\text{Ca}^{2+}$  war vermindert. Der repressive Effekt des  $\beta$ E auf die mitochondriale Atmung war konzentrationsabhängig. Die Behandlung der Rattenlebermitochondrien mit  $\beta$ E während der Präparation führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Fulvestrant, ein selektiver Estrogenrezeptorantagonist, hob die  $\beta$ E-Effekte nicht auf, verstärkte sie sogar und hemmte unabhängig von der  $\beta$ E-Zugabe die mitochondriale Atmung.

Messungen zur Bestimmung der Aktivität der Atmungskomplexe nach dem Substrat-Inhibitor-Prinzip zeigten eine verringerte state-3-Atmung, sowie eine eingeschränkte Verwertung des Komplex-II-Substrates Succinat nach Inkubation der Mitochondrien mit  $\beta$ E.

Mit dem Patch-Clamp-Verfahren wurden aus den Rattenlebermitochondrien nach osmotischer Schwellung Mitoplasten hergestellt und auf Kanalaktivität hin geprüft. Ein großer Kanal mit zahlreichen Offenzuständen, variabler Kinetik und hoher Leitfähigkeit von bis zu 1.4 nS wurde detektiert.  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit sowie die Blockierbarkeit durch CsA ließen darauf schließen, dass es sich um die mitochondriale „permeability transition pore“ (PTP) handelt. Das statistische Verfahren der all-points-Analyse zeigte unter Einfluss von  $\beta$ E nach kurzzeitigem Aktivitätszuwachs eine rasche Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit bis zur vollständigen Blockade der PTP.

Der an Mitoplasten aus Rattenastrocytomzellen mit der Patch-Clamp-Methode

aufgezeichnete  $\text{Ca}^{2+}$ - und spannungsabhängige Kanal mit einer Leitfähigkeit von  $\sim 295$  pS wurde als mtBK-Kanal identifiziert.  $\beta\text{E}$  blockierte den mtBK-Kanal nach kurzer Aktivierung irreversibel. Fu hob die Blockade auf und wirkte selbst als Kanalöffner. Aufgrund der hohen Variabilität der BK-Kanaluntereinheiten sind die Ergebnisse vermutlich nur eingeschränkt auf andere Gewebe übertragbar.

Die verwendeten Konzentrationen liegen weit über den physiologischen Konzentrationen des  $\beta\text{E}$ . Die Arbeit deckt multiple Effekte des  $\beta\text{E}$  auf Mitochondrien auf und bestätigt die Komplexität der Wirkmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta\text{E}$  sowohl protektiven aber auch toxischen Einfluss auf die Integrität der Mitochondrienfunktionen nehmen kann. Die pharmakologischen Ansatzpunkte sind klar vorhanden, jedoch sind weitere Studien vor einem Einsatz der Substanz als Zytoprotektivum notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akao, M., O'Rourke, B., Kusuoka, H., Teshima, Y., Jones, S. P. & Marban, E. (2003). *Circulation research* 92, 195–202.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. 4 edition, Wiley-VCH, Weinheim.
- Andrabi, S. A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G. & Horn, T. F. W. (2004). *The FASEB Journal* 18, 869–871.
- Andrukhiv, A., Costa, A. D., West, I. C. & Garlid, K. D. (2006). *American journal of physiology* 291, H2067–74.
- Aon, M. A., Cortassa, S., Wei, A.-C., Grunnet, M. & O'Rourke, B. (2010). *Biochimica et biophysica acta* 1797, 71–80.
- Araujo, G. W., Beyer, C. & Arnold, S. (2008). *Journal of Neuroendocrinology* 20, 930–941.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. & Molkentin, J. D. (2005). *Nature* 434, 658–662.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkentin, J. D. (2007). *Nature cell biology* 9, 550–555.
- Baron, M., Kudin, A. P. & Kunz, W. S. (2007). *Biochemical Society transactions* 35, 1228–1231.
- Basit, F., Humphreys, R. & Fulda, S. (2012). *The Journal of biological chemistry* 287, 38767–38777.
- Bednarczyk, P., Wieckowski, M. R., Broszkiewicz, M., Skowronek, K., Siemen, D. & Szewczyk, A. (2013). *PloS one* 8, e68125.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J. & Holsboer, F. (1997). *Molecular pharmacology* 51, 535–541.
- Bender, E. & Kadenbach, B. (2000). *FEBS letters* 466, 130–134.
- Bernardi, P. (1999). *Physiological reviews* 79, 1127–1155.
- Bernardi, P., Broekemeier, K. M. & Pfeiffer, D. R. (1994). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 509–517.
- Bonora, M., Bononi, A., Marchi, E. d., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wojtala, A., Wieckowski, M. R., Kroemer, G., Galluzzi, L. & Pinton, P. (2013). *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 12, 674–683.
- Bopassa, J. C., Eghbali, M., Toro, L. & Stefani, E. (2010). *American journal of physiology* 298, H16–23.

- Brenner, C. & Moulin, M. (2012). *Circulation research* 111, 1237–1247.
- Bulteau, A. L., Planamente, S., Jornea, L., Dur, A., Lesuisse, E., Camadro, J. M. & Auchere, F. (2012). *Biochimica et biophysica acta* 1822, 212–225.
- Cao, C.-M., Xia, Q., Gao, Q., Chen, M. & Wong, T.-M. (2005). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312, 644–650.
- Cheng, J., Zeng, X.-R., Li, P.-Y., Lu, T.-T., Tan, X.-Q., Wen, J. & Yang, Y. (2012). *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 64, 121–128.
- Cheng, Y., Debska-Vielhaber, G. & Siemen, D. (2010). *FEBS Letters* 584, 2005–2012.
- Cheng, Y., Gulbins, E. & Siemen, D. (2011). *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 27, 191–200.
- Chi, S., Cai, W., Liu, P., Zhang, Z., Chen, X., Gao, L., Qi, J., Bi, L., Chen, L. & Qi, Z. (2010). *Cell death & disease* 1, e13.
- Chiara, F., Gambalunga, A., Sciacovelli, M., Nicolli, A., Ronconi, L., Fregona, D., Bernardi, P., Rasola, A. & Trevisan, A. (2012). *Cell death & disease* 3, e444.
- Colquhoun, D. & Sigworth, F. J. (1983). In *Single-channel recording*, (Sakmann, B. & Neher, E., eds), pp. 191–263, Chapter 11. Plenum Press New York and NY.
- Corral-Debrinski, M., Shoffner, J. M., Lott, M. T. & Wallace, D. C. (1992). *Mutation Research/DNAging* 275, 169–180.
- Costa, A. D. T., Jakob, R., Costa, C. L., Andrukhiv, K., West, I. C. & Garlid, K. D. (2006). *The Journal of biological chemistry* 281, 20801–20808.
- Custódio, J. B. A., Moreno, A. J. M. & Wallace, K. B. (1998). *Toxicology and Applied Pharmacology* 152, 10–17.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G. & Gustafsson, J.-A. (2006). *Pharmacological reviews* 58, 773–781.
- Debska, G., Kicinska, A., Skalska, J., Szewczyk, A., May, R., Elger, C. E. & Kunz, W. S. (2002). *Biochimica et biophysica acta* 1556, 97–105.
- Debska-Vielhaber, G., Godlewski, M. M., Kicinska, A., Skalska, J., Kulawiak, B., Piwonska, M., Zablocki, K., Kunz, W. S., Szewczyk A. & Motyl T. (2009). *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 60, 27–36.
- Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M. & Bernardi, P. (2001). *The Journal of biological chemistry* 276, 2571–2575.
- Duckles, S. P., Krause, D. N., Stirone, C. & Procaccio, V. (2006). *Molecular interventions* 6, 26–35.
- Duncan, O., Taylor, N. L., Carrie, C., Eubel, H., Kubiszewski-Jakubiak, S., Zhang, B., Narsai, R., Millar, A. H. & Whelan, J. (2011). *Plant Physiology* 157.
- Dzbek, J. & Korzeniewski, B. (2008). *The Journal of Biological Chemistry* 283, 33232–33239.

- Emons, G., Gunthert, A., Thiel, F. C., Camara, O., Strauss, H.-G., Breitbach, G.-P., Kolbl, H., Reimer, T., Finas, D. & Rensing, K. (2013). *Gynecologic oncology* 129.
- Gao, Q., Zhang, S.-Z., Cao, C.-M., Bruce, I. C. & Xia, Q. (2005). *Cytokine* 32, 199–205.
- Garlid, K. D. (2000). *Basic research in cardiology* 95, 275–279.
- Gellerich, F. N., Kapischke, M., Kunz, W., Neumann, W., Kuznetsov, A., Brdiczka, D. & Nicolay, K. (1994). *Molecular and Cellular Biochemistry* 1973, 85–104.
- Gibson, G. E. H. H.-M. (2002). *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, 1007–1015.
- Gilliam, L. A. A., Fisher-Wellman, K. H., Lin, C.-T., Maples, J. M., Cathey, B. L. & Neuffer, P. D. (2013). *Free radical biology & medicine* 65.
- Gizatullina, Z. Z., Chen, Y., Zierz, S. & Gellerich, F. N. (2005). *Biochimica et biophysica acta* 1706, 98–104.
- Green, P. S., Yang, S.-H., Nilsson, K. R., Kumar, A. S., Covey, D. F. & Simpkins, J. W. (2001). *Endocrinology* 142, 400–406.
- Grott, M., Karakaya, S., Mayer, F., Baertling, F., Beyer, C., Kipp, M. & Kopp, H.-G. (2013). *Anticancer research* 33, 791–800.
- Gu, X. Q., Siemen, D., Parvez, S., Cheng, Y., Xue, J., Zhou, D., Sun, X., Jonas, E. A. & Haddad, G. G. (2007). *Biochemical and biophysical research communications* 358, 311–316.
- Halestrap, A. P., Connern, C. P., Griffiths, E. J. & Kerr, P. M. (1997). *Molecular and cellular biochemistry* 174, 167–172.
- Hall, A., Larsen, A. K., Parhamifar, L., Meyle, K. D., Wu, L.-P. & Moghimi, S. M. (2013). *Biochimica et biophysica acta* 1827, 1213–1225.
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Ahmadi, K. R., Muqit, M. M. K., Bhatia, K. P., Quinn, N. P., Lees, A. J., Latchmann, D. S., Goldstein, D. B. & Wood, N. W. (2004). *Annals of Neurology* 56, 329–335.
- Henderson, V. W. & Brinton, R. D. (2010). *Progress in brain research* 182, 77–96.
- Heyer, A., Hasselblatt, M., Ahsen, N. v., Hafner, H., Siren, A.-L. & Ehrenreich, H. (2005). *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 427–430.
- Hildyard, J. C. W. & Halestrap, A. P. (2003). *Biochemical Journal* 374, 607.
- Hu, X., Laragione, T., Sun, L., Koshy, S., Jones, K. R., Ismailov, I. I., Yotnda, P., Horrigan, F. T., Gulko, P. S. & Beeton, C. (2012). *The Journal of biological chemistry* 287, 4014–4022.
- Hufschmidt, A., Lücking, C. H. & Rauer, S. (2009). *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis*. 5 edition, Thieme.
- Javadov, S. & Kuznetsov, A. (2013). *Frontiers in physiology* 4, 76.
- Jones, T. T. & Brewer, G. J. (2008). *Experimental Neurology* 215.

- Jung, M. E., Wilson, A. M., Ju, X., Wen, Y., Metzger, D. B. & Simpkins, J. W. (2009). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328, 692–698.
- Kaczorowski, G. J., Knaus, H.-G., Leonard, R. J., McManus, O. B. & Garcia, M. L. (1996). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 28, 255–267.
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L. & Vogt, S. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 205–212.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). *British journal of cancer* 26, 239–257.
- Kim, J. K., Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E. R. (2006). *Journal of Biological Chemistry* 281, 6760–6767.
- Knaus, H. G., Eberhart, A., Glossmann, H., Munujos, P., Kaczorowski, G. J. & Garcia, M. L. (1994). *Cellular signalling* 6, 861–870.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R. & Wallace, D. C. (2004). *Nature* 427, 461–465.
- Korzeniewski, B. & Zoladz, J. A. (2002). *The Biochemical journal* 365, 249–258.
- Krishnamoorthy, G. & Hinkle, P. C. (1984). *Biochemistry* 23, 1640–1645.
- Kunz, W., Gellerich, F. N., Schild, L. & Schönfeld, P. (1988). *FEBS Letters* 233, 17–21.
- La Colla, A., Vasconsuelo, A. & Boland, R. (2013). *The Journal of endocrinology* 216, 331–341.
- Lee, M. Y., Jung, S. C., Lee, J. H. & Han, H. J. (2008). *Cell research* 18, 491–499.
- Lindsay, J., Esposti, M. D. & Gilmore, A. P. (2011). *Bioch Biophys Acta (Biochimica et biophysica acta)* 1813, 532–539.
- Ling, G. N. (1981). *Physiological chemistry and physics* 13, 29–96.
- Loupatatzis, C., Seitz, G., Schönfeld, P., Lang, F. & Siemen, D. (2002). *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 12, 269–278.
- Mansson, R., Hansson, M. J., Morota, S., Uchino, H., Ekdahl, C. T. & Elmer, E. (2007). *Neurobiology of disease* 25, 198–205.
- Marinis, E. d., Fiocchetti, M., Acconcia, F., Ascenzi, P. & Marino, M. (2013). *Cell death & disease* 4, e508.
- Mecocci, P., MacGarvey, U. & Beal, M. F. (1994). *Annals of Neurology* 36, 747–751.
- Meisinger, C., Brix, J., Model, K., Pfanner, N. & Ryan, M. T. (1999). *CMLS (Cellular and Molecular Life Sciences)* 56, 817–824.
- Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. & Attardi, G. (1999). *Science* 286, 774–779.
- Miranda, P., Contreras, J. E., Plested, A. J. R., Sigworth, F. J., Holmgren, M. & Giraldez, T. (2013). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5217–5222.

- Mitchell, P. (1961). *Nature* 191, 144–148.
- Moats, R. K. n. & Ramirez, V. D. (1998). *Biology of reproduction* 58, 531–538.
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W. & Hell, K. (2003). *The EMBO journal* 22, 816–825.
- Monje, P. & Boland, R. (2001). *Journal of cellular biochemistry* 82, 467–479.
- Moreira, P. I., Custódio, J. B. A., Moreno, A. J. M., Oliveira, C. R. & Santos, M. S. (2006). *Journal of Biological Chemistry* 281, 10143–10152.
- Moreira, P. I., Custódio, J. B. A., Nunes, E., Moreno, A. J. M., Seïça, R., Oliveira, C. R. & Santos, M. S. (2007). *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 102–110.
- Moreno, A. J. M., Moreira, P. I., Custodio, J. B. A. & Santos, M. S. (2012). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 45.
- Morkuniene, R., Jekabsons, A. & Borutaite, V. (2002). *FEBS Letters* 521, 53–56.
- Mound, A., Rodat-Despoix, L., Bougarn, S., Ouadid-Ahidouch, H. & Matifat, F. (2013). *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49.
- Murcha, M. W., Elhafez, D., Millar, A. H. & Whelan, J. (2005). *Journal of Biological Chemistry* 280, 16476–16483.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L. (2009). *Lehninger Biochemie: 131 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. aufl., übers. der 5. amerikan. aufl. edition, Springer, Berlin [u.a.]*.
- N’Gouemo, P. (2011). *Expert opinion on therapeutic targets* 15, 1283–1295.
- Nicholls, D. G. (1974). *European journal of biochemistry / FEBS* 50, 305–315.
- Nury, H., Blesneac, I., Ravaud, S. & Pebay-Peyroula, E. (2010). *Methods in molecular biology (Clifton, N* 654, 105–117.
- Ohya, S., Kuwata, Y., Sakamoto, K., Muraki, K. & Imaizumi, Y. (2005). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289, H1635–H1642.
- Pain, T., Yang, X. M., Critz, S. D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G. S., Heusch, G., Cohen, M. V. & Downey, J. M. (2000). *Circulation research* 87, 460–466.
- Palmieri, F. (2004). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447, 689–709.
- Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. & Greenamyre, J. T. (2002). *Nature Neuroscience* 5.
- Plourde, M. B., Morchid, A., Iranzereza, L. & Berthoux, L. (2013). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 826–835.
- Pozo Devoto, V. M., Giusti, S., Chavez, J. C. & Fiszer Plazas, S. d. (2008). *Journal of Neuroendocrinology* 20, 375–380.
- Prendes, M. G. M., Torresin, E., Gonzalez, M., Fernandez, M. A., Perazzo, J. C., Savino, E. A. & Varela, A. (2008). *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35, 201–206.

- Ramzan, R., Staniek, K., Kadenbach, B. & Vogt, S. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 1672–1680.
- Razmara, A., Sunday, L., Stirone, C., Wang, X. B., Krause, D. N., Duckles, S. P. & Procaccio, V. (2008). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325, 782–790.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. & Prossnitz, E. R. (2005). *Science (New York, N* 307, 1625–1630.
- Reza Eskandari, M., Mashayekhi, V., Aslani, M. & Hosseini, M.-J. (2013). *Environmental toxicology* doi:10.1002/tox.21900.
- Richardson, T. E., Yu, A. E., Wen, Y., Yang, S.-H., Simpkins, J. W. & Pandey, S. (2012). *PLoS ONE* 7.
- Robertson, J. F. R. (2001). *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 79, 209–212.
- Sakamoto, K., Ohya, S., Muraki, K. & Imaizumi, Y. (2008). *Journal of Pharmacological Sciences* 108, 135–139.
- Sawada, M., Alkayed, N. J., Goto, S., Crain, B. J., Traystman, R. J., Shavit, A., Nelson, R. J. & Hurn, P. D. (2000). *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 112–118.
- Sayeed, I., Parvez, S., Winkler-Stuck, K., Seitz, G., Trieu, I., Wallesch, C.-W., Schönfeld, P. & Siemen, D. (2006). *The FASEB Journal* , 556–558.
- Schubert, A. (27.06.2003). Die Rolle des Adenin-Nukleotid-Translokators-1 (ANT-1) und des Chaperons Cyclophilin D (CypD) bei der Regulation der mitochondrial vermittelten Apoptose. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Siemen, D., Loupatatzis, C., Borecky, J., Gulbins, E. & Lang, F. (1999). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 549–554.
- Singh, H., Stefani, E. & Toro, L. (2012). *The Journal of physiology* 590, 5937–5947.
- Smith, J. A., Das, A., Butler, J. T., Ray, S. K. & Banik, N. L. (2011). *Neurochemical Research* 36, 1587–1593.
- Spampinato, S. F., Merlo, S., Molinaro, G., Battaglia, G., Bruno, V., Nicoletti, F. & Sortino, M. A. (2012). *Endocrinology* 153, 5940–5948.
- Stanley, S., Dias, J. A., D’Arcangelis, D. & Mannella, C. A. (1995). *The Journal of biological chemistry* 270, 16694–16700.
- Su, K., Bourdette, D. & Forte, M. (2013). *Frontiers in physiology* 4, 169.
- Tan, P. S., Haaland, B., Montero, A. J. & Lopes, G. (2013). *Breast cancer research and treatment* 138, 961–965.
- Thuc, L. C., Teshima, Y., Takahashi, N., Nagano-Torigoe, Y., Ezaki, K., Yufu, K., Nakagawa, M., Hara, M. & Saikawa, T. (2010). *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 669–678.

- Torres-Santiago, L., Mericq, V., Taboada, M., Unanue, N., Klein, K. O., Singh, R., Hossain, J., Santen, R. J., Ross, J. L. & Mauras, N. (2013). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98, 2716–2724.
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orío, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C. & Latorre, R. (1999). *Science* 285, 1929–1931.
- van den Ouweland, J. M., Lemkes, H. H., Trembath, R. C., Ross, R., Velho, G., Cohen, D., Froguel, P. & Maassen, J. A. (1994). *Diabetes* 43, 746–751.
- Vince, J. E., Wong, W. W.-L., Gentle, I., Lawlor, K. E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., Anderton, H., Castillo, R., Häcker, G., Silke, J. & Tschopp, J. (2012). *Immunity* 36, 215–227.
- Vogel, W. & Safronov, B. V. (1999). In *Modern techniques in neuroscience research*, (Windhorst, U. & Johansson, H., eds), pp. 173–192, Chapter 6. Springer Berlin and New York.
- Wallace, D. C. (2005). *Annual review of genetics* 39, 359–407.
- Wallner, M., Meera, P. & Toro, L. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4137–4142.
- Wang, Q., Ye, Q., Lu, R., Cao, J., Wang, J., Ding, H., Gao, R. & Xiao, H. (2013). *Endocrine research* 39.
- Waters, E. M. & Simerly, R. B. (2009). *Journal of Neuroscience* 29, 9714–9718.
- Watzke, N., Diekert, K. & Obrdlik, P. (2010). *Biochemistry* 49, 10308–10318.
- Winterle, J. S., Mill, T., Harris, T. & Goldbeck, R. A. (2001). *Archives of biochemistry and biophysics* 392, 233–244.
- Wu, R. S., Liu, G., Zakharov, S. I., Chudasama, N., Motoike, H., Karlin, A. & Marx, S. O. (2013). *The Journal of general physiology* 141, 105–117.
- Xu, W., Liu, Y., Wang, S., McDonald, T., van Eyk, J. E., Sidor, A. & O'Rourke, B. (2002). *Science (New York, N* 298, 1029–1033.
- Yao, J., Chen, S., Cadenas, E. & Brinton, R. D. (2011). *Brain Research* 1379, 2–10.
- Yi, K. D., Cai, Z. Y., Covey, D. F. & Simpkins, J. W. (2008). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324, 1188–1195.
- Zheng, J. & Ramirez, V. D. (1999). *European journal of pharmacology* 368, 95–102.

# Danksagung

Die Dissertation wurde in der Klinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Magdeburg angefertigt. Prof. Dr. H.-J. Heinze und Prof. Dr. S. Vielhaber sei für diese Möglichkeit herzlich gedankt.

Zusätzlich danke ich allen Personen, die maßgeblich an der Entstehung meiner Doktorarbeit mitgewirkt haben:

In erster Linie möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. D. Siemen für die Bereitstellung des Themas danken sowie die Geduld, mit der er Fragen beantwortete und die er während der vielen Experimente aufbrachte und mir so mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. P. Schönfeld und PD Dr. F. N. Gellerich für die wertvollen Anregungen und die Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen danken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. G. Debska-Vielhaber für die Einarbeitung und Hilfe bei technischen und experimentellen Fragestellungen sowie allen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors.

Im Weiteren möchte ich besonders den Medizinisch-Technischen Laboratoriumsassistentinnen C. Höhne, K. Kaiser, J. Witzke und H. Goldammer für die tatkräftige Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft danken.

Großen Dank spreche ich der Kommission für Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg aus, durch deren Zustimmung ich ein Stipendium und somit die Möglichkeit erhielt, mich der Forschung zu widmen.

Ich danke meinen Freunden und Kollegen, die immer die richtigen Worte fanden, um mich zu motivieren und die für mich stets ein offenes Ohr hatten. Eine ganz besondere Stellung nimmt hierbei mein Freund M. von Kurnatowski ein, der mit liebevoller Fürsorge, der fundierten Kenntnis des Textsatzsystems, aber auch mit mahnenden Gesprächen die Arbeit vorantrieb.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die es mir ermöglichte Medizin zu studieren und schlussendlich diese Doktorarbeit zu erstellen.

# Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

*Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol auf mitochondriale Funktion*

in der Klinik für Neurologie

mit Unterstützung durch meinen Betreuer, Prof. Dr. D. Siemen

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

# Bildungsweg

## Angaben zur Person:

Name: Anika Thiede  
 Geburtsdatum: 13.05.1985  
 Geburtsort: Salzwedel  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung:

1991-1995	Grundschule I, Klötze
1995-1997	Gymnasium Beetzendorf, Außenstelle Klötze
1997-2004	Gymnasium Beetzendorf
03.06.2004	Abitur
2004-2010	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
13.09.2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006-2010	Mitglied im Kiste e.V. (Studentenclub der OvG-Universität Magdeburg)
09/2006-02/2007	Studentische Hilfskraft „Praktikum Chemie für Mediziner“
12/2009-02/2010	Studentische Hilfskraft „Einführung in die klinische Medizin“
19.11.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 2009	Doktorandin an der Klinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Lehrstuhl Prof. Siemen)
01.05.2011-01.11.2011	Promotions-Stipendiatin im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe (LOM) an der Medizinischen Fakultät Magdeburg

## Beruflicher Werdegang:

seit 11/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie im Klinikum Magdeburg

# Liste der Veröffentlichungen

## Originalarbeit in Zeitschrift mit Gutachtersystem:

**Thiede, A.**, Gellerich, F.N., Schönfeld, P., Siemen, D. (2012) Complex effects of  $17\beta$ -estradiol on mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1817:1747-1753.

## Poster:

**Thiede, A.**, Gellerich, F., Schönfeld, P. & Siemen, D. (2012) Complex effects of  $17\beta$ -estradiol on mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1817, Suppl.:S31.

Poster zum Vortrag (gehalten von D. Siemen) auf dem 17. European Bioenergetics Conference (EBEC), 16.9.2012, Freiburg i. Br.